UNIVERSITE DE METZ – UFR Sci.F.A.

Laboratoire des Interactions Ecotoxicité, Biodiversité, Ecosystèmes
CNRS UMR7146

THESE DE DOCTORAT

Présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur des Universités en Ecologie
Mention « Toxicologie de l'Environnement »

Par

Marc DAZY

Caractérisation de la colonisation spontanée par les plantes de sols pollués
Rôle des systèmes cellulaires de détoxication

Présentée le 13 Novembre 2008 devant la commission d'examen :

Jean-Claude Leclerc, Professeur, Université de Saint-Etienne, Rapporteur
Lucien Hoffmann, Docteur, Centre Gabriel Lippmann (Luxembourg), Rapporteur
Gwenola Gouesbet-Jan, Docteur, Université de Rennes, Examinateur
Jean-François Masfaraud, Docteur, Université de Metz, co-directeur de thèse
Jean-François Férard, Professeur, Université de Metz, directeur de thèse



AVERTISSEMENT

Cette thèse est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et disponible à l'ensemble de la communauté universitaire élargie.
Elle est soumise à la propriété intellectuelle de l'auteur au même titre que sa version papier. Ceci implique une obligation de citation, de référencement dans la rédaction de tous vos documents.
D'autre part, toutes contrefaçons, plagiats, reproductions illicites entraînent une poursuite pénale.
Enfin, l'autorisaton de diffusion a été accordée jusqu' à nouvel ordre.

- Contact SCD Metz : daniel.michel@scd.univ-metz.fr

Ecrire au doctorant:

Code de la Proriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Proriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

« Un échec apparent peut contenir les graines d'un succès qui germera en son temps, et donnera des fruits toute l'éternité »

Frances Ellen Watkins Harper

AVANT-PROPOS

Mon travail de thèse a débuté en octobre 2004 suite à l'obtention d'une Allocation Doctorale de Recherche financée dans le cadre du programme GISFI de la région Lorraine. Ce travail a été effectué au sein du Laboratoire d'Ecotoxicologie (LIEBE, ex-ESE, ex-EBSE) de la Faculté des Sciences de l'Université de Metz.

Je remercie donc tout particulièrement les membres de cette unité, en commençant par monsieur le professeur **Jean-François Férard**, qui m'a permis d'effectuer cette thèse sous sa direction et pour la confiance qu'il a su m'accorder durant ces sept dernières années.

Je tiens également à remercier chaleureusement mon co-directeur de thèse, monsieur **Jean-François Masfaraud** pour ses participations aux expériences de terrain, nos fructueuses discussions et ses inestimables conseils de rédaction.

J'aimerai également exprimer ma reconnaissance envers mesdames **Sylvie Cotelle** et **Annick Schnitzler** pour tout ce qu'elles m'ont apporté à travers leur expérience et pour leurs conseils avisés.

J'aimerai également adresser toute ma gratitude à l'égard de mes amis et non moins éminents collaborateurs **Eric Béraud** et **Vincent Jung** pour leurs précieuses contributions apportées dans le dosage des thiols et la réalisation des relevés de végétation. Soyez tous deux remerciés pour votre bonne humeur au quotidien, votre très grande sagesse et pour votre aide à la rédaction des publications accompagnant ce manuscrit. Que les esprits de Tuco et du Frelon Vert vous accompagnent dans vos futurs projets ;-)

Et que serais-je devenu sans la présence, à mes côtés, de **Périne Doyen**, lors de nos pérégrinations transcendantales et séances psycho-communico-éducatives nancéennes organisées par le CIES Lorraine chez Betty Mélinat-Dominger ? Qu'elle trouve ici l'expression de mes plus profonds sentiments.

Je tiens également à exprimer ma profonde gratitude à **Chantal Fouque**, **Claudine Rast** et **Anne-Marie Veber**, pour leur patience et leur gentillesse mais aussi pour leur soutien moral et leur infini sens de l'écoute. Sans oublier les muffins de l'une d'entre elles…

J'adresse aussi une pensée toute particulière aux autres membres du laboratoire et plus particulièrement à son ancienne directrice, **Paule Vasseur**, ainsi qu'à **Maryline Goergen, Rosy Toda, Mireille Ollivier** et **Etienne Morhain**. Qu'ils soient remerciés pour leur généreuse collaboration.

J'en profite également pour remercier l'ensemble des thésards et post-docs, passés, présents, futurs (Anna, Anne-Sophie, Asma, Aurélie, Edwige, Karen, Marie-Aline, Pierre, Quan-Yin, Sophie P., Sophie S., Stéphanie C., Stéphanie P., Vincent M., Yann) et plus particulièrement les anciens membres du clan de la machine à café (Christophe, Pascal, Renaud) pour leur bonne humeur au quotidien et l'excellente ambiance qu'ils ont fait régner au sein du laboratoire. Merci également aux stagiaires qui ont su contribuer avec brios aux expériences réalisées, tout en assurant une bonne ambiance de travail. Merci à Amélie, Céline, Elisa, Marie-Aude, Marie-Pierre et Peace.

Je souhaiterai aussi remercier le professeur **Christian Blaise** (Environnement Canada) et les docteurs **Beverley Glover** (Université de Cambridge) et **Ute Krämer** (Université d'Heidelberg) pour l'aide inestimable qu'ils m'ont apporté lors de nos rencontres et nombreuses correspondances échangées. Un grand « Big Up » également à leurs thésardes (Elinor, Heather, Katy, Kerry-Ann). Veuillez accepter ma reconnaissance et ma plus profonde sympathie.

Ma reconnaissance s'adresse également à mes parents et à mes proches qui ont du supporter mes écarts de rythme de vie et d'humeur et qui m'ont toujours soutenu et encouragé, même dans les périodes les plus difficiles.

Enfin, je remercie les membres du jury ainsi que les rapporteurs qui ont accepté de me faire partager leurs conseils et leur réflexion sur ce travail.

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Schéma général d'une succession végétale en milieu tempéré (p17)

Figure 1.2. Représentation schématique des conditions d'intervention des modes d'action et des effets des sélections r et K (p22)

Figure 1.3. Triangle des principales stratégies végétales (p23)

Figure 1.4. Représentation des caractéristiques générales d'une succession végétale et de ses facteurs d'influence (p25)

Figure 2.1. Processus basiques de sorption/désorption des éléments métalliques aux interfaces solide/liquide (p33)

Figure 2.2. Mécanismes d'absorption, de translocation et de séquestration du cadmium chez une plante supérieure (p35)

Figure 2.3. Mécanisme d'Eigen-Tamm intervenant dans les processus de complexation et de chélation (p38)

Figure 2.4. Schéma d'une métallothionéine complexant sept atomes de zinc (p39)

Figure 2.5. Structure d'une phytochélatine (p41)

Figure 2.6. Modèle tridimensionnel d'une PC synthase (p42)

Figure 2.7. Chélation du cadmium par des PCs synthétisées *in vitro* (p43)

Figure 2.8. Schéma de la synthèse et du devenir des phytochélatines chez les végétaux (p44)

Figure 2.9. Formules developpées des acides citrique, oxalique et malique (p46)

Figure 2.10. Effets des métaux sur la biosynthèse des tétrapyrroles (p48)

Figure 2.11. Cibles des métaux lourds au niveau du cycle de Calvin (p50)

Figure 2.12. Possibles interactions métalliques lors du développement des plantes (p51)

Figure 2.13. Mécanismes conduisant à la génération de radicaux libres au niveau des peroxysomes des tissus végétaux (p58)

Figure 2.14. Modèle expliquant la relation entre ROS et MCP (p60)

Figure 2.15. Réponse du système antioxydant durant une réponse d'hypersensibilité (p61)

Figure 2.16. Représentation de la production et des voies de destruction des espèces réactives de l'oxygène dans les tissus végétaux (p68)

Figure 2.17. Modèle de dégradation des protéines oxydées (p69)

Figure 3.1. Localization of pilot area and the two transects T1 and T2 and zones (p97)

Figure 3.2. Proportion of life forms in the different zones of the two transects, expressed as % of the total species (p103)

Figure 3.3. Biochemical responses in the leaves of the five species collected in the Homécourt wasteland succession zones (p106)

Figure 4.1. Values of Sorensen's coefficient of similarity (p127)

Figure 4.2. Representation of plant life-forms in plots and seed-banks (p127)

Figure 4.3. Details of vegetation composition of seed-banks and plots by plant families (p128)

Figure 4.4. Richness (S), Shannon-Weaver diversity (H') and Pielou equitability (J) indexes determined for each treatment at the end of the experiment (p129)

Figure 4.5. Densities of each species in seed-banks and plots expressed as means ± standard errors (p130)

Figure 4.6. Emergence rates (ER) of all species determined at the end of the experiments and expressed as means ± standard errors (p130)

Figure 4.7. Plant height (A) and biomass (B) of individuals taken from the seed-banks and plots (p131)

Figure 4.8. Biochemical responses in the leaves of the five species collected from seed-banks and wasteland-plots (p133)

Figure 5.1. Proportions (in %) of each plant family in the communities described in the control (A) and polluted (B) areas (p154)

Figure 5.2. Biological responses of the three selected species (p155)

Figure 5.3. Biochemical responses of the plants taken in the contaminated area (p156)

Figure 6.1. Average proportions (in %) of each plant family in the communities described in the control (A) and polluted (B) areas in June 2007 (p174)

Figure 6.2. Biological responses of the three selected species (p175)

Figure 6.3. Biochemical responses of the plants taken in the contaminated area (p175)

Figure 7.1. Effects of seeds origin (#) and exposure soils (*) on the post-germination processes in *A. capillaris* assessed by Student's *t*-test ($p<0.05$) (p190)

Figure 7.2. Effects of seeds origin (#) and exposure soils (*) on the post-germination processes in *E. canadensis* assessed by Student's *t*-test ($p<0.05$) (p191)

Figure 7.3. Effects of seeds origin (#) and exposure soils (*) on the post-germination processes in *M. alba* assessed by Student's *t*-test ($p<0.05$) (p192)

Figure 7.4. Effects of seeds origin (#) and destination soils (*) on the post-germination processes in *O. biennis* assessed by Student's *t*-test ($p<0.05$) (p193)

Figure 8.1. Seed germination 28 days after sowing of the five species exposed to seven wasteland soil samples (p205)

Figure 8.2. Shoot growth 28 days after sowing of the five species exposed to wasteland soil samples (p206)

Figure 8.3. Seed germination 28 days after sowing of the five wasteland plant species exposed to a Cd-spiked soil (p207)

Figure 8.4. Shoot growth 28 days after sowing of the five wasteland plant species exposed to a Cd-spiked soil (p208)

Figure 9.1. Germination rates of all species determined at the end of the experiments and expressed as means ± standard errors of 3 replicates (p225)

Figure 9.2. Plant height and biomass of *C. pratensis*, *M. arvensis* (n=5), *H. perforatum* (n=4), *A. vulgaris* and *T. vulgare* (n=3) measured at the end of the experiment (p226)

Figure 9.3. Chlorophyll fluorescence of *C. pratensis*, *M. arvensis* (n=5), *H. perforatum* (n=4), *A. vulgaris* and *T. vulgare* (n=3) measured at the end of the experiment (p227)

Figure 9.4. Biochemical responses in the leaves of the five species collected from the different racks (p229)

Figure 10.1. Comparaison des premiers stades de colonisation végétale d'un sol industriel au schéma classique de succession végétale en milieu ouvert de zone tempérée (p243)

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1. Classification des facteurs écologiques (p13)

Tableau 1.2. Exemples de relevés de végétation effectués sur des sites contaminés (p14)

Tableau 2.1. Concentrations environnementales en métaux lourds (p32)

Tableau 2.2. Cibles des métaux au sein des chaînes de la réaction lumineuse de la photosynthèse (p49)

Tableau 2.3. Structures ou réactions mitochondriales sensibles à l'action des métaux (p53)

Tableau 2.4. Réponses antioxydantes et dommages oxydatifs observés chez des plantes en conditions de stress métallique (p72)

Tableau 2.5. Réponses antioxydantes et dommages oxydatifs observés chez des plantes exposées à des milieux contaminés en éléments métalliques (p73)

Table 3.1. Physico-chemical characteristics of soil samples from zones 0 to 6 (p97)

Table 3.2. Concentrations (mg/kg dw) of the major pollutants of soil samples from zones 0 to 6 (p98)

Table 3.3. Phytosociological table containing species occurrence (Braun-Blanquet indices) on each zone of the Homécourt wasteland (p102)

Table 3.4. Richness (S), Shannon-Weaver diversity (H') and Pielou equitability (J) indices determined for each zone (p103)

Table 3.5. Correlation coefficients between ecological indices and pollutant concentrations in soils (p104)

Table 3.6. Correlation coefficients between species abundances and heavy metal concentrations in soils (p105)

Table 4.1. Physico-chemical properties of the Homecourt coke-factory soil (p121)

Table 4.2. Recommendations about seed bank sample sizes from the literature (p122)

Table 4.3. Differences in species composition between the seed-bank and the expressed vegetation within plots (p126)

Table 5.1. Physico-chemical properties of the control and contaminated soils expressed as min-max of 4 values (p148)

Table 5.2. Phytosociological table containing species occurrence (as Braun-Blanquet indexes) and ecological indexes (p153)

Table 6.1. Physico-chemical properties of the control and contaminated soils expressed as min-max of 4 values (p169)

Table 6.2. Phytosociological table containing average species occurrences (as Braun-Blanquet indexes) in control and polluted area (p171)

Table 6.3. Ecological indexes determined for the control and polluted areas (p173)

Table 7.1. Physico-chemical properties of the control (CT), treated (NM-TD) and untreated (NM-100%) soils expressed as min-max of 4 values (p187)

Table 7.2. A two-way ANOVA of the effects of seeds origin (O) and exposure soils (D) and their interactions on post-germination processes of the four studied species (p189)

Table 8.1. Plant species used for acute toxicity tests (p202)

Table 8.2. Pollutant concentrations in soil samples 1 to 7 (p203)

Table 8.3. Forward stepwise multiple regression results with germination and growth as dependant variables and pollutant concentrations as independent variables (p207)

Table 8.4. Lowest-observed adverse effect concentrations (LOEC) and median effective concentrations (IC_{50}) for germination and shoot growth for the five plant species (p208)

Table 8.5. Pearson linear correlation factors between the two toxicological endpoints (germination, shoot growth) and Cd concentrations (p209)

Table 8.6. Literature data relative to Cd toxicity on higher plants (p210)

Table 8.7. $HC_{5\%}$ values of Cd (mg/kg soil) calculated from literature data and results of the present study (p212)

Table 9.1. Physico-chemical properties of the treated (NM-DT) and untreated (NM-100%) soils expressed as min-max of 4 values (p221)

Table 9.2. Species used for toxicity testings (p222)

Table 9.3. Species richness (S), Shannon-Weaver diversity (H'), Pielou equitability (J) indexes and total richness (Q) and total aerial biomass determined for each treatment at the end of the experiment (p224)

LISTE DES ABREVIATIONS

APX : Ascorbate Peroxydase
ASC: Ascorbate
BSO : L-buthionine-[S,R]-sulphoximine
CAT : Catalase
Chl a/b : ratio chlorophylle a / chlorophylle b
ERO/ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène
GPX : Gaïacol Peroxydase
GRD : Glutathion Réductase
GSH : Glutathion
HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HMW-PC : Phytochélatine de haut poids moléculaire
LMW-PC : Phytochélatine de faible poids moléculaire
HSP : Protéines de choc thermique
MDA : Malondialdéhyde
MCP : Mort Cellulaire Programmée
MT : Métallothionéines
PC : Phytochélatine
PSI : Photosystème I
PSII : Photosystème II
SOD : Superoxide Dismutase
UQ : Forme oxydée du coenzyme Q
XOD : Xanthine oxydase

RESUME

Nous avons étudié la colonisation végétale de sols de friches industrielles pollués par des hydrocarbures aromatiques polycycliques et des métaux lourds. Différentes approches ont été choisies dans le but de caractériser les premières étapes de la dynamique successionnelle végétale mais aussi de cerner les mécanismes cellulaires impliqués dans le phénomène de tolérance des plantes aux polluants.

Des expérimentations en parcelles utilisant le sol de l'ancienne cokerie de Neuves-Maisons ont permis de mettre en évidence l'importance des banques de graines des sols et des pluies de graines dans l'établissement d'une communauté pionnière sur sol pollué. Le suivi de la flore des parcelles a permis d'établir que la communauté pionnière, constituée de plantes annuelles et bisannuelles lors de la première année, est progressivement colonisée par les plantes pérennes et clonales dominant majoritairement lors de la seconde année. Par ailleurs, la comparaison de communautés se développant sur des sols témoin et pollué suggère une phytotoxicité du sol industriel conduisant à des pertes de richesse et diversité spécifiques. Néanmoins, ces différences semblent s'estomper au fur et à mesure du processus de colonisation. Chez les plantes qui parviennent à survivre et croître sur sol pollué, les réponses anti-oxydantes sont sollicitées, confortant l'hypothèse de leur rôle crucial dans le succès colonisateur des espèces étudiées. Toutefois, nous avons montré également que le succès de la colonisation pouvait résider également dans une production de graines plus tolérantes vis-à-vis de la contamination.

Par ailleurs, l'analyse de transects au sein même de la friche industrielle d'Homécourt, site d'une ancienne cokerie, a apporté des éléments de réponse supplémentaires. Les résultats font apparaître une relation entre les descripteurs des communautés (richesse spécifique et indice de diversité de Shannon-Weaver) et les concentrations en Cd et Hg du sol. Par ailleurs, chez les espèces présentes le long des transects (*Arrhenaterum elatius*, *Euphorbia cyparissias* ou *Tanacetum vulgare)*, les mesures des défenses antioxydantes et des teneurs en phytochélatines attestent d'un stress lié à l'exposition métallique. Toutefois, l'abondance de ces espèces ne s'est pas révélée être liée aux niveaux de contamination du sol. Il en résulte de des perspectives intéressantes en ce qui concerne les applications environnementales de ces résultats.

Mots clés : colonisation végétale, sols pollués, métaux lourds, biodiversité, phytochélatines, enzymes antioxydantes

ABSTRACT

We studied the revegetation of an industrial wasteland soil polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals. Different approaches were chosen in order to characterize the first steps of a plant succession and to elucidate the cellular mechanisms involved in plant metal tolerance.

Experiments on plots filled with a soil collected from the former coke factory site of Neuves-Maisons (54, France) highlighted the importance of soil seed banks and seed rains in the establishment of a pioneer community on a polluted soil. The study of the plots flora allowed us to prove that the pioneer community, essentially composed of annuals and bi-annuals during the first year, was gradually colonized by perennials and clonal plants which dominated the second successionnal year. In addition, the comparison of communities established on control and polluted soil suggested a soil phytotoxicity leading to losses of species richness and diversity. Nevertheless, such differences seemed to decrease progressively during the succession process. At last, in the species that survived and grew in the polluted soil, leaf antioxidant enzymes responded, confirming their putative crucial role in the colonization success of these species. However, we showed that this success could also be due to a production of seeds more tolerant toward soil contaminants.

Moreover, the study of transects in the industrial wasteland of Homecourt (54, France), a former coke factory site, gave supplementary data, highlighting the relationship between community descriptors (species richness, Shannon-Weaver's diversity indice) and soil Cd and Hg concentrations. Moreover, for the species present along the transects (*Arrhenaterum elatius*, *Euphorbia cyparissias* or *Tanacetum vulgare*), the measurements of antioxidants defences and phytochelatin levels revealed a metallic stress. Nevertheless, the abundance of the species was not related to soil pollutant concentrations. The possible environmental applications of these results will be also discussed.

Keywords: plant colonization, polluted soils, heavy metals, biodiversity, phytochelatins, antioxidant enzymes

TABLE DES MATIERES

Avant-Propos …… ii
Liste des figures ……... iv
Liste des tableaux …… vii
Liste des abréviations ……... ix
Résumé …….. x
Abstract …… xi

INTRODUCTION ……... **1**
Contexte sociétal ……..... 2
Contexte scientifique ……...…. 4
Présentation de l'étude ……..... 6
Organisation du manuscrit ……...… 7
Références ……...……. 8

1ère PARTIE : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE ……. 10

CHAPITRE 1 – CAPACITE D'ADAPTATION DES VEGETAUX AUX STRESS ENVIRONNEMENTAUX ET DYNAMIQUE SUCCESSIONNELLE ……... **11**
I-) Origine et évolution des successions écologiques …… 12
I-1) Possibles origines d'une succession écologique …… 12
I-2) Facteurs influençant les successions écologiques …….. 12
I-2-1-) Influence des facteurs abiotiques ……...… 13
I-2-2-) Influence des facteurs biotiques ……. 15
I-3-) Evolution d'une succession écologique en zone tempérée …….. 15
I-3-1-) Composition des communautés : notions de dominance et diversité …… 16
I-3-2-) Structure génétique des populations et dominance des formes clonales …18
I-4-) Mécanismes de recrutement lors d'une succession …….. 19
I-4-1-) Rôle des banques de graines du sol …… 19
I-4-2-) Longévité des graines et germination ……. 20
II-) Stratégies adaptatives et démographiques des espèces végétales ……...…… 20
II-1-) Stratégies d'adaptation et modèles démographiques ……... 20
II-1-1-) Fitness et flexibilité environnementale : plasticité et adaptation ……..... 21
II-1-2-) Stratégies adaptatives et démographiques ……..… 22
II-2-) L'allocation des ressources …… 24
Références …….. 26

CHAPITRE 2 – MECANISMES D'ACTION TOXIQUE DES METAUX LOURDS CHEZ LES VEGETAUX SUPERIEURS ……... **31**
I-) Absorption, distribution et accumulation des métaux par les plantes ….…… 34
I-1) Mécanismes d'absorption des métaux par les plantes ……..…… 34
I-2-) Transport et distribution des métaux au sein de la plante ……. 36

I-3-) Capacité d'accumulation des métaux par les plantes ……...… 37
I-4-) Mécanismes de chélation et de complexation des éléments métalliques chez les plantes ……...… 38
I-4-1-) Mécanismes de complexation et chélation ……... 38
I-4-2-) Différents types de ligands ……... 38
I-4-2-1-) Les métallothionéines et molécules apparentées ……..... 39
I-4-2-2-) Les phytochélatines et thiols apparentés ……... 40
I-4-2-3-) Cas des acides organiques …… 45
I-4-2-4-) Les acides aminés …….. 46
II-) Phytotoxicité des métaux lourds ….…… 47
I-1) Effets directs sur la physiologie de la plante …… 47
II-1-1-) Métabolisme des tétrapyrroles et photosynthèse ……..... 47
II-1-1-1-) Effets sur la biosynthèse des tétrapyrroles …..…… 47
II-1-1-2-) Effets sur les photosystèmes ……..…….. 49
II-1-1-3-) Effets sur le cycle de Calvin ……..…….. 50
II-1-2-) Effets sur le développement des plantes ……...…… 51
II-1-3-) Effets sur la reproduction des plantes ……... 52
II-1-4-) Autres effets directs …….. 52
II-1-4-1-) Effets sur les relations hydriques et la nutrition ……... 53
II-1-4-2-) Effets sur la respiration mitochondriale ……... 53
II-1-4-3-) Effets sur la structure des chloroplastes ……... 53
II-1-4-4-) Effets génotoxiques …….. 54
II-2-) Effets indirects : phytotoxicité oxidative …… 54
II-2-1-) Production des espèces réactives de l'oxygène au niveau cellulaire …… 54
II-2-1-1-) Réduction de l'oxygène moléculaire et formation des espèces réactives …… 55
II-2-1-2-) Sites de production des espèces réactives …… 56
II-2-2-) Rôles physiologiques des ERO …… 59
II-2-2-1-) Rôle dans la transduction des signaux …… 59
II-2-2-2-) Cas des réponses d'hypersensibilité …… 61
II-2-2-3-) Autres interventions …… 62
II-2-3-) Le réseau antioxydant …….. 63
II-2-3-1-) Mode d'action du réseau antioxydant …….. 63
II-2-3-2-) Les composantes du réseau antioxydant …….. 64
II-2-4-) Conséquences du stress oxydant …….. 68
II-2-4-1-) La peroxydation lipidique …… 68
II-2-4-2-) Les dommages à l'ADN …….. 69
II-2-4-3-) Les dommages aux protéines ……... 69
II-2-4-4-) Production de protéines de choc thermique …… 69
Conclusion ….……...…… 70
Références ….…… 74

2ème PARTIE : RESULTATS EXPERIMENTAUX …….. 91

CHAPITRE 3 – PREMIERE APPROCHE : ETUDE DE COMMUNAUTES VEGETALES LE LONG DE GRADIENTS DE POLLUTION ……...…….. **92**
Abstract ….…… 93
I-) Introduction ….…… 94
II-) Materials and methods ….……...……...…… 96
II-1-) Site description and physico-chemical properties ……...… 96

II-2-) Ecological analyses ……. 99
II-3-) Biochemical analyses …….. 99
II-4-) Data analyses ……. 100
III-) Results …… 101
IV-) Discussion …… 107
V-) Conclusion ..…… 111
VI-) Acknowledgements ..…… 111
VII-) References ..…… 112

CHAPITRE 4 – SECONDE APPROCHE : ROLES DES BANQUES DE GRAINES ET SYSTEMES DE DEFENSE CELLULAIRE DANS LA COLONISATION VEGETALE D'UN SOL POLLUE ……. **117**
Abstract ……..…118
I-) Introduction ……. 119
II-) Materials and methods ……..…….. 121
II-1-) Site description and physico-chemical properties ……..…..... 121
II-2-) Seed-bank sampling …..……..…… 122
II-3-) Ecological analyses ……... 122
II-4-) Biochemical analyses ……..... 123
II-5-) Data analyses ……. 125
III-) Results ……..…….. 125
IV-) Discussion …...……..…… 132
V-) Conclusion ..……..…… 136
VI-) Acknowledgements ..……. ……..…… 137
VII-) References ..……..……..…… 137

CHAPITRE 5 – TROISIEME APPROCHE : 1-COLONISATION VEGETALE D'UN SOL DE COKERIE : ROLE DES ENZYMES ANTIOXYDANTES ……..….. **143**
Abstract ……..…144
I-) Introduction ……. 145
II-) Materials and methods ……..…….. 147
II-1-) Site description and physico-chemical properties ……..…..... 147
II-2-) Ecological analyses ……... 149
II-3-) Biochemical analyses ……..... 149
II-4-) Data analyses ……. 151
III-) Results ……..…….. 152
IV-) Discussion …...……..…… 156
V-) Conclusion ..……..…… 159
VI-) Acknowledgements ..……. ……..…… 159
VII-) References ..……..……..…… 160

CHAPITRE 6 – TROISIEME APPROCHE : 2- SUCCESSION VEGETALE SUR SOL POLLUE : ROLE DES SYSTEMES ANTIOXYDANTS ……..……. **164**
Abstract ……..…165
I-) Introduction ……. 166
II-) Materials and methods ……..…….. 167
II-1-) Site description and physico-chemical properties ……..…..... 167

II-2-) Ecological analyses ……... 168
II-3-) Biochemical analyses ……..... 170
II-4-) Data analyses ……. 170
III-) Results …….. 170
IV-) Discussion …...……...…… 176
V-) Conclusion ...……...…… 179
VI-) Acknowledgements ...……. ……...…… 180
VII-) References ...……...……...…… 180

CHAPITRE 7 – TROISIEME APPROCHE : 2- EFFETS DE LA POLLUTION D'UN SOL SUR LES PROCESSUS POST-GERMINATIFS : CONSEQUENCES SUR LE RECRUTEMENT DES COMMUNAUTES ……..……..……...…….. **183**
Abstract ….……..…184
I-) Introduction ….…….…….. 185
II-) Materials and methods ….……...….……...…….. 186
II-1-) Seed collection ……...……... 186
II-2-) Soil sampling and physico-chemical analyses …….……...…..... 186
II-3-) Experimental design ……...……... 187
II-4-) Measurements ……..... 187
II-5-) Data analyses ……. 187
III-) Results …….. 189
IV-) Discussion …...……...…… 193
V-) Conclusion ...……...…… 195
VI-) Acknowledgements ...……. ……...…… 195
VII-) References ...……...……...…… 196

3ème PARTIE : APPLICATIONS ECOTOXICOLOGIQUES …...…… 198

CHAPITRE 8 – EVALUATION DE LA TOXICITE D'UN SOL A L'AIDE DE PLANTES SAUVAGES : APPROCHE PRELIMINAIRE ……..…….……...…….. **199**
Abstract ….……..…200
I-) Introduction ….…….…….. 201
II-) Materials and methods ….……...….……...…….. 202
II-1-) Biological Material ….……... 202
II-2-) Soil samples …… …….……...…..... 202
II-3-) Cd-spiked soil ……..…...……... 203
II-4-) Acute toxicity tests ……..... 204
II-4-) Data analyses ……. 204
III-) Results …….. 205
IV-) Discussion …...……...…… 209
V-) Conclusion ...……...…… 212
VI-) Acknowledgements ...……. ……...…… 213
VII-) References ...……...……...…… 213

CHAPITRE 9 – EVALUATION DE LA FONCTION D'HABITAT D'UN SOL DE COKERIE TRAITE PAR DESORPTION THERMIQUE ……..……...…...…….. **217**
Abstract ….……..…218
I-) Introduction ….…….…….. 219
II-) Materials and methods ….……...….……...…….. 220
II-1-) Soil samples …… …….……...…..... 220
II-2-) Experimental design ....…...……... 222
II-3-) Ecological analyses …...……..... 222
II-4-) Biochemical analyses …….... 223
II-5-) Data analyses ……. 223
III-) Results …….…….. 223
IV-) Discussion …...……...…… 228
V-) Conclusion ...……...…… 233
VI-) Acknowledgements ...……. ……...…… 233
VII-) References ...……...……...…… 233

4ème PARTIE : DISCUSSION & CONCLUSION ……...…….. 239

CHAPITRE 10 – DISCUSSION GENERALE ……..…….…….. **240**
I-) Processus de colonisation végétale d'un sol contaminé……. 241
I-1) Influence des banques et pluies de graines sur la composition floristique …..… 241
I-2) Influence de la pollution sur le processus séquentiel de colonisation ……. 242
I-3-) Possibles conséquences à moyen et long terme ……. 245
II-) Implication des systèmes de défense cellulaire ……..…...…… 246
II-1-) Production de phytochélatines ……..... 248
II-2-) Stress oxydant et cytotoxicité ……..……. 248
III-) Perspectives pratiques : possibles applications en écotoxicologie appliquée …..… 250
III-1-) Amélioration des tests écotoxicologiques normalisés …...……..... 250
III-2-) Sélection d'espèces à des fins de remédiation de sols pollués ……. 252
Références ……...…. 254

CONCLUSION ET PERSPECTIVES …….. **259**

AUTRES CONTRIBUTIONS ……...… **262**

ANNEXES …… **263**

INTRODUCTION

Contexte sociétal

Dans le contexte actuel d'urbanisation, des formes d'aménagement du territoire innovatrices sont développées pour s'inscrire à l'intérieur du concept de ville viable (Lecomte, 1998). Cependant, les traces du passé subsistent et posent des contraintes de planification aux autorités publiques locales. On rencontre, par exemple, dans la majorité des grandes villes des pays développés, des espaces industriels désaffectés, qui représentent un fardeau pour les municipalités qui n'arrivent pas à les rentabiliser ou un potentiel pour celles qui entrevoient leur réutilisation par un réaménagement visant à recouvrir leur valeur sociale et économique (Dumesnil et Ouellet, 2002).

Ces espaces déstructurés, héritage du déclin de certaines activités industrielles, sont identifiés par le terme « friches industrielles » (Dumesnil et Ouellet, 2002). De manière générale, les friches industrielles sont « des propriétés abandonnées ou sous-exploitées où les actions du passé ont causé une contamination de l'environnement mais qui pourraient toutefois se prêter à d'autres vocations (ou être améliorées) et qui offrent des occasions d'affaires rentables. » (Secrétariat du Conseil du Trésor du Canada, 1998).

Les données sur le nombre exact de friches industrielles présentes dans les pays développés ne sont pas disponibles actuellement. Celles qui existent sont des estimations plutôt que le résultat d'un inventaire méticuleux (Dumesnil et Ouellet, 2002). Ainsi, le recensement des sites pollués en France fait apparaître qu'existent des situations considérées comme potentiellement « à risque » pour l'environnement avoisinant et la santé humaine.

De fait, la base de données BASOL, mise en place en 1999 par le Ministère chargé de l'environnement, dénombrait en juin 2006, 3819 sites pollués appelant une action des pouvoirs publics. La Région Lorraine est très concernée par ce problème du fait de son passé minier et industriel important (Ministère de l'Environnement et du Développement durable, 2003). Avec 288 sites (soit 7,5% du total français), elle se place en quatrième position au niveau national derrière la région Rhône-Alpes (540 sites), la région Nord Pas-de-Calais (518 sites) et l'Ile de France (376 sites).

Ce recensement national précisait également que seulement 480 de ces sites présentaient des pollutions résiduelles telles qu'aucune surveillance n'était exigée. Au contraire, 3250 sites présentaient des pollutions avérées nécessitant l'engagement d'actions de dépollution. Les principaux polluants alors constatés, seuls ou en mélange, sur l'ensemble de

ces sites étaient des hydrocarbures (40%), des HAP (17%), du plomb (17%), du chrome (15%), des solvants halogénés (14%), du cuivre (14%), de l'arsenic (12%), du zinc (10%), du nickel (10%) et du cadmium (6%).

Les réaménagements de ces sites nécessitent donc la mise en place de plans de gestion à long terme qui dépendent étroitement de la situation rencontrée et pouvant impliquer la mise en oeuvre de différentes techniques de dépollution, de confinement ou d'inertage : traitements physico-chimiques (venting, lavage des sols, stripping, confinement par géomembranes, détournements hydrauliques…), thermiques (incinération, gazéification et post-combustion, désorption thermique, vitrification…) ou biologiques (biolixiviation, bioventing, bioremédiation…). Dans une logique de développement durable, il n'apparaît pas toujours souhaitable d'excaver des terres polluées présentes sur un site. Un projet de réhabilitation abouti peut donc consister à définir des usages ou des configurations d'aménagement qui, combinées à des actions sur les voies de transfert, conduisent à laisser (à des niveaux acceptables et selon les usages), traiter ou confiner des pollutions en place. Enfin, lorsque les pollutions des milieux sont diffuses et les niveaux des polluants stabilisés ou en régression, des options de gestion reposants sur la régénération et l'atténuation naturelle sont envisageables (Legrand, 2006).

Ainsi l'ensemble des démarches proposées pour la réhabilitation des sites repose sur un processus itératif entre la connaissance des milieux (et les ressources naturelles à protéger), les contraintes réglementaires, les mesures de maîtrise des sources de pollution et de leurs impacts, les différentes mesures de gestion envisagées ci-dessus (et leurs conséquences potentielles) mais aussi le contrôle et le suivi de l'efficacité de ces mesures.

La gestion de tels sites dépend donc étroitement d'études destinées à caractériser au mieux la pollution en place et son évolution à long terme et à évaluer les possibilités de restauration écologique. Ce suivi peut comporter différents aspects, parmi lesquels se distinguent des évaluations physico-chimiques et/ou biologiques. Ainsi, une identification et une quantification des contaminants, associées à une démarche de modélisation du transport, sont parfois entreprises. Le volet biologique, quant à lui, peut comporter une étude microbiologique (diversité de la microflore du sol) ainsi qu'une évaluation écotoxicologique. Plus rarement, un suivi de la flore (phytoécologie) et de la faune (démoécologie) peut être mis en place afin d'évaluer, à long terme, les possibilités de restauration de la biodiversité (Echaubard, 1995 ; Ramade, 2003).

De fait, le développement de nouvelles méthodes d'analyse et de traitement, mais aussi l'approfondissement de nos connaissances concernant les interactions

organismes/polluants, quel que soit l'échelle d'observation biologique choisie (cellule, individu, population, communauté), doivent avoir une place particulière au sein des politiques de recherche et de gestion locales et nationales. Dans ce but, la Région Lorraine s'est investie en soutenant le G.I.S. « Friches Industrielles » (GISFI) un groupe d'intérêt scientifique spécialement constitué autour de cette thématique des sites pollués.

Au sein du GISFI, le laboratoire LIEBE de l'Université Paul Verlaine-Metz (UMR CNRS 7146) a initié, sous l'initiative de Jean-François Masfaraud, Maître de Conférences, des recherches sur les plantes colonisant spontanément les friches. L'intérêt de ces travaux réside dans l'évaluation de la fonction d'habitat des sols pollués, sachant que la présence d'un couvert végétal est, en terme de risques, un facteur à considérer puisque limitant l'envol de particules et l'infiltration d'eau vers le sous-sol (Vangronsveld *et al*., 1996). Sur un plan fondamental, il est intéressant de comprendre comment une pression de sélection particulière, exercée par la pollution, se répercute sur la structure des communautés qui s'établissent et selon quels mécanismes.

Contexte scientifique

Le phénomène de tolérance des plantes vis-à-vis des métaux lourds a fait l'objet de nombreuses recherches. Dès le XVIème siècle, par exemple, le célèbre savant Georgius Agricola rapporte que des végétaux semblent souffrir lorsqu'ils se développent sur des sols riches en minerais tout en précisant qu'une végétation particulière s'y observe (Agricola, 1556). Bien que le concept de tolérance n'apparaisse pas encore, il remarque ainsi l'effet nocif des métaux sur une végétation dite sensible, et la relative tolérance d'une végétation plus adaptée. Dans les années 1950, la prospection de minerais de cuivre en Afrique s'est largement appuyée sur la découverte d'une petite *Poacée*, *Haumaniastrum katangense* et de deux *Lamiacées*, *Aeollanthus biformifolius* et *Becium homblei*, toutes trois confinées à des sols riches en cuivre (Brooks, 1998). Aujourd'hui, avec l'avènement de l'ère industrielle et son lot de pollutions, les observations commencent à s'étendre aux sites contaminés. Cependant, de nombreuses lacunes persistent encore.

En effet, d'une manière générale, la plupart des études réalisées sur sites industriels ne présentent que des listes de «végétaux d'intérêt » en vue d'analyses d'accumulation dans les organes aériens ou souterrains et de possibles utilisations en phytoremédiation (Pitchel *et al.*, 2000 ; Freitas *et al*., 2004 ; Remon *et al.*, 2005). Néanmoins, beaucoup d'auteurs relèvent que

les communautés végétales observées en sites industriels témoignent non seulement d'une adaptation aux perturbations d'origine anthropique mais aussi à d'autres facteurs tels que la sécheresse, associant ainsi des plantes xérophytes à des plantes rudérales, caractéristiques d'associations phytosociologiques très diverses et souvent banales (Pitchel *et al.*, 2000 ; Freitas *et al.*, 2004 ; Andreucci *et al.*, 2006).

Il est possible de caractériser la végétation des friches polluées par les métaux à l'aide de la classification de Lambinon et Auquier (1963) qui distingue deux types de plantes :

i) **les métallophytes strictes,** retrouvées uniquement sur les terrains contaminés dans une région donnée, et regroupant les espèces métallophytes absolues (e.g. *Viola calaminaria*, ou *Noccaea caerulescens*), qui se développent exclusivement sur des sols riches en métaux lourds, et les espèces métallophytes locales (*e.g. Armeria maritima*) qui peuvent également être retrouvées sur des sites non pollués de certaines régions.

ii) **les pseudométallophytes**, qui regroupent les espèces présentes à la fois sur les sols contaminés et non contaminés de la même région. Elles sont scindées en trois sous-catégories : les espèces pseudométallophytes électives ou préférentes, qui sont abondantes et présentent une plus grande vitalité sur les terrains riches en métaux lourds que sur les terrains non pollués (*e.g. Agrostis capillaris*, *Thymus pulegioides* ou *Rumex acetosa*) ; les espèces pseudométallophytes indifférentes, qui montrent un développement normal quelle que soit la concentration métallique (*e.g. Plantago lanceolata*) ; et les espèces pseudométallophytes accidentelles, qui ne se développent sur les sols pollués que de façon sporadique, et présentent souvent une plus faible vitalité.

Par ailleurs, si de grandes différences entre les communautés métallophytes persistent en fonction de l'habitat (Antonovics *et al.*, 1971), certaines associations majoritaires semblent émerger et suggèrent que la présence de métaux lourds toxiques, si elle ne constitue pas toujours le facteur prédominant du déterminisme des communautés végétales, représente tout de même un facteur limitant qui contraint les végétaux à s'adapter (Remon, 2006).

Il existe de nombreux articles portant sur l'étude des mécanismes moléculaires de la tolérance aux métaux chez certaines espèces modèles (*Arabidopsis thalliana*, *Helianthus annuus*, *Phaseolus vulgaris*) et quelques articles s'intéressant à la végétation des friches industrielles, dont les détails seront étudiés dans la première partie du manuscrit. Cependant, les réponses cellulaires et physiologiques à un stress métallique des plantes de friches industrielles sont très peu documentées.

Présentation de l'étude

Ce travail de recherche s'est inscrit en grande partie dans le programme du GISFI et fût basé sur le fait qu'un sol de friche industrielle peut présenter des concentrations en métaux ou métalloïdes telles qu'elles rendent difficile la colonisation naturelle par les végétaux (Robert, 1996 ; Bourrelier et Berthelin, 1998). Néanmoins, en dépit de forte contamination, la colonisation naturelle peut s'initier par l'intermédiaire de plantes adaptées aux conditions édaphiques et climatiques, qui vont s'installer, se développer plus ou moins bien, et pour certaines se reproduire (Bazzaz, 1996). Cette colonisation spontanée pourrait se traduire, à terme, par une restauration progressive de la diversité végétale sur les sites pollués avec, selon la phytotoxicité du sol, l'apparition de combinaisons floristiques tolérantes et spécifiques des pollutions environnementales en présence.

L'objectif principal de cette thèse est donc de comprendre le processus de reconquête par les plantes des milieux fortement altérés. Dans ce but, nous formulons l'hypothèse que la restauration de la biodiversité végétale est fondée, en partie au moins, sur des mécanismes de tolérance/défense face aux différentes formes de pollution des milieux concernés. Le caractère pionnier d'une espèce serait ainsi lié, en partie au moins, à son aptitude à se prémunir des effets susceptibles d'être engendrés par les polluants biodisponibles du sol.

De fait, notre travail a nécessité une approche multidisciplinaire réalisée directement sur la végétation spontanée d'une friche industrielle lorraine hautement contaminée par différents métaux lourds. Elle devrait contribuer à mieux comprendre :

i) l'évolution des communautés végétales en fonction du degré de pollution du milieu en nous intéressant principalement à leur composition spécifique mais aussi à certaines de leurs caractéristiques (richesse, diversité, équitabilité) et à leur productivité en terme de biomasse et d'activité photosynthétique. Cette approche permettra non seulement la mise en évidence des effets des polluants au niveau de la communauté mais aussi la discrimination des espèces sensibles et tolérantes ainsi que l'observation de stratégies d'adaptation.

ii) les mécanismes individuels, cellulaires et moléculaires, qui rendent la survie et la reproduction des organismes colonisateurs possibles malgré un environnement altéré. Ainsi, plusieurs variables impliquées dans la protection cellulaire seront caractérisées et nous rechercherons, pour certaines espèces, de possibles relations avec leurs caractéristiques individuelles (taille, biomasse) et populationnelles (abondance).

Organisation du manuscrit

Dans un premier temps, un état des connaissances sur l'ensemble des aspects de la problématique est développé selon deux volets :

i) Un volet écologique où seront abordées les causes et conséquences des successions écologiques, les différentes stratégies démographiques chez les plantes ainsi que leurs variations écologiques, physiologiques et génétiques aux premiers stades des successions ;

ii) Un volet écophysiologique traitant des stress métalliques chez les végétaux où seront abordées les notions d'absorption et de distribution des métaux dans les plantes, de chélation et de complexation, et d'effets phytotoxiques en développant particulièrement la notion de phytotoxicité oxydative.

Dans un second temps, les résultats de notre étude sont présentés en détail au travers de 7 articles organisés selon deux axes. Le premier axe développe les mécanismes écologiques et écophysiologiques mis en jeu lors du processus de recolonisation végétale de sites pollués. Les thèmes abordés successivement répondent aux objectifs suivants :

i) Déterminer les caractéristiques écologiques et physiologiques de la végétation résultant de la recolonisation de sols multicontaminés (Chapitre 3) ;

ii) Comparer les rôles respectifs des banques de graines et des pluies de graines dans le processus de recolonisation de matrices contaminées (Chapitres 4 et 7) ;

iii) Analyser les stratégies adaptatives de la tolérance métallique et notamment les réponses au stress oxydatif de plantes colonisatrices (Chapitres 5 et 6) ;

Le second axe, lui, s'intéresse à l'aspect appliqué de la thématique et la possible utilisation de nos observations et résultats de terrain. Deux approches écotoxicologiques seront alors développées avec les objectifs suivants :

iv) Estimer la sensibilité/tolérance (aux polluants présents dans les sols étudiés) de quelques plantes sélectionnées et leurs possibles utilisations en écotoxicologie et pour l'évaluation des risques (Chapitre 8) ;

v) Evaluer les effets de différentes techniques de remédiation sur la végétation de sols pollués (Chapitre 9).

Références

Agricola, G., 1556. *De Re Metallica*. Gérard Klopp (Ed.), Thionville, 556 pp.

Andreucci, F., Barbato, R., Massa, N., Berta, G., 2006. Phytosociological, phenological and photosynthetic analyses of the vegetation of a highly polluted site. *Plant Biosystems* 140, 176-189.

Antonovics, J., Bradshaw, A.D., Turner, R.G., 1971. Heavy metal tolerance in plants. *Advances in Ecological Research* 7, 1-85.

Bazzaz, F.A., 1996. *Plants in changing environments – Linking physiological, population, and community ecology*. Cambridge University Press (Eds). Cambridge, 320 pp.

Bourrelier, P.H., Berthelin, J., 1998. *Contamination des sols par les éléments en trace : les risques et leur gestion*. Tec & Doc Lavoisier (Ed.). Paris, 440 pp.

Brooks, R.R., 1998. Geobotany and hyperaccumulators. *In*: Brooks, R.R. (Ed.). *Plants that*

hyperaccumulate heavy metals. CABI Publishing, Wallingford, pp. 55-94.

Dumesnil, F., Ouellet, C., 2002. La réhabilitation des friches industrielles : un pas vers la ville viable ? *Vertigo* 3, 2-.

Echaubard, M., 1995. Impact des polluants atmosphériques sur la faune et la diversité des populations. *In* : Société d'écotoxicologie fondamentale et appliquée (Ed). *L'écotoxicologie du compartiment aérien*. SETAC Eds, pp. 211-233.

Freitas, H., Prasad, M.N.V., Pratas, J., 2004. Plant community tolerant to trace elements growing on the degraded soils of Sao Domingos mine in the south east of Portugal: environmental implications. *Environment International* 30, 65-72.

Lambinon, J., Auquier, P., 1963. La flore et la végétation des terrains calaminaires de la Wallonie septentrionale et de la Rhénanie aixoise : Types chorologiques et groupes écologiques. *Natura Mosana* 16 (4), 113-131.

Lecomte, P., 1998. *Les sites pollués : Traitement des sols et des eaux souterraines*. TEC & DOC, Lavoisier, Paris, 204 pp.

Legrand, C., 2006. *Traitement des sites et sols pollués*. Territorial Editions (Eds). Voiron, 85 pp.

Ministère de l'environnement et du développement durable, 2003. *Prévention des risques technologiques et des pollutions*. Rapport d'activité.

Pichtel, J., Kuroiwa, K., Sawyerr, H.T., 2000. Distribution of Pb, Cd and Ba in soils and plants of two contaminated sites. *Environmental Pollution* 110, 171-178.

Ramade, F., 2003. Eléments d'écologie : écologie fondamentale. Dunod (Eds). Paris, 690 pp.

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

Remon, E., 2006. Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation des friches métallurgiques : vers de nouvelles méthodes de bio-dépollution. Thèse de l'Université de Saint-Étienne, 166 pp.

Robert, M., 1996. *Le sol : interface dans l'environnement, ressource pour les développements*. Masson (Eds). Paris, 244 pp.

Secrétariat du conseil du trésor du Canada, 1998. *L'état du débat sur l'environnement et l'économie : les terrains abandonnés du Canada – Retour au vert*. Renouf Publishing (Eds). Ottawa, 22 pp.

Vangronsveld, J., Colpaer, J.V., Van Tichelen, K.K., 1996. Reclamation of bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: physiochemical and biological evaluation of the durability of soil treatment and revegetation. *Environmental Pollution* 94, 131-140.

1ère PARTIE :
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1.

CAPACITES D'ADAPTATION DES VEGETAUX AUX STRESS ENVIRONNEMENTAUX ET DYNAMIQUE SUCCESSIONNELLE

Malgré leur immuabilité apparente, les écosystèmes sont le siège de processus se traduisant par des flux de matière et d'énergie (Hollings, 1994). Une perturbation brutale ou progressive, peut rompre l'équilibre dynamique et la stabilité d'un écosystème. On va alors assister à un phénomène dénommé succession écologique (Angelier, 2002 ; Ramade, 2003). Ce phénomène peut aussi bien avoir lieu sur sol nu que sur un couvert végétal préexistant. De nombreux travaux portant sur l'étude des successions écologiques ont été menés et une liste de ceux-ci inclurait des centaines de références (White, 1979 ; Picket *et al*., 1987 ; Osbornova *et al*., 1990), présentant de nombreuses données sur la classification, les causes et les mécanismes des successions végétales.

I-) ORIGINE ET EVOLUTION DES SUCCESSIONS ECOLOGIQUES

I-1) Possibles origines d'une succession écologique

Les principaux phénomènes pouvant engendrer une succession écologique sont regroupés sous le terme de « perturbations ». Bazzaz (1983) définit une perturbation comme un changement brutal des caractéristiques d'un milieu se traduisant par la détection d'une réponse de la part des populations en présence. White (1979) classe en deux groupes distincts les différentes origines des successions écologiques :

i) les origines naturelles, regroupant les feux, les ouragans, les inondations, les glissements de terrain, les tremblements de terre ou les éruptions volcaniques ;

ii) les origines anthropiques, liées aux activités humaines, regroupant le défrichage, l'abandon de terres agricoles ou de zones industrielles, les activités minières ou pétrolières.

Ces phénomènes sont tous susceptibles d'induire une succession écologique, en agissant de manière isolée ou combinée.

I-2) Facteurs influençant les successions écologiques

Tous les facteurs écologiques, sans aucune exception, sont susceptibles, à un moment ou à un autre, de se comporter comme des facteurs limitants pour certains taxons et conditionner ainsi la présence/absence d'espèces végétales, et par voie de conséquence la

productivité primaire des écosystèmes (Ramade, 2003). Cette loi du minimum, découverte dès 1840 par Liebig, ne constitue qu'un cas particulier d'un principe plus général désigné sous le terme de loi de tolérance de Shelford (1931). Celle-ci stipule que pour tout facteur de l'environnement existe un gradient (ou intervalle de tolérance) dans lequel tout processus écologique sous la dépendance de ce facteur pourra s'effectuer ; et c'est seulement à l'intérieur de cet intervalle que la vie d'un organisme ou l'apparition d'une biocénose seront possibles.

L'étude des mécanismes d'action des facteurs écologiques (écologie factorielle) constitue une étape indispensable à la compréhension des réactions propres aux organismes, aux populations et aux communautés dans les biotopes auxquels ils sont inféodés (Chapman, 1998). Il existe plusieurs modalités de classification des facteurs écologiques dont la plus courante distingue les facteurs biotiques et abiotiques (cf. Tableau 1.1).

Facteurs abiotiques	**Facteurs climatiques** Température, lumière, hygrométrie, pluviométrie… Pollution atmosphérique, teneur en CO2 de l'air… **Facteurs physico-chimiques non climatiques** Granulométrie et composition chimique des sols… Oxygène dissous, pH de l'eau…
Facteurs biotiques	**Facteurs trophiques** Teneurs en éléments biogènes (sels minéraux) Nourriture disponible **Facteurs biotiques** Interactions intra- et interspécifiques Présence de microorganismes et phytopathogènes

Tableau 1.1. Classification des facteurs écologiques (modifiée d'après Ramade, 2003)

I-2-1-) Influence des facteurs abiotiques

De tous les facteurs abiotiques, celui qui influence le plus la taille et la structure des communautés végétales est l'humidité du sol (Vécrin *et al.*, 2007). Ainsi, un sol sec engendra l'apparition d'une communauté xérophile alors qu'un sol humide conduira à l'apparition d'une communauté hygrophile (Ramade, 2003). La lumière constitue également un facteur limitant pour les végétaux. Les espaces ouverts de début de succession seront propices aux

espèces héliophiles tandis que les milieux fermés de fin de succession permettront le développement des espèces sciaphiles (Ramade, 2003).

Enfin, la composition chimique des sols (charge en métaux lourds, teneurs en nutriments) va également influencer la composition spécifique des communautés. La teneur en nutriments d'un milieu peut influencer la fécondité des plantes via des modifications de la taille des graines. Des effets sur l'émergence, la survie, la croissance et la reproduction se feront ressentir sur trois générations en moyenne (Miao *et al*., 1991). Par ailleurs, un sol riche en métaux lourds sera colonisé par une flore métallicole (Tableau 1.2) tandis qu'un sol riche en azote sera occupé par des espèces nitrophiles (Bowman *et al*., 1995 ; Pauli *et al*., 2002).

Shallari *et al.* (1998) Site métallifère (Serpentine)		**Henner *et al.* (1999)** Site d'une ancienne cokerie et usine à gaz		**Remon *et al.* (2005)** Site d'enfouissement de déchets de fonderie	
Alyssum murale	Brassicaceae	*Daucus carota*	Apiaceae	*Daucus carota*	Apiaceae
Erysimum repandum	Brassicaceae	*Artemisia vulgaris*	Asteraceae	*Achillea millefolium*	Asteraceae
Alyssum tortuosum	Brassicaceae	*Cirsum arvensis*	Asteraceae	*Artemisia campestris*	Asteraceae
Sambucus ebulus	Caprifoliaceae	*Erigeron canadensis*	Asteraceae	*Chondrilla juncea*	Asteraceae
Hemiatia hirsuta	Caryophyllaceae	*Matricaria perforata*	Asteraceae	*Crepis foetidav*	Asteraceae
Silene gallica	Caryophyllaceae	*Sonchus oleracerus*	Asteraceae	*Hieracium pilosella*	Asteraceae
Silene italica	Caryophyllaceae	*Tanacetum vulgare*	Asteraceae	*Taraxacum*	Asteraceae
Achillea coarctata	Compositae	*Echium vulgare*	Boraginaceae	*Tragopogon dubius*	Asteraceae
Cichorium intybus	Compositae	*Diplotaxis tenuifolia*	Brassicaceae	*Arenaria serpyllifolia*	Caryophylaceae
Inula germanica	Compositae	*Sinapis arvensis*	Brassicaceae	*Cerastium glomeratum*	Caryophylaceae
Picris hieracioides	Compositae	*Sysimbrium o∏ cinale*	Brassicaceae	*Cornus sanguinea*	Cornaceae
Xeranthemum annum	Compositae	*Silene dioica*	Caryophyllaceae	*Medicago lupulina*	Fabaceae
Euphorbia myrsinites	Euphorbiaceae	*Chenopodium hybridum*	Chenopodiaceae	*Melilotus albus*	Fabaceae
Aegilops geniculata	Gramineae	*Chenopodium murale*	Chenopodiaceae	*Robinia pseudoacacia*	Fabaceae
Bromus squarrosus	Gramineae	*Hypericum perforatum*	Hypericaceae	*Hypericum perforatum*	Hypericaceae
Poa trivialis	Gramineae	*Sedum acrum*	Crassulaceae	*Thymus pulegioides*	Lamiaceae
Galamintha nepeta	Labiatae	*Sedum album*	Crassulaceae	*Plantago lanceolata*	Plantaginaceae
Teucrium polium	Labiatae	*Buddleia sp.*	Loganiaceae	*Agrostis stolonifera*	Poaceae
Marrubium peregrmum	Labiatae	*Epilobium angustifolium*	Onagraceae	*Arrenatherum elatius*	Poaceae
Trifolium arvense	Leguminosae	*Epilobium perforatum*	Onagraceae	*Dactylis glomerata*	Poaceae
Lotus omithopodioides	Leguminosae	*Papaver rhoeas*	Papaveraceae	*Elytrigia campestris*	Poaceae
Ononis spinosa	Leguminosae	*Cynodon dactylon*	Poeaceae	*Festuca ovina*	Poaceae
Epilobium dodonaei	Onagraceae	*Digitaria sanguinalis*	Poeaceae	*Poa compressa*	Poaceae
Plantago holosteum	Plantaginaceae	*Festuca rubra*	Poeaceae	*Poa pratensis*	Poaceae
Nigella arvensis	Ranunculaceae	*Poa annua*	Poeaceae	*Vulpia ciliata*	Poaceae
Consolida orientalis	Ranunculaceae	*Clematis Vitalba*	Ranunculaceae	*Rosa canina*	Rosaceae
Galium degenii	Rubiaceae	*Rubus sp.*	Rosaceae	*Sanguisorba minor*	Rosaceae
Linaria peloponnesiaca	Scrophulariaceae	*Solanum dulcamara*	Solanaceae	*Veronica arvensis*	Scrophulariaceae
Scrophulatia canina	Scrophulariaceae	*Solanum nigrum*	Solanaceae		
Verbascum blattaria	Scrophulariaceae	*Verbascum thapsus*	Verbasceae		
		Populus Tremula	Salicaceae		

Tableau 1.2. Exemples de relevés de végétation effectués sur des sites contaminés

I-2-2-) Influence des facteurs biotiques

La présence de microorganismes dans le sol est également un facteur influençant grandement les communautés végétales. Certaines espèces bactériennes et fongiques, forment des associations mycorhiziennes favorisant l'assimilation des éléments nutritifs par les plantes (Marschner et Dell, 1994 ; Joner *et al*., 2000). Au contraire, des espèces pathogènes peuvent engendrer une forte mortalité au sein des populations végétales ou réduire leur fécondité (Staskawics *et al*., 2001).

Un autre facteur influençant le processus de succession est la composition même de la communauté, en particulier la distribution des individus. Ce facteur est souvent appelé « équivalence des voisins » (Bazzaz, 1996). Par exemple, dans les interactions asymétriques, les individus faisant preuve de gigantisme absorbent des quantités de nutriments importantes dont ils privent leurs voisins (Weiner, 1985 ; 1990).

Par ailleurs, comme la diversité spécifique augmente au fur et à mesure de la succession, l'équilibre entre les compétitions intra- et interspéciques va s'inverser, les compétitions intraspécifiques dominant lors des premiers stades, les compétitions interspécifiques dans les derniers (Bazzaz, 1996).

I-3-) Evolution d'une succession écologique en zone tempérée

Lors d'une succession écologique, des espèces pionnières apparaissent au sein du biotope modifié. Ces plantes, annuelles, lichens et bryophytes, vont alors être progressivement remplacées par d'autres végétaux vivaces, puis, dans certains cas, par des espèces ligneuses (Ramade, 2003). Ces espèces de fin de succession sont appelées dryades dans certains ouvrages (Bazzaz, 1996 ; Ramade, 2003). La succession écologique se poursuivra ainsi pendant des décennies voire plusieurs siècles jusqu'à ce qu'elle atteigne son stade ultime d'évolution dénommé climax (Dajoz, 2003). Le climax désigne donc une association stable d'espèces qui caractérise qualitativement et quantitativement l'ultime phase de développement d'une biocénose dans une succession. La biomasse et la diversification des réseaux trophiques y sont maximales par unité d'énergie entrante, la capacité homéostatique par rapport aux fluctuations de l'environnement (communément appelée résilience) y est nettement supérieure à celles de toutes les autres communautés pouvant exister au cours de la succession dans le biotope considéré (Ramade, 2002 ; Schmidt *et al*., 2002). On dénomme « série » la séquence complète d'une succession. Celle-ci est caractérisée par une séquence

rigoureuse de stades dénommés « sères », comportant chacun une biocénose particulière. Ces communautés transitoires constituent les stades post-pionniers (stades de développement) de la succession, et précèdent le climax qui en présente l'ultime stade évolutif (Ramade, 2002).

I-3-1-) Composition des communautés : notions de dominance et diversité

De nombreuses études menées aux Etats-Unis (Quaterman, 1957 ; Bazzaz, 1975), au Japon (Hayashi, 1977 ; 1984) et en Europe Centrale (Osbornova *et al*., 1990) ont démontré que les successions végétales observées présentaient les mêmes tendances quant aux espèces qui dominaient les communautés aux différents stades. En fait, ces écosystèmes en régénération, malgré leurs différentes localisations géographiques, partagent certaines espèces végétales cosmopolites remplissant les mêmes rôles écologiques. Parmi ces espèces, on retrouve l'annuelle hivernale *Erigeron canadensis* ou l'espèce clonale typique des seconds stades de stades de succession *Solidago canadensis*. Ces espèces disposent de grandes capacités d'adaptation qui leur permettent de dominer ces milieux perturbés (Bazzaz, 1996).

D'une manière générale, pour l'ensemble de ces régions, il est possible de décrire une succession écologique par les espèces végétales qui vont en dominer chacune des étapes. Ainsi, Bazzaz (1996) propose un modèle de succession en zone tempérée se déclinant en cinq étapes (Figure 1.1).

Durant la première année de succession, les plantes annuelles vont dominer la communauté, en particulier les *Brassicacées* et les *Astéracées*. La majeure partie de ces espèces correspond aux adventices communément retrouvées dans les terres agricoles abandonnées ou sur le bord des routes. Parmi les espèces qui dominent à ce stade se trouvent *Ambrosia artemisiifolia*, *Chenopodium album* ou *Polygonum pensylvanicum*. La plupart de ces plantes sont directement issues des banques de semences des sols dont le rôle sera étudié par la suite (Bazzaz, 1996 ; Luzuriaga *et al*., 2005 ; Luo et Wang, 2006).

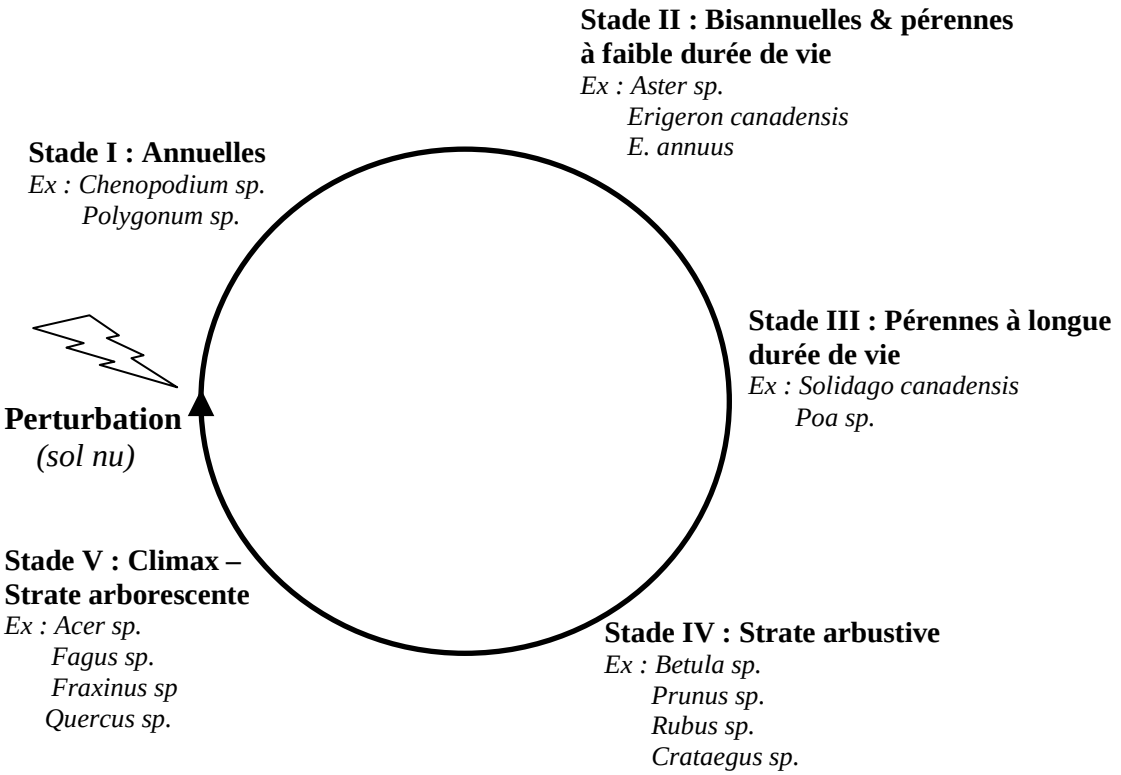


Figure 1.1. Schéma général d'une succession végétale en milieu tempéré (modifié d'après Bazzaz, 1996)

La seconde année de succession voit les communautés végétales être dominées par un mélange de plantes bisannuelles et de plantes pérennes à courte durée de vie. Très souvent, ces espèces sont déjà présentes lors de la première année mais, du fait de leur faible taux de croissance, elles ne dominent les communautés que l'année suivante. *Erigeron annuus* et *Erigeron canadensis* font partie de ces espèces. A ce stade, la compétition devient importante et les annuelles sont éliminées ou persistent par l'intermédiaire de plantules moribondes. De fait, elles ne représentent plus qu'une infime proportion de la biomasse de la communauté mais peuvent contribuer à alimenter les banques de graines (Bazzaz, 1996 ; Wiegleb et Felinks, 2001 ; Ejrnaes *et al*., 2003).

La troisième phase est principalement dominée par des plantes pérennes capables de persister pendant plusieurs années. C'est à ce stade que se multiplient les herbes clonales, en particulier les membres du genre *Solidago*. Dans nos régions, *Solidago canadensis*, la plus commune des espèces de ce genre, est même considérée comme une plante invasive. *Poa pratensis* et *Agropyron repens* font également partie des espèces les plus rencontrées à ce

stade. Ces espèces forment souvent des patches monoclonaux qui entraînent l'apparition de microenvironnements ombragés propices au développement des espèces ligneuses de fin de succession (Bazzaz, 1996 ; Wise *et al*., 2006). Dans certains cas, les espèces ligneuses sont dans l'incapacité de se développer, le climax étant alors composé essentiellement d'herbacées (Wiegleb et Felinks, 2001).

Dans la plupart des cas, les successions vont être ensuite dominées par les espèces arbustives qui ont réussi à s'implanter et se multiplier lors des stades précédents. Le plus souvent, il s'agit de l'aubépine (*Crataegus monogyna*) et des ronces (*Rubus* sp.). C'est aussi à ce stade que s'effectue la colonisation du milieu par les essences ligneuses, en particulier le bouleau (*Betula sp.*), le peuplier (*Populus sp.*), le pin (*Pinus nigra*) ou les différents membres du genre *Prunus* (Bazzaz, 1996 ; Ejrnaes *et al*., 2003).

Les sères de fin de succession seront totalement dominées par des combinaisons d'une ou plusieurs espèces ligneuses parmi lesquelles on retrouve le bouleau (*Betula sp.*), le charme (*Carpinus* sp.), les chênes (*Quercus* sp.), les érables (*Acer* sp.), le frêne (*Fraxinus* sp.), le hêtre (*Fagus* sp.) ou le peuplier (*Populus* sp.). La canopée ainsi formée peut également, dans certains cas, être colonisée par des lianes et plantes grimpantes comme les clématites (*Clematis vitalba*). Les strates inférieures, enfin, sont toujours occupées par des espèces arbustives, comme par exemple les *Ericacées* (bruyères) et les viornes (*Viburnum* sp.) (Bazzaz, 1996 ; Ejrnaes *et al*., 2003).

D'une manière générale, les stades de début et fin de succession présentent des richesses spécifiques faibles du fait i) des difficultés rencontrées par les plantes pionnières pour s'implanter dans un milieu perturbé et ii) de la forte compétition qui sévit au stade climax. Au contraire, les stades intermédiaires présentent une grande diversité à l'exception de zones envahies par des espèces clonales comme *Solidago canadensis*.

I-3-2-) Structure génétique des populations et dominance des formes clonales

Les relations entre variations génétiques et performances des populations dans leur environnement naturel sont complexes (Ayala, 1982 ; Schaal, 1985). Lors des premiers stades de succession, des pressions de sélection changent les fréquences des gènes et permettent aux génotypes les plus adaptés de dominer les populations. Par exemple, des populations végétales colonisant un sol riche en métaux lourds vont devenir, au fil des générations, tolérantes à ces derniers (Bradshaw et Hardwick, 1989). Cependant, la diversité des microhabitats colonisés par une population (métaux, nutriments, humidité, lumière, présence

de pathogènes…) permet de maintenir une certaine hétérogénéité génétique (Grubb, 1977 ; Hartgerink et Bazzaz, 1984).

Un autre phénomène influençant la structure génétique des populations est la compétition asymétrique. Il s'agit du fait que les individus les plus grands absorbent plus de ressources, conduisant à l'exclusion des plus petits ou tout du moins à une réduction de leur contribution à la banque de graines du milieu (Weiner, 1988 ; 1990).

La clonalité, enfin, est une stratégie largement utilisée par les communautés végétales lors des successions : un ortet (issu d'une graine) va se multiplier par reproduction végétative pour former de nombreux ramets (individus génétiquement identiques) (Wise *et al*., 2006). Les plantes clonales sont souvent rencontrées dans les stades de milieu de succession sous la forme d'individus appartenant aux genres *Aster*, *Rubus* et *Solidago*. Les ramets, bien que génétiquement identiques à la base, peuvent évoluer sous l'effet des contraintes rencontrées au sein des microhabitats colonisés (manque de nutriments, forte compétition inter- et intra-spécifiques). Les clones peuvent alors présenter des rhizomes ou des feuilles de tailles diverses (Bazzaz, 1996).

I-4-) Mécanismes de recrutement lors d'une succession

Le recrutement est un phénomène séquentiel qui dépend des processus pre- et post-germinatif (production et dispersion des graines, prédation, émergence et croissance) et dont le produit final est une plante viable et mâture capable de boucler son cycle de vie (Garrido *et al*. 2005 ; Li *et al*., 2005).

I-4-1-) Rôle des banques de graines du sol

Les banques de graines d'un sol correspondent à l'ensemble des semences issues des plantes présentes sur ce sol mais aussi issues de la dispersion des graines (par le vent, la pluie, les oiseaux ou les fourmis,…) provenant de sites adjacents. Cet apport de graines allochtones est communément appelé « pluie de graines ». Les banques de semences des sols sont donc en constant renouvellement, et ont un rôle écologique fondamental puisqu'elles sont impliquées dans la régénération de communautés perturbées (Templeton et Levin, 1979 ; Leck *et al*., 1989).

Du fait de la longévité des graines et en raison de variations environnementales aléatoires, les banques de graines de début de succession sont des mélanges d'espèces et de génotypes accumulés sur plusieurs générations. Ainsi, les banques constituent de véritables pools génétiques qui présentent des variabilités plus fortes que les recrutements d'une communauté observés au cours d'une saison (Parker *et al*., 1989). De fait, la communauté ne représente qu'une partie du potentiel génétique enfermé dans les banques de graines des sols.

I-4-2-) Longévité des graines et germination

Les graines de la plupart des espèces de début de succession possèdent des mécanismes de dormance divers, et leur germination pourrait même être induite par les perturbations à l'origine même de la succession (Baskin et Baskin, 1988). La plupart des semences restent viables au sein des banques de graines des sols pendant de nombreuses années (Thompson, 1992) mais cette durée de vie diffère entre les espèces d'une même communauté (Bakker, 1989).

A l'inverse, les graines des espèces de fin de succession ont souvent de courtes durées de vie (Bazzaz, 1979) : elles sont souvent consommées par des prédateurs (Crawley, 1992), tuées par des pathogènes (Roberts, 1981) ou germent rapidement (Whitmore, 1984). De fait, les banques de graines jouent un rôle moindre dans le maintien des variations génétiques en fin de succession.

II-) STRATEGIES ADAPTATIVES ET DEMOGRAPHIQUES DES ESPECES VEGETALES : EFFETS SUR LES DYNAMIQUES SUCCESSIONNELLES

II-1-) Stratégies d'adaptation et modèles démographiques

Les êtres vivants ne subissent pas de façon passive l'influence des facteurs de l'environnement. Ils présentent à des degrés variés une plasticité écologique leur permettant de s'adapter aux fluctuations temporelles et/ou spatiales des facteurs environnementaux. L'existence d'une réaction compensatrice à toute fluctuation du milieu ambiant concerne tout aussi bien l'individu isolé que la population ou la biocénose (Chapman, 1998 ; Ramade, 2003).

II-1-1-) Fitness et flexibilité environnementale : plasticité et adaptation

La flexibilité écologique des espèces résulte en partie de l'existence de mécanismes de régulation, provoquant des modifications métaboliques de nature homéostatique qui permettent aux êtres vivants de maintenir constantes et à une valeur optimale leurs conditions internes face à des fluctuations de l'environnement (Schmalhausen, 1949 ; Chapman, 1998). Globalement, le phénomène de flexibilité environnementale peut se décomposer en trois phases distinctes dont les définitions varient selon les auteurs (Bazzaz, 1996) :

(i) **l'acclimatation,** qui correspond à des ajustements graduels et réversibles des individus en réponse à des modifications rapides de l'environnement. Il peut s'agir d'une modification de la conductance stomatale en réponse à des changements de pression atmosphérique ou d'une activation rapide de la Rubisco (enzyme essentielle du processus de photosynthèse) lors d'une hausse de l'intensité lumineuse. Les plantes pionnières et opportunistes, telles que *Plantago major* ou *Setaria faberi*, présentent très souvent ce phénomène d'acclimatation, du fait de leur faible durée de vie et de leur nécessité à puiser rapidement les ressources du milieu pour atteindre aussi vite que possible leur maturité sexuelle (Bazzaz, 1996 ; Ramade, 2002).

(ii) **la plasticité phénotypique** définit, pour une espèce donnée, sa capacité à faire évoluer ses caractéristiques biochimiques, physiologiques et morphologiques en cas de fluctuations environnementales. En d'autres terme, il s'agit de la capacité d'un génotype à exprimer différents phénotypes dans des milieux aux conditions environnementales distinctes, le phénotype observé conférant alors des avantages aux organismes (Bazzaz, 1996 ; Ramade, 2002).

(iii) **l'adaptation** qui correspond au phénomène par lequel un individu, une population ou une communauté modifie génétiquement leurs structures et leurs fonctions pour vivre de façon optimale dans l'environnement (Ramade, 2002).

La valence écologique d'une espèce sera d'autant plus grande qu'elle peut supporter de grandes variations des facteurs de l'environnement. Ainsi, les espèces pionnières présentent souvent une forte valence écologique et sont dites eury-oeciques. A l'opposé, les espèces de fin de succession ont une faible valence écologique et sont dénommées sténo-oeciques (Zangerl et Bazzaz, 1983 ; Ramade, 2002).

II-1-2-) Stratégies adaptatives et démographiques

Un des caractères les plus généraux des successions écologiques tient à une substitution progressive d'espèces ayant une stratégie de quantité (croissance explosive, productrices de nombreux propagules) dans les écosystèmes pionniers à des espèces ayant une stratégie de qualité (système hautement organisé et économe en énergie) dans les écosystèmes développés (Blondel, 1979). D'une manière générale, ce changement de stratégie peut se décliner de trois manières :

a) théorie du continuum r – K de MacArthur et Wilson

En ayant recours à la terminologie propre aux lois relatives à la croissance des populations, la « sélection r » est la forme de sélection tendant à favoriser l'effort reproductif, propre aux premiers stades de la colonisation, et la « sélection K » celle basée sur l'aptitude à produire des descendants bien adaptés au milieu, dont l'importance va s'accroître au cours du processus successionnel. Il existe donc un continuum r – K à l'intérieur duquel la sélection devient de plus en plus dépendante de la densité (MacArthur et Wilson, 1967). De ce fait, les « stratèges r » et les « stratèges K » sont des espèces dont les populations possèderont un avantage sélectif respectivement dans les conditions écologiques propres à la sélection r ou à la sélection K (Figure 1.2). Néanmoins, cette théorie du continuum r – K possède ses limites car il est rare d'observer en fin de succession une communauté totalement dominée par les stratèges K.

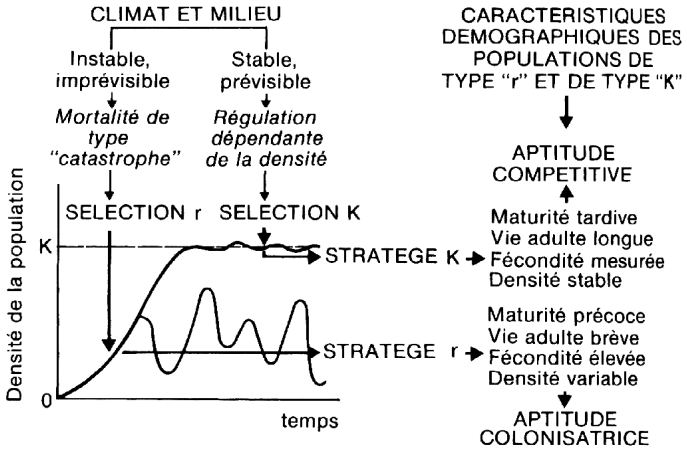


Figure 1.2. Représentation schématique des conditions d'intervention des modes d'action et des effets des sélections r et K (Ramade, 2003)

b) théorie du triangle de Grime

Grime (1979) a proposé un nouveau modèle comprenant trois stratégies (C,S,R) organisées en triangle (Figure 1.3). Les plantes seraient ainsi compétitives (C), tolérantes au stress (S) ou rudérales (R). L'avantage de ce modèle est de permettre de nombreuses combinaisons. De plus, une même espèce peut voir sa stratégie évoluer au fil du temps. Enfin, ce modèle peut être utilisé à toutes les échelles de l'écosystème, aussi bien au niveau de l'espèce que de la communauté.

Type fonctionnel	**Taille**	**Durée de vie**	**Floraison**
C	Haute	Faible	Faible
S	Faible	Haute	Faible
R	Faible	Faible	Haute
SC	Moyenne	Moyenne	Faible
SR	Faible	Moyenne	Moyenne
CR	Moyenne	Faible	Moyenne
CSR	Moyenne	Moyenne	Moyenne

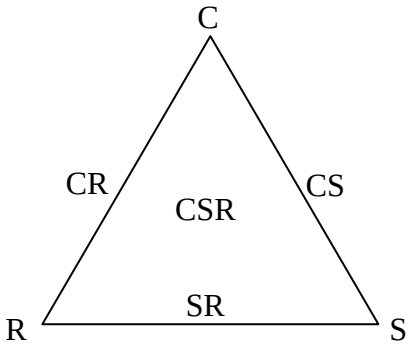


Figure 1.3. Triangle des principales stratégies végétales (modifié d'après Grime, 1979)
C : compétiteur, R : rudérale, S : tolérante au stress

c) théorie de la « sélection d'habitat » de Bazzaz

Malgré leur immobilité, les plantes seraient capables de sélectionner leurs habitats (Bazzaz, 1996). Elles auraient en effet développé des moyens de détecter et de choisir des habitats propices à leur développement. La dispersion des graines serait particulièrement importante dans ce processus. Globalement, quatre stratégies ont été proposées :

(i) une large dispersion des propagules : très utilisée par les espèces pionières qui produisent de nombreuses graines de petites tailles et très volatiles capables de coloniser de nombreux habitats ;

(ii) une dispersion ciblée vers des habitats favorables : utilisée en zoochorie par des plantes capables d'attirer des agents de dispersion qui déposeront les graines dans des habitats favorables ;

(iii) une dispersion de graines disposant de réserves, contenant les ressources essentielles à leur germination et développement ;

(iv) un développement optimisé avec des phases de dormance permettant une germination contrôlée (qui ne débutera qu'en conditions optimales) ou des élongations racinaires supérieures à la normale pour aller chercher les ressources en profondeur ou sur de grandes superficies (cas des rhizomes).

II-2-) L'allocation des ressources

Pour utiliser au maximum leurs potentialités, les plantes doivent allouer de manière optimale les ressources dont elles disposent. De fait, elles mettent en place des stratégies d'allocation énergétique influencées par les contraintes environnementales (Harper, 1967). Certaines espèces vont allouer leur énergie à la production de biomasse racinaire favorisant l'absorption d'eau et d'éléments nutritifs (Bazzaz *et al*., 1987). D'autres privilégieront leur croissance et leur biomasse aérienne (gigantisme) pour gagner en compétitivité (cf. compétition asymétrique). D'autres, enfin, alloueront leurs réserves à la reproduction (grand nombre de graines, graines disposant de réserves énergétiques…) et à l'obtention de descendants viables (Silvertown, 1987).

Conclusion

D'une manière générale, une succession écologique est un processus séquentiel qui débute par la colonisation végétale d'un sol nu pour atteindre, à plus ou moins long terme un stade climax se traduisant par une communauté pérenne dominée, le plus souvent, par les strates arbustives et arborescentes. Ce phénomène est influencé par de nombreux facteurs biotiques et abiotiques dont les actions, isolées ou combinées, vont modifier la composition et la structure des communautés (Figure 1.4).

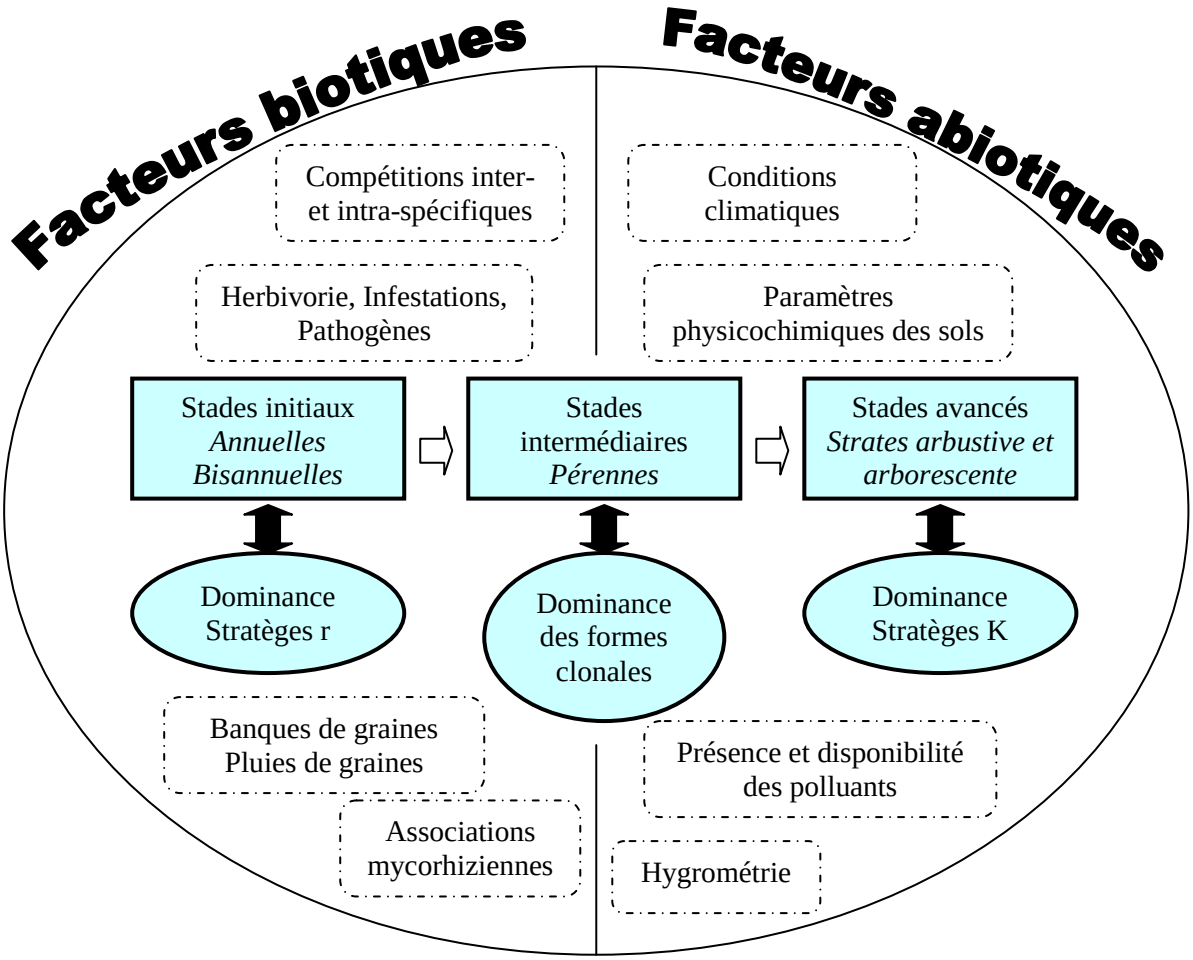


Figure 1.4. Représentation des caractéristiques générales d'une succession végétale et de ses facteurs d'influence.

Par ailleurs, l'étude des associations végétales semble être une voie privilégiée pour appréhender un milieu et les effets des facteurs abiotiques sur celui-ci. L'étude descriptive et causale de la végétation est le principe fondamental de la phytosociologie (Braun-Blanquet, 1932). La méthode préconisée consiste à réaliser des relevés floristiques selon une technique très classique, développée par Braun-Blanquet (1932). Ces relevés reposent sur l'estimation, pour chacun des taxons du relevé, de différents paramètres comme l'abondance-dominance. Si les relevés doivent en principe s'intéresser à l'ensemble du règne végétal, la plupart d'entre eux concernent uniquement les plantes supérieures produisant des graines (Spermaphytes).

Globalement, la phytosociologie peut représenter un outil puissant pour comprendre à la fois la répartition des espèces et les liens structuraux et fonctionnels qui existent entre elles,

mais elle apparaît aussi comme une science inexacte, sujette à des erreurs d'appréciation (Brooks, 1998). C'est pourquoi les approches classiques de phytosociologie sont souvent couplées à des approches démoécologiques. En effet, la réalisation de relevés phytosociologiques traditionnels permet de récolter un grand nombre d'informations qui peuvent être utilisées pour calculer un certain nombre d'indices caractéristiques de l'état de la communauté comme la richesse spécifique, la diversité de Shannon Weaver ou l'équitabilité de Piélou (Barbault, 1997 ; Dajoz, 2003). De nombreux autres indices peuvent être trouvés dans la littérature mais la plupart font preuve d'une certaine redondance avec les indices classiques cités ci-dessus.

Un certain nombre d'études se sont intéressées à la composition des communautés végétales se développant sur des sols pollués ou riches en métaux lourds (Shallari *et al*., 1998 ; Henner *et al*., 1999 ; Remon *et al*., 2005 ; Conesa *et al*., 2007) mais très peu les ont caractérisées par des approches démoécologiques. De fait, très peu d'informations sont disponibles sur la diversité et l'équitabilité de communautés végétales poussant sur sols contaminés et sur leurs possibles variations au cours des successions.

Références

Angelier, E., 2002. *Introduction à l'écologie: des écosystèmes naturels à l'écosystème humain*. Tec & Doc Eds, Paris, 230 pp.

Ayala, F., 1982. The genetic structure of species. *In*: Milkman, R. (Ed) *Perspectives in Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, MA., pp. 60-82.

Bakker, J.P., 1989. *Nature management by grazing and cutting*. Kluwer, Dordrecht, 390 pp.

Barbault, R., 1997. *Biodiversité*. Hachette Supérieur, Paris, 160 pp.

Barbault, R., 2003. *Ecologie générale : structure et fonctionnement de la biosphère*. Dunod Eds, Paris, 326 pp.

Baskin, C.C., Baskin, J.M., 1988. Germination ecophysiology of herbaceous plant species in a temperate region. *Am. J. Bot*. 75, 286-305.

Bazzaz, F.A., 1975. Plant Species Diversity in Old-Field Successional Ecosystems in Southern Illinois.*Ecology* 56, 485-488.

Bazzaz, F.A., 1979. The physiological ecology of plant succession. *Annu. Rev. Ecol. Syst*. 10, 351-371.

Bazzaz, F.A., 1983. Characteristics of populations in relation to disturbance in natural and man-modified ecosystems. *In* Mooney, H.A., Godron, M. (Eds.) *Disturbance and Ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 259-275.

Bazzaz, F.A., 1996. *Plants in changing environments: linking physiological, population and community ecology*. Cambridge University Press, Cambridge, 320 pp.

Bazzaz, F.A., Chiariello, N.R., Coley, P.D., Pitelka, L.F., 1987. Allocating resources to reproduction and defense. *Bioscience* 37, 58-67.

Blondel, J., 1979. *Biogéographie et écologie*. Masson Eds, Paris, 173 pp.

Bowman, W.D., Theodose, T.A., Fisk, M.C., 1995. Physiological and production responses of plant growth forms to increases in limiting resources in alpine tundra: implications for differential community response to environmental change. *Oecologia* 101, 217–227.

Bradshaw, A.D., Hardwick, K., 1989. Evolution and stress – genotypic and phenotypic components . *Biol. J. Linnean Soc*. 37, 137-155.

Braun-Blanquet, J., 1932. *Plant Sociology*. McGraw-Hill, New-York, 439 pp.

Brooks, R.R., 1998. Geobotany and hyperaccumulators. *In*: Brooks, R.R. (Ed.). *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 55-94.

Chapman, J.L., 1998. *Ecology : principles and applications*. Cambridge University Press, Cambridge, 336 pp.

Conesa, H.M., Garcia, G., Faz, A., Arnaldos, R., 2007. Dynamics of metal tolerant plant communities' development in mine tailings from the Cartagena-La Union Mining District (SE Spain) and their interest for further revegetation purposes. *Chemosphere* 68, 1180-1185.

Crawley, M.J., 1992. Seed predators and plant population dynamics. *In*: Fenner, M. (Ed) *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 167-182.

Dajoz, R., 2003. *Précis d'écologie*. Dunod Eds, Paris, 640 pp.

Ejrnaes, R., Hansen, D.N., Aude, E., 2003. Changing course of secondary succession in abandoned sandy fields. *Biol. Conservation* 109, 343-350.

Garrido, J.L, Rey, P.J., Herrera, C.M., 2005. Pre- and post-germination determinants of spatial variation in recruitment in the perennial herb *Helleborus foetidus* L. (*Ranunculaceae*). *J Ecol* 93, 60-66.

Grime, J.P., 1979. *Plant strategies and vegetation processes*. John Wiley (Ed), Chichester, 456 pp.

Grubb, P.J., 1977. The maintenance of species richness in plant communities: the importance of regeneration niche. *Biol. Rev*. 52, 107-145.

Harper, J.L., 1967. A Darwinian approach to plant ecology. *J. Ecol.* 55, 247-270.

Hartgerink, A.P., Bazzaz, F.A., 1984. Seedling-scale environmental heterogeneity influences individual fitness and population structure. *Ecology* 65, 198-206.

Hayashi, I., 1977. Secondary succession of herbaceous communities in Japan. *Jap. J. Ecol*. 27, 191-200.

Hayashi, I., 1984. Secondary succession of herbaceous communities in Japan: Seed production of successional dominants. *Jap. J. Ecol*. 34, 375-382.

Henner, P., Schiavon, M., Druelle, V., Lichtfouse, E., 1999. Phytotoxicity of ancient gaswork soils. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on plant germination. *Org. Geochem*. 30, 963-969.

Hollings, C.S., 1994. Simplifying the complex. The paradigms of ecological function and structure. *Futures* 26, 598-609.

Joner, E.J., Briones, R., Leyval, C., 2000. Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant Soil* 226, 227-234.

Leck, M.A., Parker, V.T., Simpson, R.L., 1989. *Ecology of soil seed banks*. Academic Press, San Diego, 462 pp.

Li, F.R., Wang, T., Zhang, A.S. et al., 2005. Wind-dispersed seed deposition patterns and seedling recruitment of *Artemisia halodendron* in a moving sandy land. *Ann. Bot.* 96, 69-80.

Luo, H., Wang, K., 2006. Soil seed bank and aboveground vegetation within hillslope vegetation restoration sites in Jinshajing hot-dry river valley. *Acta Oecologica Sinica* 26, 2432-2442.

Luzuriaga, A.L., Escudero, A., Olano, J.M., Loidi, J., 2005. Regenerative role of seed banks following an intense soil disturbance. *Acta Oecologica* 27, 57-66.

MacArthur, R.H., Wilson, E.O., 1967. *The theory of island biogeography*. Princeton University Press, Princeton, 224 pp.

Marschner, H., Dell, B., 1994. Nutrient uptake in myccorhizal symbiosis. *Plant Soil* 159, 89-102.

Miao, S.L., Bazzaz, A., Primack, R.B., 1991. Persistence of maternal nutrient effects in Plantago major: the third generation. *Ecology* 72, 1634-1642.

Osbornova, J., Kovarova, M., Leps, J., Prach, K., 1990. *Succession in abandonned fields. Studies in Central Bohemia, Czechoslovakia*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 184 pp.

Parker, V.T., Simpson, R.L., Leck, M.A., 1989. Pattern and process in the dynamics of seed banks. *In*: Leck, M.A., Parker, V.T., Simpson, R.L. (eds) *Ecology of soil seed banks*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 367-384.

Pauli, D., Peintinger, M., Schmid, B., 2002. Nutrient enrichment in calcareous fens: effects on plant species and community structure. *Basic Appl. Ecol*. 3, 255-266.

Pickett, S.T.A., Collins, S.L., Armesto, J.J., 1987. Models, mechanisms and pathways of succession. *Bot. Rev*. 53, 335-371.

Quaterman, E., 1957. Early plant succession on abandoned cropland in the Central Basin of Tennessee. *Ecology* 38, 300-309.

Ramade, F., 2002. *Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement*. Dunod Eds, Paris, 822 pp.

Ramade, F., 2003. *Eléments d'écologie : écologie fondamentale*. Dunod Eds, Paris, 690 pp.

Rameau, J.C., Mansion, D., Dume, G., 1989. *Flore forestière française : guide écologique illustré. Vol 1 : plaines et collines*. Institut pour le Développement Forestier, Paris, 1794 pp.

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

Roberts, E.H., 1981. The interaction of environmental factors controlling loss of dormancy in seeds. *Ann. Appl. Biol*. 98, 552-555.

Schaal, B.A., 1985. Genetic variation in plant populations: from demography to DNA. In: Haeck, J., Waldendorp, J.W. (Eds) *Structure and functioning of plant populations. 2. Phenotypic and genotypic variation in plant populations*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, pp. 321-341.

Schmalhausen, I.I., 1949. *Factors of evolution: the theory of stabilizing selection*. University of Chicago Press, Chicago, 327 pp.

Schmidt, R., Dokulil, M.T., Psenner, R., Wanzenböck, J., 2002. Ecological integrity: concept, assessment, evaluation: the Traunsee case. *Water Air Soil Pollut*. 2, 249-261.

Shallari, S., Schwartz, C., Hasko, A., Morel, J.L., 1998. Heavy metals in soils and plants of serpentine and industrial sites of Albania. *Sci. Total Environ*. 209, 133-142.

Shelford, V.E., 1931. Some concepts in bioecology. *Ecology* 12, 455-467.

Silvertown, J.W., 1987. *Introduction to plant population biology*. Longman (Ed), London, 256 pp.

Staskawicz, B.J., Mudgett, M.B., Dangl, J.L., Galan, J.E., 2001. Common and contrasting themes of plant and animal diseases. *Science* 292, 2285-2289.

Templeton, R.A., Levin, D.A., 1979. Evolutionary consequences of seed pools. *Am. Nat*. 114, 232-249.

Thompson, K., 1992. The functional ecology of seed banks. *In*: Fenner, M. (Eds) *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*. CAB International, Wallingford, pp. 231-258.

Vécrin, M.P., Grévilliot, F., Muller, S., 2007. The contribution of persistent soil seed banks and flooding to the restoration of alluvial meadows. *J. Nat. Conserv.* 15, 59-69.

Weiner, J., 1985. Size hierarchies in experimental populations of annual plants. *Ecology* 66, 743-752.

Weiner, J., 1988. The influence of competition on plant reproduction. *In*: Lovett-Doust, J., Lovett-Doust, L. (Eds) *Reproductive ecology of plants: patterns and strategies*. Oxford University Press, New-York, pp. 228-245.

Weiner, J., 1990. Asymmetric competition in plant populations. *Trends Ecol. Evol*. 5, 360-364.

White, P.S., 1979. Pattern, process, and natural disturbance in vegetation. *Bot. Rev.* 45: 229-299.

Whitmore, T.C., 1984. *Tropical Rain-Forests of the Far East*. Clarendon Press, Oxford, 352 pp.

Wiegleb, G., Felinks, B., 2001. Primary succession in post-mining landscapes of Lower Lusatia – chance or necessity. *Ecol. Eng*. 17, 199-217.

Wise, M.J., Abrahamson, W.G., Landis, K., 2006. Edaphic environment, gall midges, and goldenrod clonal expansion in a mid-successional old-field. *Acta Oecologica* 30, 365-373.

Zangerl, A.R., Bazzaz, F.A., 1983. Plasticity and genotopic variation in photosynthetic behaviour of an early and late successional species of Polygonum. *Oecologia* 57, 270-273.

CHAPITRE 2.

MECANISMES D'ACTION TOXIQUE DES METAUX LOURDS CHEZ LES VEGETAUX SUPERIEURS

L'établissement et l'évolution d'une communauté végétale sur un sol nu dépendent de nombreux paramètres incluant les paramètres physico-chimiques de ce même sol. De fait, toute pollution est susceptible d'entraîner à plus ou moins long terme des conséquences sur les processus de colonisation et de succession. Si la phytotoxicité des composés organiques, en particulier les HAP, est encore largement discutée, celle des métaux lourds n'est plus à démontrer (Toppi et Gabbrielli, 1999 ; Sverdrup *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2006).

Les éléments métalliques sont naturellement retrouvés dans l'environnement à des concentrations généralement faibles (Tableau 2.1.) mais celles-ci peuvent augmenter en raison d'activités minières, sidérurgiques, ou agricoles mais aussi du fait de la pollution atmosphérique générée par le trafic automobile (Prasad, 1999).

	Concentrations (µg/L)		**Concentrations (µg/g)**		
	Eau de mer	Eau douce	Sol	Sédiments lacustres	Sédiments marins
Cd	0,01-0,07	0,07	0,5-1	0,14-2,5	0,02-0,43
Cr	0,08-0,15	0,50	15-30	7-77	11-90
Cu	0,04-0,1	1,8	15-25	16-44	4-250
Hg	0,01	0,01	0,15	0,004-0,2	0,001-0,4
Ni	0,2-0,7	0,3	1	34-55	2-225
Pb	0,001-0,015	0,2	50	14-40	7-80
Zn	0,01-0,62	10	100-150	7-124	16-165

Tableau 2.1. Concentrations environnementales en métaux lourds (Prasad, 1999)

Il convient de distinguer les métaux lourds essentiels et non essentiels. Les premiers (cuivre, fer ou zinc) sont indispensables aux processus physiologiques des plantes. Les métaux non-essentiels (cadmium, chrome, mercure, nickel ou plomb), eux, n'ont pas de fonction physiologique connue à ce jour et restent considérés comme des poisons cellulaires pour lesquels les doses tolérables sont très faibles (Prasad, 1999 ; Rengel, 1999 ; Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

Par ailleurs, de nombreuses recherches s'accordent sur le fait que leur toxicité résulte non pas des concentrations totales dans les sols, mais de leur fraction biodisponible (Mc Laughlin *et al.*, 2000 ; Adriano, 2001; Scheifler *et al.*, 2003). Cette fraction est liée à la mobilité des espèces métalliques qui peut être définie par leur aptitude à être transférées vers des compartiments du sol où elles sont moins énergiquement retenues, le compartiment ultime étant la phase liquide représentée par la solution du sol (McLaughlin *et al.*, 2000).

Les minéraux hérités de la roche mère (argiles ou carbonates) et la matière organique héritée de l'activité des organismes et de leur décomposition, forment des phases de rétention des métaux, en équilibre dynamique avec l'eau interstitielle (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

L'ensemble des constituants du sol forme le « complexe absorbant » (Blanchard, 2000). Ce complexe réalise des échanges entre la phase liquide et la matrice solide du sol, dépendant de mécanismes de sorption. Deux principaux types d'interactions entre les phases solide-liquide sont impliqués dans la rétention des métaux lourds (Figure 2.1.): i) la physisorption (adsorption non spécifique résultant des forces électrostatiques entre atomes portant des charges de signes différents conduisant à la formation d'un «complexe de sphère externe»), et ii) la chimisorption (adsorption spécifique faisant intervenir une liaison ionique, covalente ou de coordination et conduisant à la formation de «complexe de sphère interne») (Duchaufour, 1995).

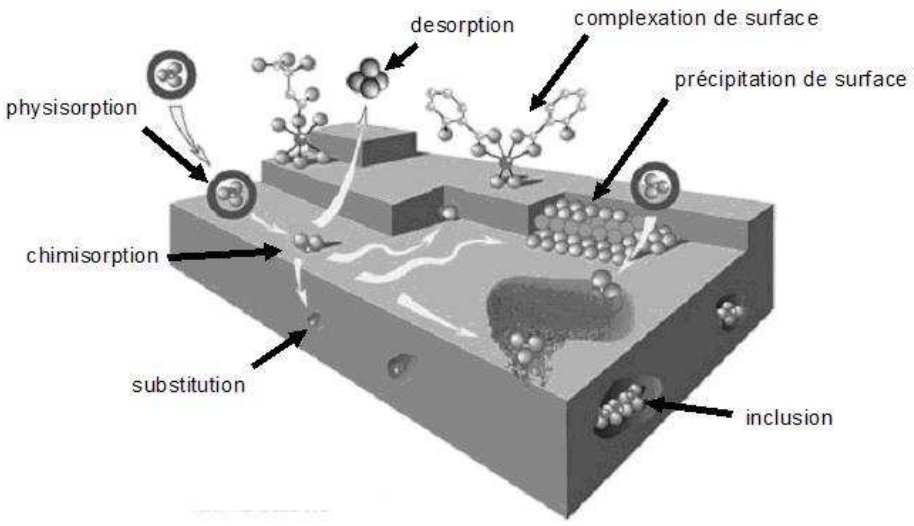


Figure 2.1. Processus basiques de sorption/désorption des éléments métalliques aux interfaces solide/liquide (d'après Manceau *et al.*, 2002)

Les processus de transferts entre la phase solide et la phase liquide sont multiples et dépendent étroitement des liaisons entre les métaux et la phase solide ainsi que des conditions physico-chimiques du sol. De fait, tous les processus de sorption, qu'ils soient spécifiques ou non, sont réversibles, cette réversibilité dépendant des conditions physicochimiques du sol. Les ions métalliques peuvent donc être désorbés et remobilisés dans les solutions du sol. Les

principaux facteurs intervenant dans cette réversibilité sont le pH, le potentiel redox (Eh), l'activité biologique ou encore la température (Deneux-Mustin *et al.*, 2003).

I-) ABSORPTION, DISTRIBUTION ET CAPACITES D'ACCUMULATION DES METAUX CHEZ LES PLANTES SUPERIEURES

Les métaux sont présents dans les sols, les sédiments, les eaux de surface mais aussi dans l'air, sous forme gazeuse (en particulier le mercure) ou adsorbés à de fines particules en suspension (Cavallini *et al.*, 1999 ; Prasad, 1999). De fait, les voies d'absorption des éléments métalliques par les plantes sont multiples et font intervenir les racines, la tige et/ou les feuilles (Marschner, 1995 ; Prasad, 1999). Dans le cadre de notre étude portant sur les plantes de sites pollués, nous nous focaliserons sur l'absorption racinaire.

I-1-) Mécanismes d'absorption des métaux par les plantes

La voie principale d'absorption des métaux se fait par simple diffusion au travers de l'apoplasme du cortex racinaire et de l'endoderme (voie apoplastique). Le transport des éléments métalliques à travers la paroi cellulaire se fait passivement (dans le sens du gradient de concentration) par les pores du réseau de la cellulose, de l'hémicellulose et des glycoprotéines (Figure 2.2.). Cependant, une partie des cations vont être adsorbés du fait des charges négatives de surface de l'acide polygalacturonique des pectines (Briat et Lebrun, 1999).

Au niveau de l'endoderme, le transport peut devenir actif au niveau de la membrane plasmique des cellules de la bande de Caspary (voie symplastique), autorisant cette fois un transport contre le gradient de concentration. Le transport actif à travers la membrane plasmique des cellules racinaires est un processus important, car les ions ne peuvent pas diffuser librement à travers la double couche phospholipidique (Lasat, 2002). Le rôle du plasmalemme dans la régulation du transport métallique est donc primordial.

La membrane plasmique peut limiter l'accumulation des ions toxiques, soit en modifiant l'ensemble du flux ionique, soit en employant des systèmes spécifiques autorisant un flux ionique qui ne transporterait pas les métaux non essentiels (Meharg, 1993). Néanmoins, les protéines associées au plasmalemme joueraient un rôle essentiel dans le transport des métaux à travers la membrane plasmique. Récemment, le gène codant un

transporteur du fer, *irt1*, a été cloné chez *Arabidopsis thaliana* à partir d'une levure (Eide *et al.*, 1996). Chez *A. thaliana*, IRT1 (Iron-Regulated Transporter 1) est exprimé dans les racines en réponse à une carence en fer. Les caractéristiques de ce transporteur et les données physiologiques indiquent que ce système n'est pas spécifique ; il pourrait également transporter d'autres ions divalents comme le zinc et le cadmium (Briat et Lebrun, 1999). Cette compétition entre différents ions entraînerait une déficience en fer responsable de chloroses.

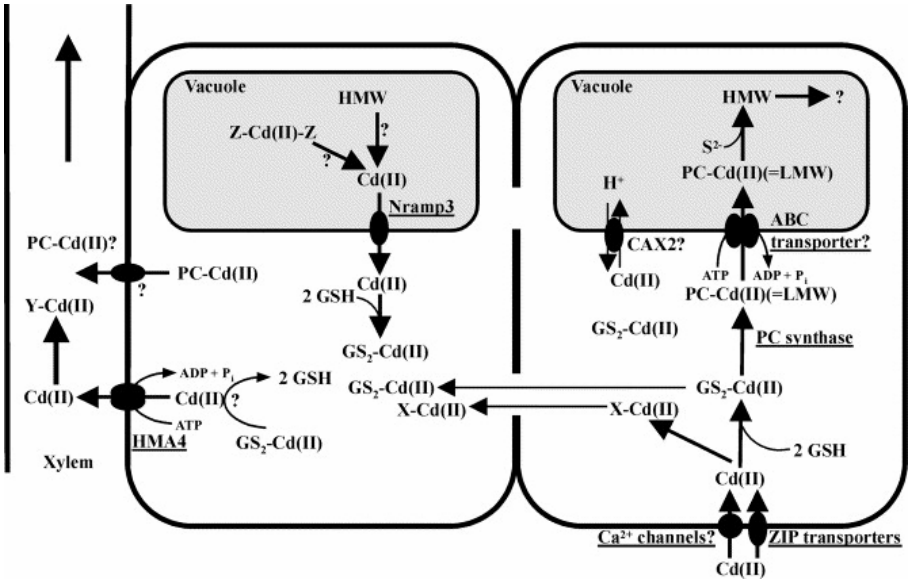


Figure 2.2. Mécanismes d'absorption, de translocation et de séquestration du cadmium chez une plante supérieure (d'après Clemens, 2006). La cellule de gauche est en contact avec le xylème, la cellule de droite avec la rhizosphère. Les deux cellules sont connectées de façon symplastique par des plasmodesmes. PC : phytochélatine, LMW (complexe de faible poids moléculaire), HMW (complexe de haut poids moléculaire), GSH : glutathion. HMA4, Nramp3, CAX2 désignent de possibles transporteurs du cadmium.

D'autres systèmes comparables ont été mis en évidence par expression fonctionnelle chez *A. thaliana*. Ainsi, COPT1 (Copper Transporter 1) est un transporteur du cuivre, retrouvé dans les fleurs, les tiges et les feuilles, mais pas dans les racines. Son implication dans l'absorption racinaire est donc peu probable. Par opposition, ZIP1 et ZIP3 (Zrt-Irt like proteins), exprimées lors d'une carence en zinc, sont exclusivement racinaires. Enfin, ZIP4, localisé à la fois dans les parties racinaires et aériennes, jouerait un rôle dans la translocation du zinc. La modulation de l'expression de ces gènes pourrait donc contribuer largement à la tolérance observée chez certaines espèces (Clemens *et al.*, 2002).

Malgré ces nombreuses observations, les mécanismes exacts de l'absorption de certains éléments métalliques sont encore mal connus (Greger, 1999 ; Chaignon, 2001).On

considère de nos jours que le plomb et le nickel sont absorbés passivement via certaines protéines de type porine, alors que le zinc et le cuivre sont absorbés activement par une protéine de transport sélective, nécessitant de l'énergie (Kabata-Pendias and Pendias, 2001). Par ailleurs, bien que le transport actif soit en principe spécifique, certains métaux toxiques (cadmium, chrome ou plomb) sont des compétiteurs potentiels vis-à-vis des métaux essentiels. Par exemple, le cadmium est un compétiteur bien connu du calcium et est capable d'emprunter les canaux calciques membranaires (Greger, 1999 ; Toppi et Gabbrielli, 1999 ; Perfus-Barbeoch *et al*., 2002).

I-2-) Transport et distribution des métaux au sein de la plante

Après leur absorption, le transport des éléments dans le xylème de la plante vers les parties aériennes, appelé « translocation », peut nécessiter ou non des agents complexants, tels que les acides organiques, les acides aminés et divers peptides : le fer est pris en charge par le citrate, le zinc peut être transporté par un complexe anionique, le cuivre et le zinc sont majoritairement chélatés par l'histidine. Toutefois, le cadmium serait transporté sous forme libre (Alloway, 1995 ; Kramer *et al.*, 1996 ; Greger, 1999). Le transport des éléments toxiques par le phloème est moins important du fait que les cellules qui le constituent sont vivantes et forment un piège supplémentaire (Greger, 1999). Toutefois, chez certaines plantes, la nicotinamine, dérivée de la méthionine, pourrait être responsable du transport de métaux (fer cuivre ou zinc) dans la sève du phloème (Briat et Lebrun, 1999).

La distribution des métaux aux organelles des cellules foliaires s'effectue via l'apoplasme et le symplasme (Karley *et al.*, 2000), des métallochaperones, telles CCH1 (Calcium-Channel 1), des ATPases semblant impliquées dans ce processus (Himelblau *et al.*, 1998). Par exemple, des pompes RAN1 (Responsive to Antagonist 1) seraient nécessaires pour fournir le cuivre nécessaire aux récepteurs de l'éthylène (Hirayama *et al.*, 1999).

Les métaux essentiels en excès et les métaux non-essentiels peuvent être soit expulsés hors des cellules via un efflux contrôlé par des transporteurs membranaires de type ATPase (Briat et Lebrun, 1999), soit séquestrés dans les vacuoles des cellules foliaires (Kramer *et al.*, 2000). Les cellules dans lesquelles s'effectuent prioritairement ces séquestrations diffèrent selon les espèces. Ainsi, chez *T. caerulescens*, la séquestration du cadmium et du zinc s'effectue surtout au niveau des cellules de l'épiderme (Küpper *et al.*, 1999) alors que chez *A. halleri*, elle s'effectue au niveau du mésophyle (Küpper *et al.*, 2000). Par ailleurs, des

structures cellulaires différenciées appelées trichomes joueraient également un rôle majeur dans la séquestration et la détoxication des métaux. Ainsi, chez *Brassica juncea*, les trichomes des feuilles auraient des concentrations en cadmium 40 fois plus importantes que la moyenne foliaire (Salt *et al.*, 1995). De même, le nickel et le zinc seraient accumulés préférentiellement dans ces structures chez *Alyssum lesbiacum* et *Arabidopsis halleri* (Küpper *et al.*, 1999).

I-3-) Capacité d'accumulation des métaux par les plantes

Certaines plantes accumulent des quantités inhabituelles d'éléments métalliques : 100 mg/kg ps pour le cadmium, 1000 mg/kg ps pour le nickel, le cuivre et le cobalt ou encore 10 000 mg/kg ps pour le zinc et le manganèse. Ces espèces sont qualifiées de plantes « hyperaccumulatrices » (*e.g. Alyssum bertolonii, Sebertia acuminata, Silene cobalticola, Thlaspi caerulescens, Brassica napus, Pteris vittata*) (Brooks, 1998). Près de 500 espèces hyperaccumulatrices ont déjà été recensées (Prasad et Freitas, 2003).

Chez *Armeria maritima* subsp. *halleri*, dans les feuilles les plus âgées, les concentrations de cuivre, cadmium, zinc et plomb sont 3 à 8 fois celles des jeunes feuilles (Dahmani-Muller *et al.*, 1999). Leur abscission permettrait de diminuer la concentration en métaux dans les plantes.

A l'échelle cellulaire, cette accumulation resulterait d'une compartimentation des métaux dans la vacuole, grâce à plusieurs familles de transporteurs protéiques. Par exemple, un transporteur tonoplastique appartenant à la famille des protéines GTP (Guanine tri-phosphate) a été identifié chez un écotype de *Silene vulgaris* tolérant au zinc. Le transport de zinc sous forme ionique dans les vacuoles dépend de la présence de magnésium et de GTP et permet la détoxication du zinc plus rapidement que chez l'écotype sensible (Chardonnens *et al.*, 1999). Chez *Rauwolfia serpentina*, le cadmium forme, avec les phytochélatines, des complexes de faible masse moléculaire, qui s'agrègent les uns aux autres par des ponts sulfures pour former des complexes de masse moléculaire élevée. Ceux-ci seraient alors transportés par un complexe protéique spécifique dans la vacuole. Le pH vacuolaire provoquerait la dissociation du complexe, et les ions seraient pris en charge par les acides organiques présents, tels que le malate, le citrate ou encore l'oxalate (Toppi et Gabbrielli, 1999).

I-4-) Mécanismes de chélation et de complexation des éléments métalliques chez les plantes

La plupart des éléments métalliques sont capables de se complexer à diverses molécules et substances organiques présentes dans les vaisseaux ligneux (phloème, xylème) et dans les cellules foliaires et racinaires (Prasad, 1999).

I-4-1-) Mécanismes de complexation et chélation

Le **mécanisme de complexation** des ions métalliques se fait selon le mécanisme d'Eigen-Tamm (Hewkin et Prince, 1970) illustré par la Figure 2.3. Le mécanisme implique un contact entre l'ion métallique et un ligand, chacun étant hydraté (Figure 2.3). Ensuite, il y aurait formation d'un complexe de sphère externe, au sein duquel l'ion et le ligand seraient séparés par une couche d'eau. Finalement, les couches d'hydratation de l'ion et du ligand pourraient se confondre tandis que l'ion et le ligand établiraient une liaison de coordination, conduisant à un complexe dit de sphère interne (Figure 2.3).

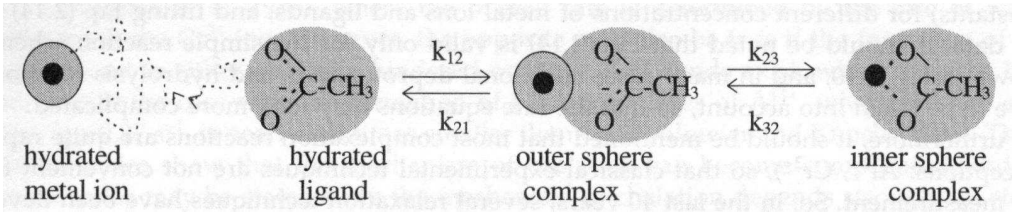


Figure 2.3. Mécanisme d'Eigen-Tamm intervenant dans les processus de complexation et de chélation (d'après Prasad, 1999).

Dans le cas d'une **chélation**, des étapes supplémentaires sont à considérer. Il s'agit en grande partie de formation de liaisons de coordination supplémentaires au sein de la sphère interne (Wilkins, 1991).

I-4-2-) Différents types de ligands

La présence intracellulaire de ligands organiques, qui assurent une complexation de nombreux ions métalliques constitue à l'heure actuelle un aspect fondamental de la résistance aux métaux lourds. Chez les végétaux, quatre groupes principaux de ligands intracellulaires ont été caractérisés :

I-4-2-1-) Les métallothionéines et molécules apparentées

Les métallothionéines (MT) sont des protéines thiolées largement distribuées parmi les procaryotes et chez la plupart des eucaryotes. Elles ont été classées en trois groupes.

Les MT de classe I et II sont caractérisées par leur richesse en cations métalliques et par leur forte proportion de résidus cystéines (environ 30 %). Elles se distinguent aussi par leur faible masse moléculaire (6 à 8 kDa et 60 à 75 acides aminés), par leur thermorésistance et par l'absence de résidus aromatiques. Bien que leurs séquences en acides aminés soient très variables d'un organisme à un autre, il semblerait que la structure tridimensionnelle soit bien conservée. Elles présentent deux domaines globulaires distincts, dépourvus de structure secondaire et reliés entre eux par une courte séquence de transition (Figure 2.4.), chaque domaine étant responsable de la fixation de plusieurs cations métalliques divalents ou monovalents (Robinson *et al.*, 1993).

De nombreuses observations ont montré que les MT pourraient être impliquées dans des mécanismes de tolérance, notamment vis-à-vis du cadmium, du cuivre ou du zinc. Chez *Arabidopsis thaliana* par exemple, la présence de cuivre stimule la biosynthèse de MT et la variation écotypique de la tolérance à ce métal est corrélée au taux de transcription des gènes MT (Murphy et Taiz, 1995).

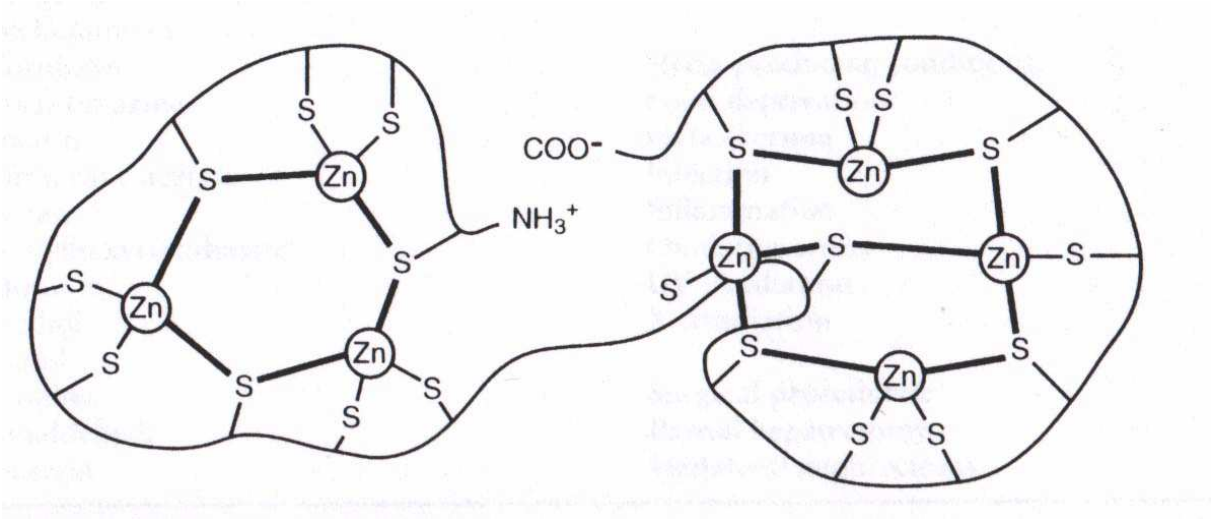


Figure 2.4. Schéma d'une métallothionéine complexant sept atomes de zinc (d'après Hansen, communication personnelle)

La surexpression de gènes MT, dans des organismes aussi variés que des cyanobactéries, des levures, des cellules de mammifères ou des plantes (Misra et Genamu, 1989) peut s'accompagner d'une augmentation de la tolérance à certains métaux lourds (cadmium, cuivre ou zinc). Cependant, il faut souligner que la synthèse de MT ne constitue probablement pas une réponse spécifique à l'exposition métallique. En effet, ces protéines s'accumulent également en réponse à d'autres stress (chocs thermiques par exemple) ou sous l'effet d'hormones. Ainsi, la présence universelle des MT dans le monde vivant et leur synthèse dans des situations variées, suggèrent que ces protéines seraient plutôt impliquées dans le contrôle général de l'homéostasie cellulaire et non dans les réponses spécifiques aux métaux lourds. Les hyperaccumulateurs ne semblent d'ailleurs pas se distinguer par leur richesse en MT (Robinson *et al.*, 1993 ; Murphy et Taiz, 1995).

Le troisième groupe (MT de classe 3) n'est rencontré que dans le règne végétal et rassemble des molécules appelées phytochélatines (Prasad, 1999).

I-4-2-2-) Les phytochélatines et thiols apparentés

En se basant sur l'analyse des acides aminés du choux, Wagner (1984, cité par Cobbett et Goldsbrough, 2000) fut le premier à mettre en évidence un complexe entre le cadmium et le glutathion (Figure 2.2). Par ailleurs, des études sur *Schizosaccharomyces pombe* exposée au cadmium ont conduit à la découverte de complexes renfermant une association cystéine-cadmium, alors nommés cadystine A et B, de composition similaire en acides aminés mais différant par leurs masses moléculaires (Kondo *et al.*, 1985, cité par Zenk, 1996). Néanmoins, ce sont les travaux de Grill *et al.* (1985) menés chez *Rauwolfia serpentina* qui ont permis d'établir la structure de ces molécules, selon un modèle $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ avec n compris entre 2 et 11 (Figure 2.5.), bien que le plus souvent seuls les peptides ayant un n maximum de 5 à 7 soient observés (Cobbett et Goldsbrough, 2002).

Le terme « phytochélatines » fait aujourd'hui l'objet d'un large consensus, bien qu'elles soient toujours placées dans les MT de classe III (Prasad, 1999). Il est vrai qu'en plus des plantes, où leur occurrence a été démontré pour plus de 200 espèces incluant des divisions taxonomiques variées comme les bryophytes, les phytophytes, les ptéridophytes ou les spermaphytes (Gekeler *et al.*, 1989), les phytochélatines ont également été observées chez des champignons (Grill *et al.*, 1986 ; Kneer *et al.*, 1992) et des séquences homologues ont été

découvertes chez le nématode *Caenorhabtidis elegans* et chez *Chironomus* sp. (Clemens *et al.*, 2001 ; Cobbett et Goldsbrough, 2002).

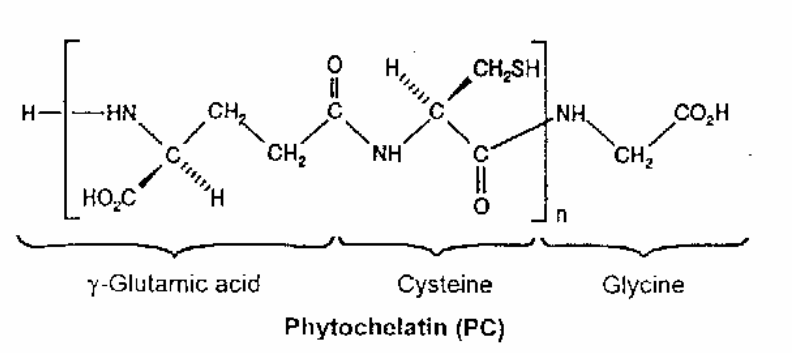


Figure 2.5. Structure d'une phytochélatine (modifié d'après Prasad, 1999)

Sur le plan terminologique, lorsque la glycine terminale est substituée par de la sérine (Klapheck *et al.*, 1994), du glutamate (Meuwly *et al.*, 1993), de la glutamine (Kubota *et al.*, 2000) on parle d' « iso-phytochélatines ». Lorsque la glycine est substituée par de la β-alanine, ils sont nommés homo-phytochélatines (Grill *et al.*, 1986). Toutes ces molécules sont regroupées sous le nom de thiols apparentés aux PC qui comprennent également le glutathion (γ-Glu-Cys-Gly), capable de chélater les métaux via son groupement –SH (Gusmao-Lima *et al.*, 2006).

a) La PC-synthase : activation et réactions catalysées

Les PC sont synthétisées par la γ-glutamylcystéinyl dipeptidyle transpeptidase, couramment nommée PC-synthase (E.C. 2.3.2.1.5). Cette enzyme cytosolique catalyse le transfert d'un motif γ-Glu-Cys, issu d'une première molécule de glutathion, sur une seconde. La réaction se poursuit avec le transfert du même motif sur la PC2 pour aboutir à la formation d'une PC3, et ainsi de suite jusqu'à PC11 (Grill *et al.*, 1989). Ainsi, il a été démontré *in vitro* qu'un extrait brut de levure exprimant une PC-synthase, ajouté à une solution de γ-Glu-Cys, conduit à la formation de (γ-Glu-Cys)n (avec n = 2 à 4) (Rauser, 2000). Cette enzyme serait également responsable de la synthèse d'iso-PC2 contenant de la sérine (Klapheck *et al.*, 1995).

Les données issues de manipulations effectuées sur *Silene cucubalus* (Grill *et al.*, 1989), sur *Oriza sativa* (Yan *et al.*, 2000) et sur *Nicotiana tabacum* (Nakazawa *et al.*, 2002) convergent quant aux caractéristiques de l'enzyme : i) une masse moléculaire de l'ordre de 95000 à 100000 Da, ii) 4 sous-unités dont un dimère de 55000 Da (Figure 2.6.), iii) un pH optimum de 7,5 et iv) une température optimale de 35°C.

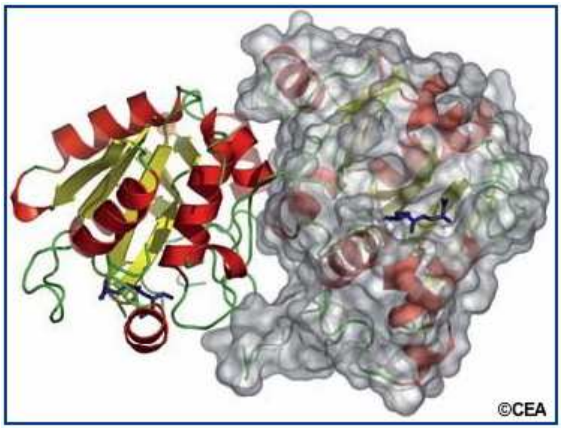


Figure 2.6. Modèle tridimensionnel d'une PC synthase (Vivarès *et al.*, 2002)

Cette enzyme est exprimée constitutivement chez les plantes (Rauser, 2000) et elle est activée en quelques minutes, *in vitro*, par les ions métalliques. Le cadmium est généralement l'activateur le plus puissant, les suivant se classant ainsi : Pb > Zn > Sb > Ag > Ni > Hg > As > Cu chez *Rauwolfia serpentina* (Grill *et al.*, 1987) et Pb > Ni > Ag > Cu > Zn chez le riz (Yan *et al.*, 2000).

Peu de données sont disponibles au sujet des expositions polymétalliques. A partir d'extraits de cellules de tabac, on peut constater que l'induction par un mélange Ag/Cu/Hg/Cd n'est pas plus importante que celle obtenue avec le mélange Ag/Cu/Hg. Par ailleurs, l'association du cadmium à zinc, plomb, nickel, mangnèse ou cobalt provoque une induction plus importante que ces métaux seuls mais identique à celle par le cadmium seul (Nakazawa et Takenaga, 1998).

Les modèles concernant l'activation de cette enzyme ont évolué au fil du temps. Les premiers modèles (Cobbett, 1999) supposaient une fixation des métaux sur la région C-terminale riche en cystéines. Restait cependant la question de l'activation par un large éventail de métaux. Les travaux de Vatamaniuk *et al.* (2000) ont montré que l'activation de l'enzyme passait par un complexe GSH-Métal^{n+}-GSH, ce qui expliquerait la variété des activateurs. Par ailleurs, une diminution de la concentration en ions métalliques libres dans le milieu ainsi qu'une baisse du taux de GSH sont responsables de la rétro-inhibition de l'enzyme (Loeffler *et al.*, 1989 ; Vatamaniuk *et al.*, 2000).

Enfin, il n'existe encore que peu de travaux sur les mécanismes de régulation des gènes codant la PC synthase, même si deux gènes (*At*PCS1 et *At*PCS2) codant pour deux PC synthases fonctionnelles ont été identifiés chez *A. thaliana* (Cazalé et Clemens, 2001), un (*Ta*PCS1) chez le blé, et deux autres chez le riz (*Os*PCS1 et *Os*PCS2) (Cobbett et Goldsbrough, 2002). Les seuls résultats disponibles semblent indiquer que les taux d'ARNm correspondant à *At*PCS1 semblent indépendants de la concentration en cadmium (Ha *et al.*, 1999) alors que le taux du transcrit de *Ta*PCS1 augmente avec la concentration en cadmium (Cobbett et Goldsbrough, 2002), supposant différents niveaux de régulation de l'expression de ces gènes suivant les espèces (Lee *et al.*, 2002).

b) Complexation symplasmique des métaux

Bien que de nombreux métaux induisent la synthèse de PCs, *in vitro* et *in vivo*, tous ne sont pas complexés par ces substances. *In vivo*, la formation de complexes est avérée pour le cadmium (Grill *et al.*, 1985), l'argent (Mehra *et al.*, 1996), l'arsenic (Schmöger et al., 2000) ou le cuivre (Léopold *et al.*, 1999). *In vitro*, une association avec le mercure est rapportée (Mehra *et al.*, 1995).

Après filtration sur gel d'extraits végétaux, l'analyse des complexes formés montre deux pics bien séparés conduisant à la distinction de complexes de hauts poids moléculaires (HMW) et ceux de faibles poids moléculaires (LMW) (Toppi et Gabbrielli, 1999). Les LMW-PC sont formées de PC où n = 2 à 5, tandis que les HMW-PC sont formées de PC où $n \geq 6$ (Toppi et Gabbrielli, 1999). Notons toutefois que ces définitions peuvent varier en fonction des auteurs.

In vivo, les LMW-PC chélatent le cadmium dans des rapports molaires Cd/Cys de l'ordre de 0,6 (Morelli *et al.*, 2002). *In vitro*, des analyses en spectrométrie EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) ont permis de mettre en évidence des complexes où le cadmium est coordonné par quatre cystéines (motifs $Cd_3(PC4)_3$) et où le rapport Cd/Cys n'est que de 0,25 (Figure 2.7.). Ces données suggèrent donc que les complexes formés *in vivo* (de structure encore inconnue) sont plus efficaces que ceux formés *in vitro* (Strasdeit *et al.*, 1991).

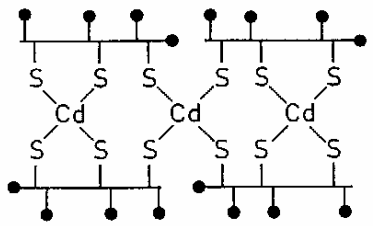


Figure 2.7. Chélation du cadmium par des PCs synthétisées *in vitro* (modifié d'après Strasdeit *et al.*, 1991).

c) Localisation cellulaire

Chez les plantes, les complexes LMW, cytosoliques, seraient très vraisemblablement transférés dans la vacuole où un réarrangement interviendrait lors de l'incorporation des ions sulfures donnant naissance aux HMW (Figures 2.2 et 2.8). Cette hypothèse est appuyée par la découverte, chez l'avoine, d'un transporteur tonoplastique (Mg-ATP dépendant) des PC et PC-Cd (Salt et Rauser, 1995), fonctionnellement analogue aux transporteurs HMT1 de *S. pombe* dont la mutation est clairement en relation avec l'incapacité de cet organisme à former des HMW (Ortiz *et al.*, 1992).

Par ailleurs, une activité antiport tonoplastique Cd^{2+}/H^{+} a également été mise en évidence chez l'avoine (Salt et Wagner, 1993) et une levure dépourvue de PC-synthase a été capable de transférer dans la vacuole des motifs GSH-Cd^{2+}-GSH, par l'intermédiaire d'un transporteur ABC (ATP-Binding-Cassette ; Cobbett et Goldsbrough, 2002).

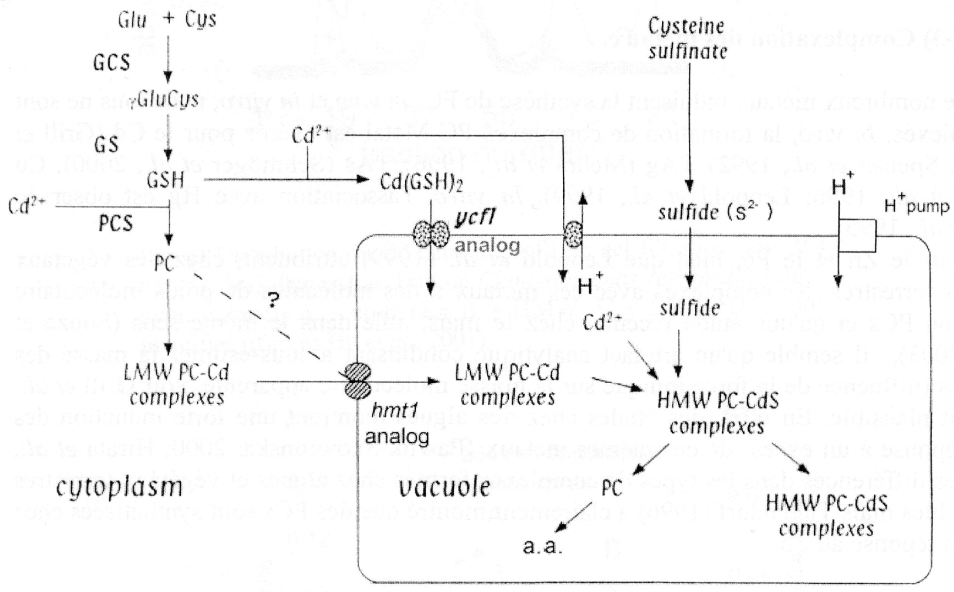


Figure 2.8. Schéma de la synthèse et du devenir des phytochélatines chez les végétaux (modifié d'après Salt et Wagner, 1993 ; Cobbett et Goldsbrough, 2002). GCS : γ-glu-cys synthase, GS : glutathion synthase, GSH : glutathion, LMW-PC : Phytochélatines de faible poids moléculaire, HMW-PC : Phytochélatines de haut poids moléculaire, PCS : PC synthase, a.a. : acides aminés. Ycf1 et hmt1 désignent de possibles transporteurs des complexes.

d) Fonctions cellulaires, défense et tolérance

Les différentes observations évoquées précédemment soutiennent l'idée répandue que les PC auraient un rôle important dans la tolérance des plantes aux métaux lourds. Cette idée est encore renforcée par l'observation, chez la moutarde, de lignées Cd-tolérantes présentant des taux de PC plus élevées que dans les lignées sensibles (Zenk, 1996). De plus, la surexpression des enzymes de synthèse des précurseurs des PC favorise l'accumulation et la tolérance au cadmium tandis que leur inhibition (via ajout de BSO, L-buthionine-[S,R]-sulphoximine) entraînent des effets inverses (Zhu *et al.*, 1999a ; 1999b). Les résultats les plus convaincants restent i) l'isolation de mutants cad1 d'*A. thaliana* plus sensibles au cadmium que le phénotype sauvage et déficient pour la PC synthase (Howden *et al.*, 1995) et ii) l'identification du gène AtPCS1 chez *A. thaliana* et d'un homologue chez *S. pombe* dont la délétion rend les organismes sensibles au cadmium et incapables de synthétiser des PC (Ha *et al.*, 1999).

Toutefois, il apparaît aussi que la tolérance aux métaux ne passe pas exclusivement par les PC, notamment dans le cas de populations établies dans des milieux dont les teneurs en métaux sont particulièrement élevées, comme les friches industrielles (Schat *et al.*, 2002 ; Wojcik *et al.*, 2005). Ainsi, une population tolérante de *Silene vulgaris* exposée à du cadmium ou à du zinc synthétise trois fois moins de PC que la population sensible, la fonctionnalité des PC synthases et la dégradation des PC étant sensiblement identiques (Harmens *et al.*, 1993 ; De Knecht *et al.*, 1995). Un schéma similaire a été plus récemment observé lors de la comparaison des réponses au cadmium de *T. caerulescens* (hyper-accumulatrice) et *T. arvens* (non accumulatrice) par Ebbs *et al.* (2002) et de *Solanum nigrum* (hyper-accumulatrice) et *S. melongena* (non accumulatrice) par Sun *et al.* (2007). De plus, l'étude comparative de deux populations de carottes montrent que les concentrations en PC et cadmium intracellulaires sont plus faibles chez les mutants tolérants, et seraient en relation avec une excrétion plus importante du cadmium (Kim *et al.*, 2000).

I-4-2-3-) Cas des acides organiques

Les acides organiques représentent un autre groupe de chélateurs naturels (Figure 2.9) tels que des acides dicarboxyliques (acides fumarique, malique, oxalique) ou des acides

tricarboxyliques (comme l'acide citrique). Toutes ces petites molécules sont clairement impliquées dans les phénomènes d'accumulation (Prasad, 1999). On observe souvent une stimulation de leur synthèse en présence de métaux lourds, ce qui laisse penser qu'elles assurent le transport xylémien des ions métalliques depuis les racines vers les parties aériennes de la plante (Clemens *et al.*, 2002). De plus, des observations ont clairement montré que, au moins dans certains cas, des acides organiques sont directement impliqués dans les mécanismes de tolérance (Prasad, 1999).

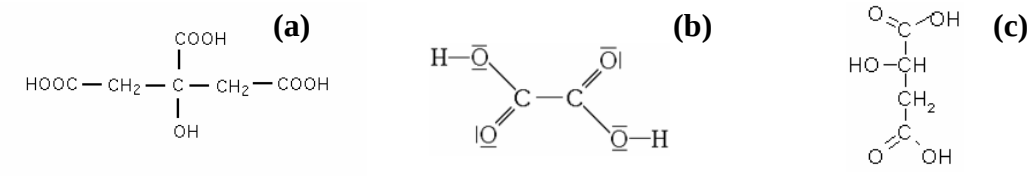


Figure 2.9. Formules developpées des acides citrique (a), oxalique (b) et malique (c)

Ainsi, les capacités d'hyperaccumulation et de résistance de certaines variétés de blé noir (*Fagopyrum esculentum*) vis-à-vis de l'aluminium sont directement dépendantes de la synthèse d'acide oxalique (Ma *et al.*, 1997). De même, une synthèse accrue de malate a été observée chez une population tolérante de *Festuca rubra* se développant sur des dépôts riches en cuivre et zinc, par rapport à une population sensible provenant d'une prairie (Harrington *et al.*, 1996). Ces deux exemples suggèrent donc que la tolérance aux métaux chez quelques métallophytes hyperaccumulatrices serait acquise par une synthèse spécifique de petites molécules organiques complexantes.

I-4-2-4-) Les acides aminés

Les acides aminés libres, comme la proline, l'histidine et la cystéine, s'accumulent lors d'un stress métallique et pourraient être eux aussi impliqués dans la chélation de divers métaux lourds, notamment du zinc et du nickel (Bert, 2000 ; Sun *et al.*, 2007). C'est ainsi que l'accumulation et la tolérance au nickel dans le genre *Alyssum* semblent principalement dues à une synthèse accrue d'histidine (Kramer *et al.*, 1996).

II-) PHYTOTOXICITE DES METAUX LOURDS

Les principaux symptômes observés chez les plantes suite à une exposition métallique sont une inhibition de la croissance, une chlorose foliaire, des lésions nécrotiques conduisant à un jaunissement progressif puis à un repliement ou un dessèchement du feuillage (Toppi et Gabbrielli, 1999). Les mécanismes moléculaires liés à ces symptômes sont encore mal connus mais il semble que deux voies puissent être distinguées : i) une toxicité liée aux ions métalliques capables d'interagir directement avec divers processus physiologiques (*e.g.* biosynthèse des tétrapyrroles) et ii) une toxicité liée à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) pouvant elles-mêmes causer des dommages cellulaires, en particulier au niveau des lipides membranaires via le processus de lipoperoxydation et par altération du matériel génétique (Toppi et Gabbrielli, 1999).

II-1-) Effets directs sur la physiologie de la plante

II-1-1-) Métabolisme des tétrapyrroles et photosynthèse

L'appareil photosynthétique apparaît comme étant une des principales cibles des métaux lourds et leurs impacts sur ce dernier ont déjà fait l'objet de synthèses bibliographiques (Prasad, 1995a ; 1999). Globalement, trois types d'impact sont relevés : i) des effets sur la biosynthèse des tétrapyrroles (et donc des chlorophylles), ii) des inhibitions des photosystèmes et iii) des interactions moléculaires au niveau du cycle de Calvin.

II-1-1-1-) Effets sur la biosynthèse des tétrapyrroles

La diminution du taux de chlorophylle chez les plantes exposées aux métaux lourds est un phénomène très courant et supposé comme étant préliminaire à l'inhibition de la photosynthèse (Prasad, 1999). Le cuivre semble plus affecter la biosynthèse des chlorophylles que le cadmium chez *Lemna trisulca* (Prasad *et al.*, 2001) et *Chlamydomonas reinhardtii* (Prasad *et al.*, 1998) qui lui-même semble avoir plus d'effets que le plomb chez *Triticum aestivum* (Oncel *et al.*, 2000). Cependant, les effets observés semblent dépendre de l'âge des

feuilles, les feuilles mâtures étant plus sensibles que les feuilles néoformées (Barcelo *et al.*, 1988 ; Krupa et Moniak, 1998).

Par ailleurs, dans le cas de l'épinard ayant subi une exposition au cuivre, les effets sur la concentration en chlorophylle semble dépendre de la population concernée : une population tolérante présentera une hausse du taux de chlorophylle alors qu'une baisse sera observée chez une population sensible (Prasad, 1999). Les mêmes observations ont été faites avec *Silene cucubalus* (Lolkema et Vooijs, 1986)

De nombreuses études ont été menées pour connaître les cibles des métaux au niveau de la voie biosynthèse des chlorophylles (Stobart *et al.*, 1995 ; Shalygo *et al.*, 1997). Cinq enzymes seraient inhibées par une interaction des métaux avec des groupements thiols. Trois de ces enzymes sont indiquées sur la Figure 2.10., les deux autres étant l'ALA-synthase (intervenant en amont des processus présentés Figure 2.10.) et la protochlorophyllide réductase (intervenant en aval de la Mg-chélatase).

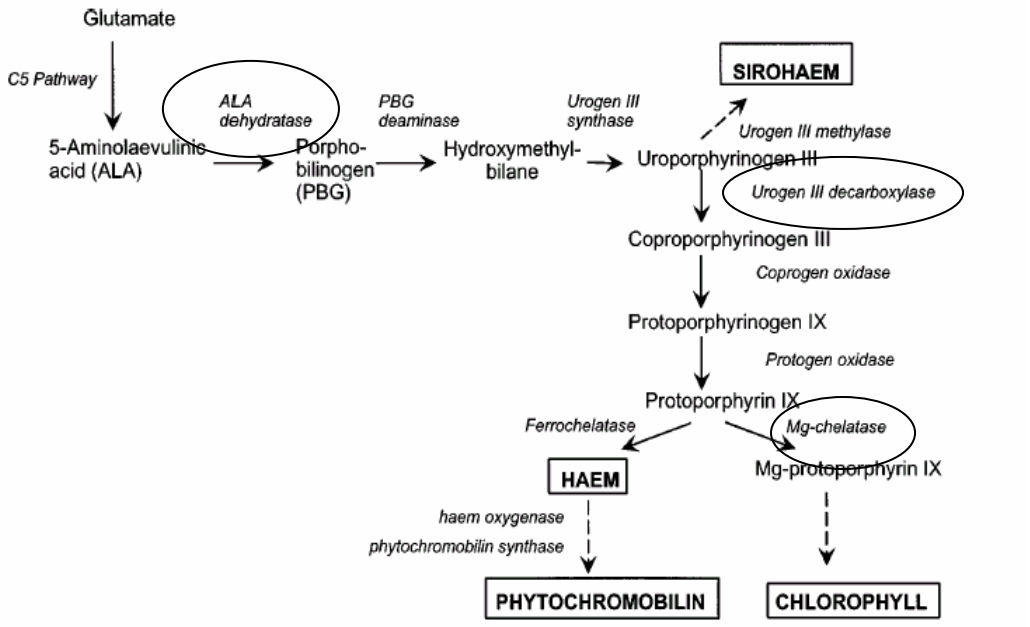


Figure 2.10. Effets des métaux sur la biosynthèse des tétrapyrroles (modifié d'après Prasad, 1999). Les activités des enzymes entourées sont connues pour être inhibées par les métaux chez *Cucumis sativus*, *Hordeum vulgare*, *Phaseolus vulgaris*, ou *Triticum aestivum*.

Parallèlement aux diminutions du taux total de chlorophylles, des influences des métaux sur le rapport chl a/b ont également été décrites. Ainsi Monnet *et al.* (2001) ont observé une diminution de ce rapport lors d'expositions au zinc de *Lolium perenne*.

Récemment, Dazy *et al.* (2008), ont observé le même effet lors d'expositions au chrome chez la mousse aquatique *Fontinalis antipyretica*.

II-1-1-2-) Effets sur les photosystèmes

La plupart des métaux lourds altèrent l'appareil photosynthétique (Tableau 2.2), la dose et la durée d'exposition étant deux facteurs determinants des effets engendrés (Chugh et Sawhney, 1999). D'une manière générale, le photosystème II (PSII) semble plus sensible que le photosystème I (PSI) tandis que le cadmium et le cuivre semblent être les métaux les plus nocifs. Par ailleurs, les effets du cadmium semblent dépendre en partie des concentrations cellulaires en fer et en calcium (Siedlecka et Krupa, 1996 ; Skorzynska-Polit *et al.*, 1998). Les effets du cuivre, eux, semblent dépendre uniquement de la concentration cellulaire en calcium (Maksymiec et Baszynski, 1999).

Sites d'action	Métaux
Photosystème I (P1)	Cu, Pb, Zn
Photosystème II (P2)	Cd, Co, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn
Plastoquinones (PQ)	Cd, Cr, Cu, Zn
Cytochromes b6/f	Cu, Ni
Plastocyanines (Pc)	Cu, Hg, Ni
Ferredoxines (Fd)	Cd, Cu, Hg, Ni, Zn

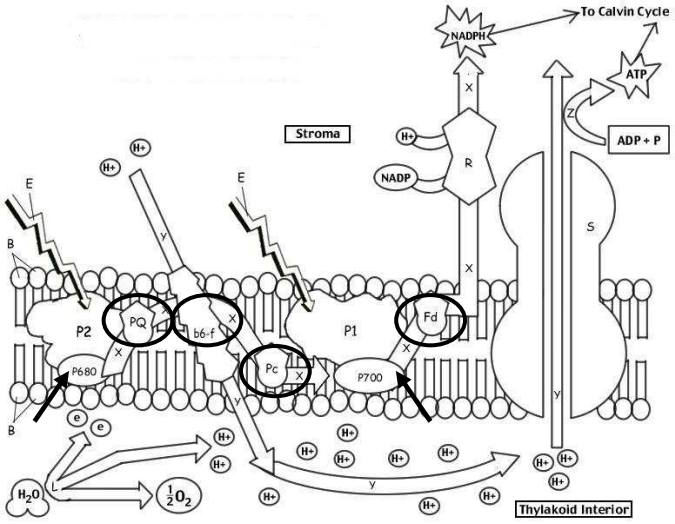


Tableau 2.2. Cibles des métaux au sein des chaînes de la réaction lumineuse de la photosynthèse (modifié d'après Prasad, 1999) Abréviations : P1, photosystème I ; P2, photosystème II ; Fd, ferredoxine ; Pc, plastocyanine ; PQ, plastoquinone.

Au niveau du PSI, l'action toxique du cadmium et de l'aluminium s'effectuerait au niveau de la férredoxine par compétition avec le fer. Le cuivre et le mercure agiraient également sur le fonctionnement de la ferredoxine mais aussi au niveau du P700 et des plastocyanines (Siedlecka et Bazynski, 1993 ; Prasad, 1999). Concernant le PSII, l'OEC (Complexe d'Emission de l'Oxygène), une manganoprotéine située sur les thylakoïdes (côté lumen), semble être la cible principale de la plupart des métaux. Le cuivre semble également

agir au niveau des quinones Q_A et Q_B et bloquerait le transfert d'électron de la tyrosine Z au P680 (Prasad, 1999).

II-1-1-3-) Effets sur le cycle de Calvin

Les trois étapes du cycle de Calvin (carboxylation, réduction, régénération) sont affectées par les métaux lourds, la carboxylation demeurant la plus sensible (Figure 2.11 ; Prasad, 1999). L'inactivation des activités enzymatiques (plus particulièrement celle de la Rubisco) par le cadmium, le cuivre, le plomb ou le zinc, serait liée à une interaction entre ces métaux et les groupements sulfhydryl des enzymes (Van Assche et Clijsters, 1990 ; Prasad, 1999).

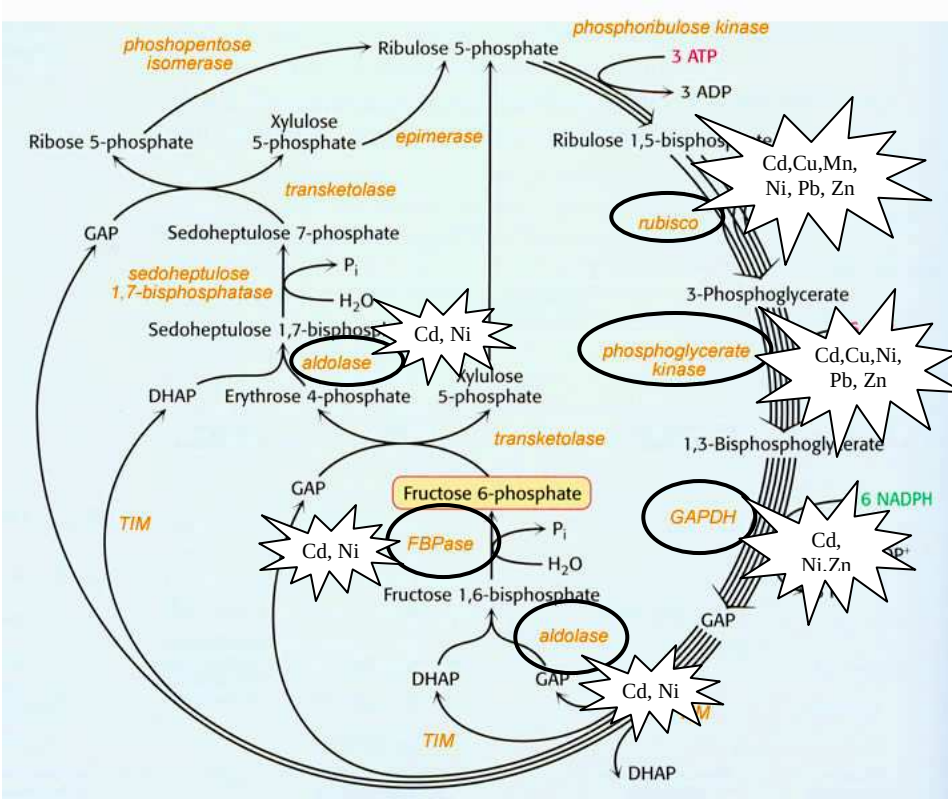


Figure 2.11. Cibles des métaux lourds au niveau du cycle de Calvin (modifiée d'après Prasad, 1999). Abréviations : Rubisco, Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase ; GAPDH, Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogènase ; TIM, Triose Phosphate Isomérase ; FBPase, Fructose 1,6 biphosphatase ; GAP, Glycéraldéhyde-3-Phosphate ; DHAP, Dihydroxyacétone phosphate.

II-1-2-) Effets sur le développement des plantes

Des carences en métaux essentiels peuvent engendrent un développement anormal. Par exemple un manque de fer réduit la formation des racines latérales chez *Colocasia esculenta* (Ares *et al.*, 1996).

En cas d'excès, les métaux essentiels peuvent se comporter comme les métaux non-essentiels et exercer une toxicité (Prasad, 1999), affectant plusieurs étapes du développement (Figure 2.12.), de la germination à la formation des feuilles (Prasad, 1999). D'une manière générale, la plupart des métaux peuvent inhiber la germination et l'élongation racinaire lors des premiers stades de développement (Brune *et al.*, 1994 ; An, 2004 ; An, 2006 ; Da Rosa Correa *et al.*, 2006). Certains (Cu, Cd, Pb) peuvent également altérer la croissance apicale (An, 2004, 2006).

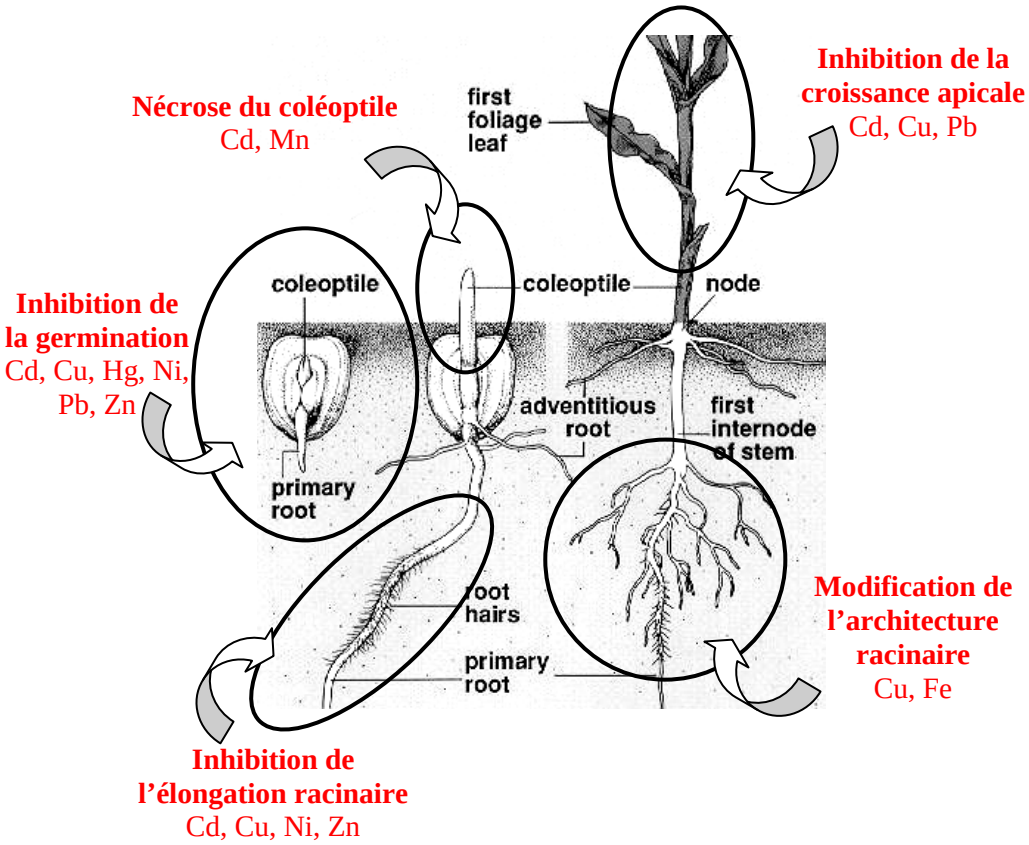


Figure 2.12. Possibles interactions métalliques lors du développement des plantes (modifiée d'après Prasad, 1999).

Un excès de cuivre peut également engendrer la formation de racines latérales menues et jaunâtres (Gupta *et al.,* 1999), et provoquer des chloroses et/ou nécroses des jeunes feuilles (Ouzounidou *et al.,* 1994). Une concentration trop élevée en manganèse peut entraîner une nécrose du coléoptile et des jeunes feuilles (Foy *et al.,* 1978).

D'autres symptômes ont également été observés lors d'expositions à divers métaux lourds : une diminution du nombre de poils absorbants, du diamètre des vaisseaux ligneux, de la taille et/ou vacuolisation du méristème, mais aussi une augmentation de la subérisation et de la lignification (Prasad, 1999).

II-1-3-) Effets sur la reproduction des plantes

Les métaux peuvent altérer la reproduction des plantes, selon des mécanismes variés. Par exemple, chez *Poa annua* et *Senecio vulgaris*, des expositions à des sols contaminés par le cuivre engendrent, non seulement des diminutions du nombre d'individus capables de produire des fleurs et des fruits, mais également des retards de floraison et de fructification chez les individus reproductifs (Brun *et al.,* 2003). La même étude a également révélé une baisse de la production de graines chez les individus exposés. Ryser et Sauder (2006) ont également observé des retards et inhibitions de la floraison chez *Hieracium piloselloïdes* poussant sur un sol riche en nickel et en cuivre. Ces auteurs notent en particulier un effet sur la formation des capitules floraux.

D'autres métaux semblent agir préférentiellement au niveau du pollen. Ainsi, des inhibitions de la germination et de la croissance du tube pollinique ont été observées chez *Vicia augustifolia, V. tetraspora* et *Plantago depressa* exposées au cadmium (Xiong et Peng, 2001) et chez le kiwi *Actinidia deliciosa* exposé au chrome (Speranza *et al.,* 2007). Par ailleurs, Mohanty *et al.* (2004) expliquent la forte proportion d'infertilité du pollen (64%) chez *Oryza sativa* exposé à l'aluminium par une fréquence élevée d'aberrations chromosomiques.

II-1-4-) Autres effets directs

Parallèlement aux effets qu'ils engendrent sur la photosynthèse ou le développement des plantes, les métaux peuvent agir sur divers autres processus (Kieffer *et al*., 2008)

II-1-4-1-) Effets sur les relations hydriques et la nutrition

Les métaux peuvent modifier la conductance et la résistance des stomates ainsi qu'inhiber l'élongation cellulaire (due à une dégradation membranaire et à une perte de turgescence (Prasad, 1999). Un autre mécanisme affectant les relations hydriques des plantes serait le blocage des aquaporines par les ions métalliques ou la réduction du diamètre des vaisseaux ligneux, en particulier du xylème, par des dépôts amorphes dérivés de la paroi cellulaire appelés composés phénoliques (Prasad, 1999).

II-1-4-2-) Effets sur la respiration mitochondriale

Les métaux ont démontré une capacité à stimuler ou inhiber la respiration mitochondriale dépendant non seulement du métal considéré mais aussi de l'espèce, voire du degré de tolérance de la population concernée (Prasad, 1999). D'un point de vue mécanistique, ces altérations seraient dues aux interactions des métaux avec différentes structures et/ou réactions mitochondriales (Tableau 2.3).

Structure ou réaction cible	**Eléments exerçant une toxicité**
Transporteurs de substrats	Hg, Pb
Systèmes de transfert des électrons	Hg, Pb, Zn
Transporteurs adénine/phosphate	Cu, Hg
Perméabilité aux ions K+, H+, Cl-	Cd, Cu, Hg, Pb, Zn
Phosphorylation	Hg
Cycle de l'acide citrique	Cd, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn

Tableau 2.3. Structures ou réactions mitochondriales sensibles à l'action des métaux (Prasad, 1999)

II-1-4-3-) Effets sur la structure des chloroplastes

Différents métaux, dont le cadmium et le cuivre, sont capables d'altérer la structure et la composition des membranes des thylakoïdes (Barcelo *et al.*, 1988 ; Lidon *et al.*, 1993). Par ailleurs, des plantes exposées au cadmium présentent, dans la plupart des cas, une désorganisation de la structure lamellaire du granum (McCarthy *et al.*, 2001) et une augmentation de la taille des grains d'amidon (Sandalio *et al.*, 2001).

II-1-4-4-) Effets génotoxiques

Les métaux exercent également de nombreux effets génotoxiques incluant des perturbations de la division cellulaire (via l'altération des microtubules), des aberrations chromosomiques, des échanges de chromatides sœurs, ou la formation de ponts chromosomiques ou de micronoyaux (Ma *et al.*, 1995 ; Fusconi *et al.*, 2006).

Parmi les aberrations les plus courantes liées aux stress métalliques, des micronoyaux ont été observés chez *Vicia faba* exposée à une solution de cadmium (Béraud *et al.*, 2007). D'autres auteurs ont également noté la capacité du cadmium à provoquer des cassures d'ADN chez *Solanum tuberosum* (Gichner *et al.*, 2008a). Par ailleurs, d'autres métaux, comme le mercure et le plomb sont également connus pour engendrer de nombreux effets génotoxiques (revue par Patra *et al.*, 2004).

II-2-) Effets indirects : phytotoxicité oxidative

II-2-1-) Production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) au niveau cellulaire

Une grande variété de facteurs environnementaux (fortes variations de la température, de la salinité, expositions aux UV, à l'ozone, ou à divers polluants...) sont potentiellement dangereux pour les végétaux (Smirnoff, 1998). Tous ces facteurs ont en commun d'augmenter la production d'ERO dans différents compartiments de la cellule végétale (Schützendübel *et al.*, 2001 ; Van Breusegem *et al.*, 2001). Si ces espèces réactives ne sont pas complètement réduites, elles peuvent oxyder de nombreuses macromolécules telles que l'ADN, les protéines ou les lipides (Van Breusegem *et al.*, 2001).

II-2-1-1-) Réduction de l'oxygène moléculaire et formation des espèces réactives

A l'état fondamental, l'oxygène moléculaire (O_2) est relativement peu réactif. Il doit être activé pour manifester sa toxicité, soit par une activation photodynamique qui aboutit à l'oxygène singulet ($^1O_2$), soit par une activation réductrice avec formation séquentielle de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et du radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$) (Cossu *et al.*, 1997).

Van Breusegem *et al.* (2001) résument les différentes étapes de la réduction de l'oxygène moléculaire par la réaction séquentielle suivante :

$$O_2 \rightarrow HO_2^{\bullet -} \rightarrow H_2O_2 \rightarrow OH^{\cdot} + H_2O \rightarrow 2\ H_2O$$

La première étape de la réduction de l'oxygène moléculaire produit dans un premier temps le radical hydroperoxyle (HO_2^- ; peu diffusible et à durée de vie très courte) puis l'ion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$; très stable en milieu hydrophobe). Le temps de demi-vie de cet ion superoxyde est d'environ 2 à 4 µs. C'est un ion très réactif pouvant former des hydroperoxydes avec les diènes, mais qui peut surtout oxyder des acides aminés (comme l'histidine, la méthionine et le tryptophane) et causer une peroxydation lipidique au niveau des membranes cellulaires (Cossu *et al.*, 1997). Enfin, il est chimiquement incapable d'endommager l'ADN mais il peut accélérer les attaques à l'ADN en augmentant les niveaux de fer libre. Le fer ainsi libéré des ferritines va pouvoir participer aux réactions de peroxydation des membranes cellulaires (Cossu *et al.*, 1997).

La seconde étape de la réduction de l'oxygène moléculaire génère, par dismutation de l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), une molécule au temps de demi-vie relativement long (1 ms) qui peut donc davantage diffuser à travers l'organisme. La toxicité de cette molécule est liée à sa capacité à oxyder les groupements -SH. Ces oxydations peuvent être favorisées par la présence de métaux de transition (fer, cuivre) qui jouent alors le rôle de catalyseurs. On les appelle réactions de Fenton et Haber Weiss (Cossu *et al.*, 1997) :

$$O_2^{\bullet -} + Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$$

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^- \qquad \textbf{\textit{(Fenton)}}$$

$$\textbf{\textit{Bilan : } } H_2O_2 + O_2^{\bullet -} \rightarrow OH^- + OH^{\bullet} + O_2 \qquad \textbf{\textit{(Haber Weiss)}}$$

Ces réactions entraînent la fission homolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène, tout comme le feraient des réactions thermiques ou ionisantes (Cossu *et al.*, 1997) et conduisent toutes à la dernière ERO à être réduite lors de cette réaction, le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$), dont le temps de demi-vie est très faible (< 1µs) car extrêmement réactif. En conséquence, il a une très grande affinité avec les biomolécules mais uniquement au niveau de son site de production. Ces radicaux libres sont des oxydants redoutables, capables d'arracher

des électrons aux macromolécules organiques cellulaires, provoquant ainsi la peroxydation des lipides membranaires, l'oxydation de bases azotées de l'ADN (8OH-dG par exemple) ou de protéines (Cossu *et al.*, 1997 ; Mayer *et al.*, 2001).

II-2-1-2-) Sites de production des espèces réactives

Si les ERO sont généralement issues du métabolisme cellulaire, elles peuvent être aussi générées lors d'un dérèglement des systèmes de transport des électrons en période de stress. Les principaux sites de production de ces radicaux libres chez les plantes sont les chloroplastes, les mitochondries et les peroxisomes.

a) Les chloroplastes

Au niveau des chloroplastes, des électrons sont arrachés à l'eau, sous l'effet de la lumière, puis sont transférés à des accepteurs successifs, présents à l'état réduit. Simultanément, des molécules d'oxygène sont libérées. La cascade de réactions d'oxydoréduction qui s'ensuit aboutit à la formation d'énergie sous forme d'ATP, et à la réduction de $NADP^+$ en NADPH, molécules nécessaires à la synthèse de matière organique par l'intermédiaire du cycle de Calvin-Benson (Foyer *et al.*, 1997).

Une partie des électrons issus du clivage de l'eau peut être transférée à l'oxygène moléculaire. Cette réduction de l'oxygène (réaction de Mehler) aboutit à la formation d'ions superoxydes qui peuvent être par la suite être transformés en diverses espèces réactives (Foyer *et al.*, 1997).

Ainsi, le principal site de génération des radicaux superoxydes est le photosystème I, au niveau de la ferredoxine-$NADP^+$ réductase, mais aussi au niveau de la forme réduite de la monohydroascorbate réductase (Asada, 1999). Des travaux ont également signalé une production de radicaux superoxydes et hydroxyles au niveau des protéines Q_A et des phéophytines du photosystème II (Navari-Izzo, 1999).

b) les mitochondries

Les mitochondries reduisent l'oxygène en eau via la cytochrome *c* oxidase (Turrens, 1997). En condition physiologique normale, la production d'ERO est quasi-inexistante du fait

de la haute affinité du cytochrome *c* et seulement 1 à 2% de l'oxygène mitochondrial est converti en $O_2^{\bullet-}$ lors du fonctionnement des chaînes respiratoires (Turrens, 1997). Cette conversion a lieu essentiellement au niveau de la NADH déshydrogénase et du coenzyme Q (Halliwell et Gutteridge, 2000). En condition normale, des électrons sont transférés du NADH à la forme oxydée du coenzyme Q (UQ) pour produire sa forme réduite (UQH_2). Ce coenzyme Q réduit va alors transférer des électrons à la cytochrome *c* oxidase et être reconverti en UQ. Cette reconversion nécessite le passage par un stade intermédiaire, celui de l'anion semiquinone ($UQ^{\bullet-}$) (Kowaltowski et Vercesi, 1999).

En condition de stress abiotique, la membrane interne des mitochondries peut être désorganisée et les chaînes respiratoires perturbées. La production d'anion semiquinone sera augmentée et l'interaction de ce radical avec O_2 va générer une surproduction d'$O_2^{\bullet-}$ (Turrens, 1997). Ces anions vont pouvoir soit interagir avec le cytochrome c, soit diffuser dans la matrice mitochondriale où ils pourront être transformés en H_2O_2 via les Mn-SOD (voir section II-2-3-2). Le H_2O_2 ainsi formé pourra réagir avec le fer se trouvant dans les mitochondries pour former $OH^{\bullet}$ via la réaction de Fenton. (Halliwell et Gutteridge, 2000).

c) Les peroxysomes

Les principaux processus métaboliques responsables de la production d'H_2O_2 au niveau des peroxysomes sont la photorespiration via la glycolate oxydase; (Halliwell, 1976), la β-oxydation des acides gras et les réactions enzymatiques catalysées par les flavine-oxydases. Tenant compte de la diversité de ces molécules, un modèle du métabolisme peroxysomal a été proposé (Figure 2.13), montrant que ces organites peuvent libérer plusieurs ERO dans le cytosol.

Au niveau des peroxysomes des feuilles, la xanthine oxydase (XOD) est responsable de la production d'ions superoxydes. Sur la membrane peroxysomale, il existe un site de production des ions superoxydes NADPH-dépendant et formé d'une courte chaîne de transport d'électrons utilisant l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électrons (Corpas *et al.*, 2001).

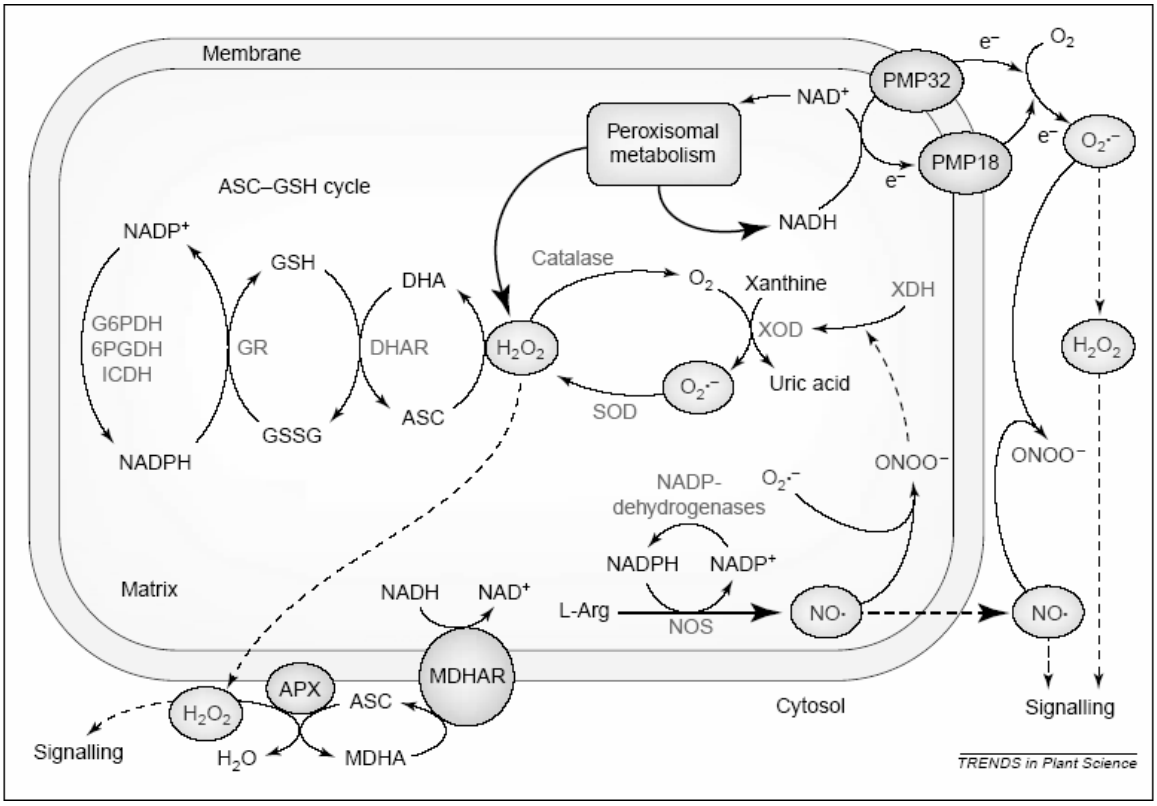


Figure 2.13. Mécanismes conduisant à la génération de radicaux libres au niveau des peroxysomes des tissus végétaux (Corpas *et al.*, 2001). *Abréviations : 6PGDH, 6-phosphogluconate déshydrogénase ; G6PDH, glucose-6-phosphate déshydrogénase ; ICDH, isocitrate déshydrogénase ; XDH, xanthine déshydrogénase. Les flèches en pointillés représentent des signaux.PMP18 et PMP32 sont des protéines membranaires.*

Les peroxysomes sont capables de produire d'autres molécules oxydantes comme l'oxyde nitrique ($NO^{\cdot}$), généré par l'oxyde nitrique synthase et qui peut réagir avec les ions superoxydes (issus de l'action de la XOD) pour former du peroxynitrite, un puissant oxydant. Notons également que cet oxyde nitrique peut diffuser à travers la membrane peroxysomale pour, entre autres, réagir avec les ions superoxydes présents dans le cytosol, générant de nouveau du peroxynitrite (Corpas *et al.*, 2001).

d) Autres sites de production

L'activation de l'oxygène par les systèmes microsomaux à cytochromes P450, pour assurer les biotransformations, peut produire parallèlement l'anion superoxyde. Ces systèmes assurent par exemple, en présence d'oxygène et d'une monooxygénase, l'hydroxylation de

molécules saturées (Godiard *et al*., 1998). Les monooxygénases disposent d'un système de transport d'électrons leur permettant d'assurer l'oxydation de nombreux xénobiotiques.

D'autres sites de production d'ERO ont également été mis en évidence au niveau de la membrane plasmique et de l'espace apoplasmique. Dans ce dernier, des peroxydases liées à la paroi cellulaire sont capables de générer du peroxyde d'hydrogène. Enfin, au niveau de la membrane plasmique, le système de production des ERO est une NADPH oxydase, apparemment analogue au système que l'on trouve chez les mammifères mais dont les mécanismes d'activation ne sont pas encore parfaitement connus (Bolwell, 1999).

II-2-2-) Rôles physiologiques des ERO

Dans les conditions normales, les processus oxydants sont impliqués dans divers mécanismes indispensables à la survie cellulaire (Inzé et Van Montagu, 1995) : la protéolyse (dégradation des protéines qui intervient aux différents stades de développement des végétaux), la formation de lignine au niveau des parois cellulaires, l'embryogenèse somatique (Kairong *et al.*, 1999), l'organogenèse (Tian *et al.*, 2003), les réactions d'hypersensibilité lors d'infections par des agents pathogènes, l'activation de gènes, la fermeture des stomates, le gravitropisme des racines ou la mort cellulaire programmée (MCP).

II-2-2-1-) Rôle dans la transduction des signaux

Le peroxyde d'hydrogène module l'expression de nombreux gènes, en particulier ceux codant pour des enzymes antioxydantes et des modulateurs de sa propre production. Desikan *et al.* (2001) ont montré que l'expression de 1 à 2% des gènes était altérée chez des cultures d'*Arabidopsis* traitées à l'H_2O_2. Dans ce cas, les gènes codant les enzymes antioxydantes étaient surexprimés, tout comme des gènes codant des protéines impliquées dans la MCP ou des protéines de signalisation (comme la calmoduline, des protéines kinases, des facteurs de transcription…), suggérant des effets à long terme. Bien que des promoteurs sensibles à H_2O_2 aient été identifiés (Desikan *et al.*, 2000), les séquences d'ADN responsables de la régulation par H_2O_2 n'ont pas encore été isolées et identifiées (Desikan *et al.*, 2001). De plus, les mécanismes de régulation sont encore à déterminer.

La MCP est initiée par une grande variété de stimuli et est dirigée par plusieurs signaux incluant H_2O_2 et NO (Darley-Usmar *et al.*, 1995 ; Pontier *et al.*, 1998 ; Mazel et

Levine, 2001). Bien que les mécanismes mis en jeu lors de la MCP ne soient pas encore bien connus (Kuriyama et Fukuda, 2002), on suppose qu'une modification de la perméabilité des membranes mitochondriales est impliquée (Beers et McDowell, 2001). L'interaction entre H_2O_2 et NO (Darley-Usmar *et al.*, 1995 ; Pontier *et al.*, 1998) serait d'une importance considérable dans le processus de MCP car, si H_2O_2 est un facteur clé de la MCP (Mazel et Levine, 2001), le rapport NO/ O_2^- détermine, lui, le taux de formation de peroxynitrite. Ainsi, Delledonne *et al.* (2002) propose un modèle (Figure 2.14) liant O_2^-, H_2O_2, NO et MCP. Selon leur modèle :

→ Si O_2^- > NO, NO est éliminé avant même qu'il ne réagisse avec H_2O_2 ;

→ Si O_2^- < NO, O_2^- est éliminé avant qu'il ne soit dismuté en H_2O_2.

Dans les deux cas, les éliminations conduisent à la formation de peroxynitrite ($ONOO^-$) qui n'est pas un intermédiaire essentiel de la MCP. Des variations de la concentration d'un des deux produits n'auraient donc aucun effet, conduisant inévitablement à la formation de peroxynitrite. Il existerait donc un équilibre optimum entre H_2O_2 et NO induisant la MCP.

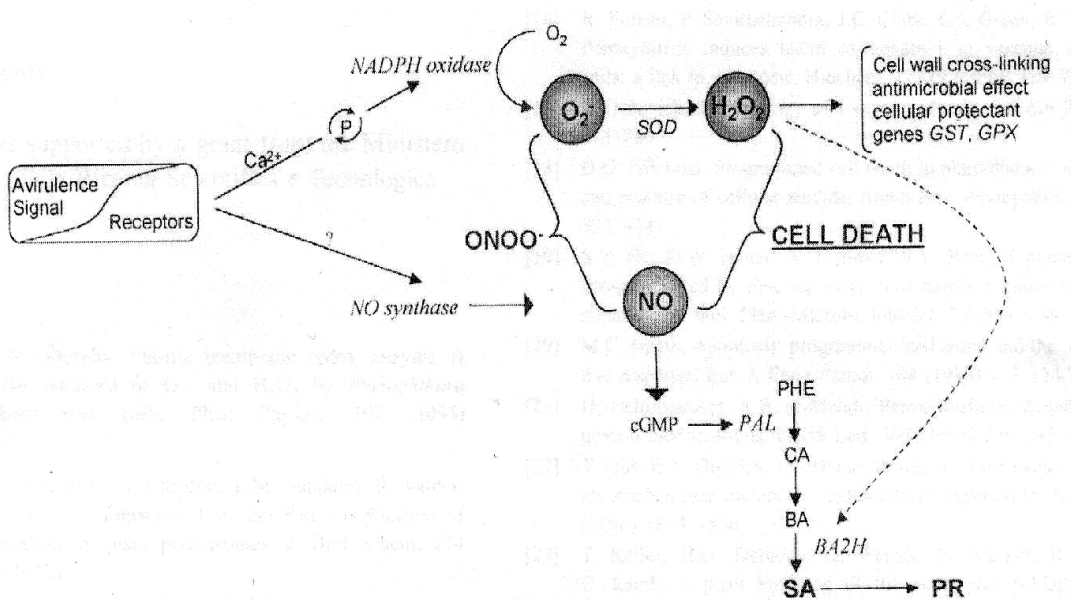


Figure 2.14. Modèle expliquant la relation entre ERO et MCP (Delledonne *et al.*, 2002)

Abréviations : ONOO-, peroxynitrite ; GST, glutathion-S-transférase ; GPX, Glutathion peroxydase ; PAL, phénylalanine ammonia-lyase ; CHS, chalcone synthase ; BA2H, benzoïc acid 2-hydroxylase ; PHE, phenylalanine ; CA, acide cinnamique; BA, acide benzoïque ; SA, acide salicylique; PR, pathogenesis-related proteins.

II-2-2-2-) Cas des réponses d'hypersensibilité

La production d'ERO est la première réponse détectée quelques minutes après une attaque par des pathogènes (De Gara *et al.*, 2003). Cette forte production de radicaux libres est due à une réaction biologique non spécifique. Après quelques heures, une seconde production de radicaux libres, massive et prolongée, appelée « explosion oxydative », se produit dans les cellules attaquées (Langebartels *et al.*, 2002). Cette cinétique à deux phases est typique des interactions plantes/pathogènes (Figure 2.15).

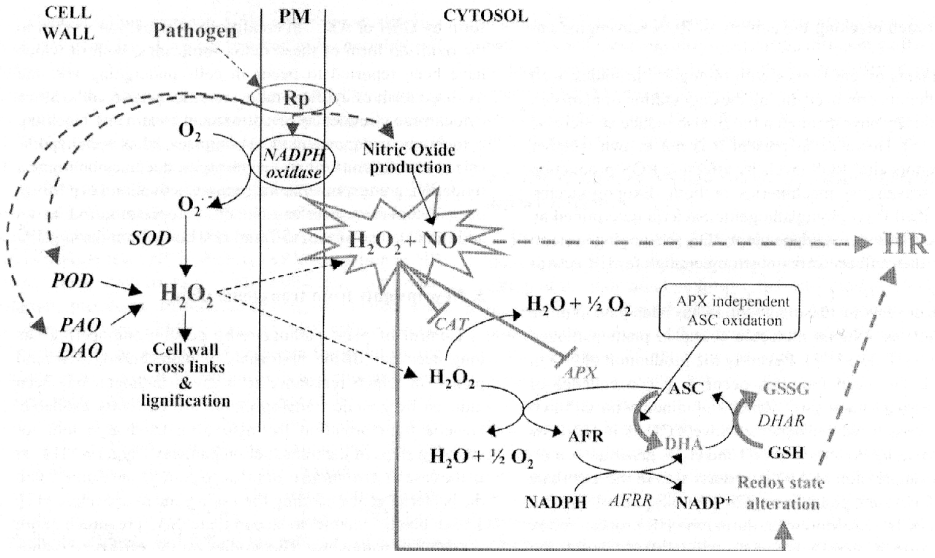


Figure 2.15. Réponse du système antioxydant durant une réponse d'hypersensibilité (De Gara *et al.*, 2003). Abréviations : APX, ascorbate peroxydase ; ASC, ascorbate ; AFR, « ascorbate free radical » ; AFRR, « ascorbate free radical reductase » ; CAT, catalase ; DAO, diamine oxydase ; DHA, acide déhydroascorbique ; DHAR, « dehydroascorbic acid reductase » ; GSH , glutathion ; GSSG, glutathion disulfide ; HR, « hypersensitive response » ; NO, oxyde nitrique ; PAO, polyamine oxidase ; PM, membrane plasmique ; POD, « secretory peroxidase » ; Rp, « receptor proteins » ; SOD, superoxide dismutase.

Le système primaire de production de radicaux libres serait un analogue de la NADPH oxydase (que l'on trouve chez les phagocytes de mammifères) lié à la membrane cellulaire (Bolwell et Wojtaszek, 1997). Cette enzyme transférerait les équivalents réduits du NADPH cytosolique à l'oxygène extracellulaire, générant des ions superoxydes (Figure 2.15). La SOD

apoplasmique pourrait alors produire du peroxyde d'hydrogène, empêchant la pénétration du microorganisme en facilitant les réactions des peroxydases qui catalysent les liaisons intra- et inter-moléculaires entre les composants structuraux des membranes cellulaires et la polymérisation de la lignine (Boudet *et al.*, 1996 ; Jouili et El Ferjani, 2003). Ces

L'augmentation conséquente des barrières mécaniques ralentirait alors la progression des pathogènes permettant ainsi aux cellules végétales de mettre en place de nouvelles défenses qui nécessitent plus de temps pour être activées : la résistance systémique acquise (RSA) qui correspond à la production d'antibiotiques (phytoalexines) et de protéines de défense (Dempsey et Klessig, 1995 ; Hancock *et al.*, 2002). Les ERO (en particulier H_2O_2 et NO) seraient impliquées dans la transduction des signaux nécessaires à la mise en place de cette RSA (Van Camp *et al.*, 1998 ; Durner et Klessig, 1999).

II-2-2-3-) Autres interventions

Selon certains auteurs, en plus de leurs rôles dans les réponses d'hypersensibilité et dans le processus de protéolyse, les ERO seraient également impliqués dans bien d'autres mécanismes physiologiques incluant :

a) la fermeture des stomates

Diverses études ont montré que (i) l'acide abscissique induit la synthèse d'H_2O_2 dans les cellules de garde, apparemment via la NADPH oxydase, et que (ii) l'H_2O_2 est un médiateur de la fermeture stomatale pouvant activer les canaux ioniques à Ca^{2+} et inhiber les courants d'ions K^+ de la membrane plasmique (Murata *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001).

b) le gravitropisme des racines

La capacité des organes végétaux à utiliser la gravité pour orienter leur croissance, ou gravitropisme, est reconnue depuis plus de deux siècles (Rosen *et al.*, 1999 ; Boonsirichai *et al.*, 2002). Ce processus physiologique, qui peut être observé au niveau des racines, des tiges et des coléoptiles, peut être découpé en quatre phases : la perception de la gravité (via les amyloplastes), la transduction d'un signal vers une région cible (via les statocytes), une croissance différentielle et l'autotropisme (Kutschera, 2001). Joo, *et al.* (2001) ont montré que

le peroxyde d'hydrogène était un des médiateurs des réponses gravitropiques régulées par l'auxine. En effet, une application asymétrique d'H_2O_2 ou d'antioxydants induit ou inhibe respectivement le gravitropisme. Il a également été démontré que les ERO agiraient en activant des kinases (Cervantes, 2001).

II-2-3-) Le réseau antioxydant

La réactivité des ERO les rend potentiellement dangereux vis-à-vis de tous les composants cellulaires. Heureusement, les plantes ont la capacité de faire face à ces composés à l'aide de systèmes permettant leur élimination. Ce réseau antioxydant prévient la formation excessive des radicaux libres ou limite leurs réactions avec les différentes structures biologiques (Chaudière et Ferrari-Iliou, 1999).

II-2-3-1-) Mode d'action du réseau antioxydant

En situation physiologique, il existe un équilibre entre la production d'ERO et leur élimination par les systèmes de défenses antioxydantes. Un stress oxydant se définira lorsqu'il y aura un déséquilibre profond entre systèmes antioxydants et pro-oxydants en faveur de ces derniers (Pincemail *et al.,* 2002). Dès lors, les cellules végétales nécessitent au moins deux mécanismes de régulation des concentrations intracellulaires en ERO : l'un qui va moduler la production d'ERO par rapport aux voies de signalisation décrites précédemment, l'autre permettant la détoxication des ERO en excès (Mittler, 2002).

a) Contrôle de la production des ERO

Compte tenu du fait que de nombreuses conditions abiotiques (*e.g.* lumière) sont accompagnées d'une augmentation de la production de ERO, des mécanismes permettant de contrôler ou diminuer ces productions entraîneront une diminution des risques de stress oxydant (Mittler, 2002). Ces mécanismes sont :

(i) des modifications physiologiques comme des mouvements des feuilles, le développement d'un épiderme adapté ou encore la mise en place de structures spécialisées cachant les stomates ;

(ii) des modifications métaboliques, en particulier chez les espèces ayant un métabolisme crassulacéen (Nultsch, 1998) ;

(iii) des mécanismes moléculaires, entraînant un réarrangement de l'appareil photosynthétique en fonction de l'intensité lumineuse, voire une suppression de la photosynthèse ou photoinhibition.

En équilibrant la quantité d'énergie absorbée par la plante et la disponibilité du CO_2, ces mécanismes limitent la réduction au niveau de l'appareil photosynthétique et le transfert d'électrons sur l'oxygène.

D'autre part, la production d'ERO peut être diminuée par une utilisation alternative des électrons au niveau de leurs chaînes de transport chloroplastiques et mitochondriales. Cette solution fait intervenir un groupe d'enzymes, appelées « alternative oxydases » (AOX), qui peuvent dévier le flux d'électrons au niveau de ces chaînes de transport et les utiliser pour réduire l'oxygène en eau (Mittler, 2002).

b) Destruction et élimination des ERO en excès

Chez les végétaux, la majeure partie des mécanismes d'élimination des ERO fait intervenir des enzymes comme la superoxyde dismutase (SOD), l'ascorbate peroxydase (APX) ou la catalase (CAT). Leur action est cruciale dans la régulation des concentrations des radicaux superoxydes et du peroxyde d'hydrogène. Cette régulation, couplée à la séquestration des ions métalliques, semble être d'une importance considérable dans la prévention de la formation de radicaux hydroxyles (Inzé et Van Montagu, 1995).

Les différences d'affinité pour H_2O_2 entre l'APX (ordre du µM) et la CAT (ordre du mM) suggèrent des rôles différents. Ainsi l'APX serait en charge des légères modulations des ERO tandis que la CAT serait responsable de la suppression des ERO en large excès durant les stress oxydants (Mittler, 2002). D'autres enzymes interviennent également dans l'élimination des ERO en excès, comme la SOD ou la guaïacol peroxidase (GPX), mais aussi des molécules non enzymatiques, comme l'ascorbate ou le glutathion (De Gara *et al.*, 2003).

II-2-3-2-) Les composantes du réseau antioxydant

Le réseau antioxydant implique diverses voies métaboliques catalysées ou non par des enzymes, et faisant intervenir aussi bien des molécules hydrophiles (que l'on trouvera au

niveau du cytosol) qu'hydrophobes (que l'on trouvera au niveau des membranes cellulaires). Généralement, on classe les molécules intervenant dans les processus de détoxication en deux groupes distincts : les antioxydants non enzymatiques et enzymatiques.

a) Antioxydants non enzymatiques

Il s'agit de pièges chimiques à radicaux libres et désactivateurs physiques pour des espèces excitées comme l'oxygène singulet. Les radicaux peroxyles, le fer tétravalent, l'oxygène singulet, ou les oxydants halogénés comme l'acide hypochlorique (Chaudière et Ferrari-Iliou, 1999) sont éliminés par ces molécules.

(i) Les antioxydants non enzymatiques hydrophiles se retrouvent au niveau du cytosol, des mitochondries ou des noyaux cellulaires. Les plus importants de ces composés sont (Gérard-Monnier et Chaudière, 1996) :

a) Au pH physiologique, ***l'acide ascorbique*** AH_2 est entièrement sous la forme de sa base conjuguée AH^- (Horemans *et al.*, 2000) ce qui explique pourquoi il réagit comme un donneur d'électrons (Foyer et Mullineaux, 1998): $AH^- + X^\cdot \rightarrow AH^\cdot + X^-$

b) Le ***glutathion*** peut perdre un proton à partir de son groupement –SH et se comporter, dès lors, comme un donneur d'électrons, capable de chélater les métaux par exemple (Dixon *et al.*, 1998), pour agir de la façon suivante : $GSH + X^\cdot \rightarrow GS^\cdot + XH$

c) ***L'ergothionéine*** est synthétisée uniquement par des champignons et des mycobactéries (Aruoma *et al.*, 1999). Elle est absorbée par les plantes via les racines. Elle réagit essentiellement avec le peroxynitrite et intervient dans l'épuration des radicaux hydroxyles (Aruoma *et al.*, 1997). Elle peut également désactiver l'oxygène singulet.

(ii) Les antioxydants non enzymatiques hydrophobes se trouvent en majeure partie dans les lipoprotéines et les membranes où ils empêchent la propagation de la peroxydation lipidique en détruisant les radicaux peroxyles ou en bloquant la formation d'hydroperoxydes à partir de l'oxygène singulet (Halliwell et Chirico, 1993) :

a) ***La vitamine E ou α-tocophérol*** (α TOH) est l'antioxydant le plus efficace vis-à-vis des radicaux peroxyles dans les membranes phospholipidiques ($LOO^\cdot$). La vitamine E élimine les radicaux peroxyles lipidiques selon la réaction suivante : $\alpha\ TOH + LOO^\cdot \rightarrow \alpha\ TO^\cdot + LOOH$

b) ***L'ubiquinol*** est un antioxydant membranaire qui agit plus rapidement que la vitamine E. Sa forme déprotonée peut jouer le rôle de donneur d'électrons et peut intervenir dans le recyclage de la vitamine E, en particulier dans les liposomes (Kagan *et al.*, 1994)

c) ***Les caroténoïdes*** jouent essentiellement un rôle de désactivateurs physiques de l'oxygène singulet, en particulier dans le cas du lycopène (Sundquist *et al.*, 1994), mais ils sont aussi capables d'éliminer des radicaux libres, comme le β-carotène qui joue un rôle significatif dans l'élimination des radicaux peroxyles lipidiques (Palozza et Krinsky, 1992).

b) Enzymes antioxydantes

Les enzymes antioxydantes sont responsables de la destruction des ions superoxydes et hydroperoxydes qui sont, par nature, bien plus réactifs que les ions pris en charges par les antioxydants non enzymatiques (Chaudière et Ferrari-Iliou, 1999).

(i) Les superoxyde dismutases comportent un métal de transition (fer, manganèse, cuivre ou zinc) dans le site actif pouvant capter un électron de l'anion superoxyde par une réaction de dismutation et le transférer au noyau imidazole de l'une des histidines du site actif selon la réaction (Fridovich, 1997) :

$$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Chez les végétaux, on les trouve dans de nombreux compartiments cellulaires et extracellulaires : les Cu/Zn-SOD sont localisées au niveau chloroplastique et cytosolique tandis que les Fe-SOD sont localisées dans les chloroplastes et les peroxysomes. La Mn-SOD est présente, quant à elle, uniquement au niveau de la matrice mitochondriale (Cossu *et al.*, 1997).

(ii) La catalase est une enzyme à faible affinité présentant des niveaux d'activité élevés et agissant le plus souvent en association avec les SODs. Cette enzyme contenant de la porphyrine, est capable de détruire le peroxyde d'hydrogène à forte concentration en catalysant sa dismutation en oxygène et eau (Schonbaum et Chance, 1976) :

$$2H_2O_2 \rightarrow 2\,H_2O + O_2$$

Il arrive également que la catalase se comporte comme une peroxydase, pour de faibles concentrations en peroxyde d'hydrogène, utilisant des co-substrats réduits (RHXH) comme l'ascorbate ou des phénols :

$$RHXH + H_2O_2 \rightarrow RX + 2\ H_2O$$

Chez les végétaux, la catalase se rencontre uniquement au niveau des peroxysomes et des glyoxysomes où elle détoxifie le peroxyde d'hydrogène produit par la photorespiration (Cossu *et al.*, 1997 ; Smirnoff, 1998). Par ailleurs, Willekens *et al.* (1997) ont montré que la catalase était fortement induite lorsque les concentrations intracellulaires en H_2O_2 étaient très élevées, tandis que pour de plus faibles concentrations, ce sont les peroxydases (enzymes à plus forte affinité) et en particulier l'ascorbate peroxydase (APX) qui sont sollicitées par la plante.

(iii) Les peroxydases (POX) permettent, comme les catalases, la réduction de H_2O_2 en eau. Cependant, à la différence des catalases, les POX nécessitent la présence d'un substrat particulier. Chez les végétaux, on distingue :

- ***l'ascorbate peroxydase*** (APX), qui intervient dans le cycle glutathion/ascorbate, rencontré au niveau des chloroplastes, du cytosol, des mitochondries et des peroxysomes. Le peroxyde d'hydrogène est supprimé par l'APX et l'ascorbate est régénéré par le cycle ascorbate/glutathion qui met en jeu la monodéhydroascorbate réductase (MDAR), la déhydroascorbate réductase (DHAR) et la glutathion réductase (Inzé et Van Montagu, 1995 ; Noctor and Foyer, 1998 ; Foyer and Noctor, 2000 ; Paradiso *et al.*, 2008).

- ***la glutathion peroxydase*** (Se-GPx), une sélénoenzyme que l'on trouve uniquement au niveau du cytoplasme et qui catalyse la réduction des hydroperoxydes aux dépens du glutathion (Ursini *et al.*, 1995) :

$$H_2O_2 + 2\ GSH \rightarrow 2\ H_2O + GSSG$$

- ***la guaïacol peroxydase*** (GPX) oxyde le guaïacol (o-méthoxyphénol) et on la trouve essentiellement au niveau du cytosol, des vacuoles, de l'apoplasme ou de la paroi cellulaire. Cette enzyme serait également impliquée dans différents phénomènes liés à la croissance

végétale tels que l'élongation et la différenciation cellulaire (De Marco *et al.*, 1999 ; Liszkay *et al.*, 2004).

Les composantes du système antioxydant n'agissent donc pas de manière individuelle mais sont en relation les unes avec les autres (Figure 2.16). Les mécanismes de régulation et de coordination de ce système sont encore mal connus (Foyer et Noctor, 2005 ; Couée *et al.*, 2006 ; Noctor, 2006)

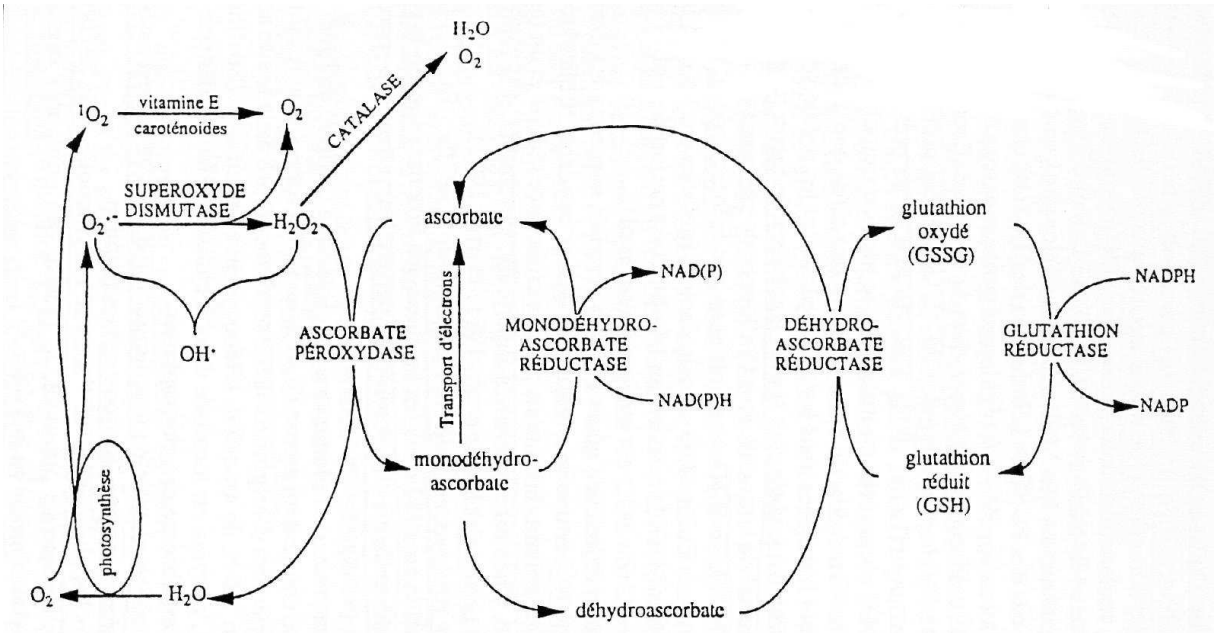


Figure 2.16. Représentation de la production et des voies de destruction des espèces réactives de l'oxygène dans les tissus végétaux (Cossu *et al*., 1997).

II-2-4-) Conséquences du stress oxydant

Les ERO non neutralisées peuvent engendrer de nombreux dégâts cellulaires incluant des altérations des lipides, des protéines et des acides nucléiques.

II-2-4-1-) La peroxydation lipidique

La membrane plasmique constitue une cible importante des ERO. Chez les plantes, il a été montré que le cuivre pouvait endommager la membrane par oxydation des protéines

membranaires, peroxydation lipidique (Dietz *et al.*, 1999) ou inhibition des ATPases (Meharg, 1993). De fait, la perméabilité sélective de la membrane ne serait plus assurée et l'entrée des métaux toxiques par diffusion serait facilitée (Kabata-Pendias and Pendias, 2001), conduisant à de multiples dommages cellulaires et une situation de cytotoxicité.

II-2-4-2-) Les dommages à l'ADN

Les ERO vont endommager les bases mais aussi les sucres. Par ailleurs, les produits de la peroxydation lipidique peuvent eux-aussi interagir avec l'ADN (revue par Roldan-Arjona et Ariza, *in press*).

II-2-4-3-) Les dommages aux protéines

Il a été démontré que les cellules augmentaient leur taux de protéolyse après exposition à des agents du stress oxydant. L'hypothèse prédominante est que les protéines intracellulaires oxydées par les radicaux libres seraient préférentiellement dégradées par les enzymes protéolytiques (Figure 2.17). Cette sélection serait possible par la détection des groupements carbonyls produits lors de l'oxydation (Reinheckel *et al.*, 1998).

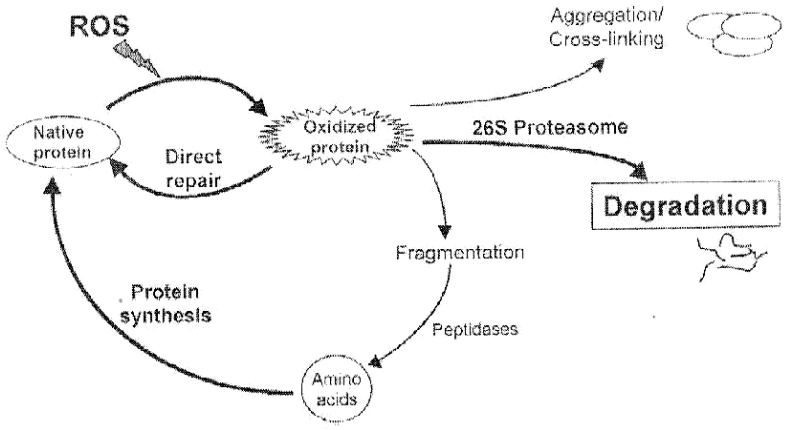


Figure 2.17. Modèle de dégradation des protéines oxydées (d'après Palma *et al.*, 2002).

II-2-4-4-) Production de protéines de choc thermique

Les protéines de choc thermique (HSP), déjà réputées pour leur implication dans divers stress abiotiques, pourraient également jouer un rôle dans la tolérance aux métaux

toxiques. En effet, des stress très variés, ayant en commun de dénaturer les protéines (stress protéotoxique), sont capables d'induire cette réponse de type « choc thermique ».

L'induction des HSP par le stress protéotoxique permet à la cellule de réparer les dommages protéiques ainsi occasionnés par resolubilisation des agrégats, renaturation des polypeptides ou, si cela est impossible, par l'engagement des protéines dénaturées vers les voies de dégradation (protéolyse). Ainsi, les résultats obtenus sur des cellules de tomate ont établi que l'action d'H_2O_2 induisait la synthèse de protéines de choc thermique (Banzet *et al.*, 1998). De la même façon, chez des cellules de *Lycopersicon peruvianum* exposées à 1 mM de cadmium, on observe des quantités significatives d'Hsp70 au niveau du plasmalemme, de la membrane mitochondriale et du réticulum endoplasmique, sièges de multiples dégâts du stress oxydant provoqué par les métaux lourds (Neumann *et al.*, 1994).

Conclusion

Les métaux lourds biodisponibles peuvent être absorbés par les plantes et perturber de nombreuses fonctions physiologiques, soit en interagissant directement avec certains processus cellulaires (respiration mitochondriale, transferts d'électrons au niveau des chloroplastes…), soit en induisant une production d'ERO capables d'interagir et altérer les macromolécules biologiques (ADN, protéines, lipides membranaire). Pour limiter ces actions toxiques, les plantes disposent de nombreux systèmes de défense comprenant des chélateurs de métaux (phytochélatines, acides organiques…) et des antioxydants.

Les effets des éléments métalliques sur les défenses antioxydantes et leurs possibles conséquences au niveau cellulaire (dommages aux lipides, protéines et acides nucléiques) ont été largement étudiés en conditions de laboratoire (Tableau 2.4.). La plupart des métaux étudiés correspondent à ceux trouvés fréquemment dans les sols industriels (arsenic, cadmium, cuivre, mercure, plomb ou zinc) mais la majorité des espèces testées sont d'intérêt agronomique, présentant un intérêt écologique limité. De plus, une grande partie de ces expérimentations utilisent des cultures en milieux hydroponiques et non en sols contaminés. Le tableau ci-dessous témoigne du caractère universel des réponses antioxydantes des plantes soumises à une exposition métallique. Les réponses antioxydantes apparaissent complexes, les activités enzymatiques étant tantôt augmentées, tantôt diminuées. Néanmoins, lorsqu'elles ont été évaluées, les atteintes cellulaires semblent systématiquement significatives.

			Enzymes antioxydantes					Autres systèmes			Dommages			
Métal	**Espèce**	**Milieu d'exposition**	SOD	CAT	APX	GPX	GR	GSH	PC	ASC	Prot	ADN	Perox	**Références**
Al	*Helianthus annuus*	Hydroponique	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	Pena *et al.* (2008)
As	*Trifolium pratense*	Sol contaminé	↑↓	nd	nd	↑↓	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	Mascher *et al.* (2002)
Cd	*Brassica juncea*	Hydroponique	nd	nd	nd	nd	↑↓	↑↓	↑↓	nd	nd	nd	nd	Seth *et al.* (2008)
	Capsicum annuum	Hydroponique	↑	↓	nd	↑	↑	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Leon *et al.* (2002)
	H. annuus	Hydroponique	↓	↓	↓	nd	↓	↓	nd	nd	nd	nd	↑	Gallego *et al.* (1996)
	Hordeum vulgare	Hydroponique	nd	-	↑	↑	nd	nd	nd	nd	nd	nd	↑	Hegedüs *et al.* (2001)
	Oryza sativa	Agarose contaminé	nd	nd	nd	nd	nd	↑↓	↑	nd	nd	↑	nd	Aina *et al.* (2007)
	Phaseolus vulgaris	Hydroponique	nd	↓	↑	↑	↑	nd	nd	nd	nd	nd	↑	Chaoui *et al.* (1997)
	Solanum tuberosum	Hydroponique	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	↑	nd	Gichner *et al.* (2008a)
	Vicia faba	Hydroponique	↑↓	↓	nd	↓	nd	nd	nd	nd	nd	↑	↑	Lin *et al.* (2007)
	Zea mays	Hydroponique	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	↑	nd	nd	Pena *et al.* (2007)
Co	*H. annuus*	Hydroponique	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	↑	nd	nd	Pena *et al.* (2008)
Cr	*H. annuus*	Hydroponique	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	Pena *et al.* (2008)
	Pistia stratiotes	Hydroponique	↑↓	nd	↑↓	↑	nd	nd	nd	↑↓	nd	nd	↑	Sinha *et al.* (2005)
Cu	*H. annuus*	Hydroponique	↑	↓	↓	nd	↓	↓	nd	nd	nd	nd	↑	Gallego *et al.* (1996)
	H. annuus	Hydroponique	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	↑	nd	nd	Pena *et al.* (2008)
	Hydrilla verticillata	Hydroponique	↑	↑↓	↑	↑↓	↑↓	↓	↑	nd	nd	nd	↑	Srivastava *et al.* (2006)
	O. sativa	Solution contaminée	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	↑	Ahsan *et al.* (2007)
	Zea mays	Perlite/Solution de Hewitt	↑	nd	↑	↑	↑	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Taniolaç *et al.* (2007)
Fe	*Bacopa monnieri*	Hydroponique	↑↓	nd	↑↓	↑↓	nd	nd	nd	↑↓	nd	nd	↑	Sinha et Saxena (2006)
	H. annuus	Hydroponique	↓	↓	↓	nd	↓	↓	nd	nd	nd	nd	↑	Gallego *et al.* (1996)

Tableau 2.4. (début)

			Enzymes antioxydantes					Autres systèmes			Dommages			
Métal	**Espèce**	**Milieu d'exposition**	SOD	CAT	APX	GPX	GR	GSH	PC	ASC	Prot	ADN	Perox	**Références**
Hg	*H. annuus*	Hydroponique	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	↑	nd	nd	Pena *et al.* (2008)
	Medicago sativa	Hydroponique	↑	↑	↑	↑	↑	↑	nd	-	nd	nd	↑	Zhou *et al.* (2008)
Ni	*H. annuus*	Hydroponique	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	↑	nd	nd	Pena *et al.* (2008)
Pb	*Ceratophyllum demersum*	Hydroponique	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↓	↑	nd	nd	nd	↑	Mishra *et al.* (2006)
	H. annuus	Hydroponique	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	Pena *et al.* (2008)
	Nicotiana tabacum	Hydroponique	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	↑	nd	Gichner *et al.* (2008b)
Zn	*H. annuus*	Hydroponique	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	Pena *et al.* (2008)
	P. vulgaris	Hydroponique	nd	↓	↑	↑	↑	nd	nd	nd	nd	nd	↑	Chaoui *et al.* (1997)

Tableau 2.4. (suite). Réponses antioxydantes et dommages oxydatifs observés chez des plantes en conditions de stress métallique. Légendes : ↑ hausse, ↓ baisse, ↑↓ observation d'un effet « courbe en cloche », - pas d'effet significatif ; nd, non déterminé. Abréviations : PC, phytochélatines ; ASC, ascorbate ; Prot, dommages aux protéines ; ADN : dommage à l'ADN ; Perox : peroxydation lipidique.

Sur un plan appliqué, les connaissances acquises concernant les mécanismes d'action toxique des métaux ont permi d'identifier des réponses cellulaires dont la prise en compte pourrait aider à établir des diagnostics environnementaux (Garrec et Van Haluwyn, 2002). Ainsi, en parallèle des approches classiques basées sur l'utilisation de bioessais (Gombert et Galsomiès, 2005), ces réponses permettraient d'évaluer la biodisponibilité des polluants et leurs effets : c'est le concept de biomarqueur (Lagadic *et al*., 1997). Néanmoins, la validation de telles techniques nécessite des études préalables proches des réalités de terrain. Le tableau 2.5 repertorie quelques travaux initiés en ce sens. Il s'agit d'études pour lesquelles des mesures de reponses antioxydantes (deux études seulement), ou de dommages cellulaires (sept études) ont été mesurées chez des espèces exposées, en conditions de laboratoire, à des matrices multicontaminées. Dans le cas des réponses anti-oxydantes, le faible nombre d'étude traduit un manque dans la validation de ce type d'outil. Toutefois, les deux études mentionnées ont apporté des résultats encourageants puisque la majorité des marqueurs mesurés ont présenté une même tendance à la hausse des activités.

			Enzymes antioxydantes					Autres systèmes			Dommages			
Métal	**Espèce**	**Type d'exposition**	SOD	CAT	APX	GPX	GR	GSH	PC	ASC	Prot	DNA	Perox	**Références**
Cu, Cd, Cr, Zn, Fe, Ni, Mn, Pb	*Triticum aestivum*	Effluents de tannerie	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	↑	nd	nd	↑	Chandra *et al.* (2008)
	Brassica campestris		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	↑	nd	nd	↑	
Fe, Zn, Mn, Cu, Cr, Pb	*Trigonella foenum-graecum*	Sols amendés par des boues de tannerie	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	↑	nd	nd	↑↓	Sinha *et al.* (2007a)
Fe, Zn, Mn, Cu, Cr	*Spinacia oleracea*	Sols amendés par des boues de tannerie	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	↑↓	nd	nd	↑	Sinha *et al.* (2007b)
Cd, Pb, Cu, Fe	*Vicia faba*	Extraits aqueux de cendres d'incinération de déchets	↑	↑	nd	↑	↑↓	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Radetski *et al.* (2004)
Cr, Fe, Zn, Mn	*Brassica juncea*	Sols amendés par des boues de tannerie	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	↑↓	nd	nd	↑	Singh et Sinha (2005)
	Helianthus annuus		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	↑↓	nd	nd	↑	Singh *et al.* (2004)
Cd, Pb, Zn	*Trifolium repens*	Sol contaminé	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	↑	Bidar *et al.* (2007)
	Lolium perenne		-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	↑	
Al, Cd, Cu	*Hordeum vulgare*	Milieu hydroponique	↑	nd	nd	↑	nd	nd	nd	nd	nd	nd	↑	Guo *et al.* (2007)
Cd, Cu, Pb, Zn	*Nicotiana tabacum*	Sol contaminé	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	↑	nd	Gichner *et al.* (2006)
	Solanum tuberosum		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	↑	nd	

Tableau 2.5. Réponses antioxydantes et dommages oxydatifs observés chez des plantes exposées à des milieux contaminés en éléments métalliques. Légendes : ↑ hausse, ↓ baisse, ↑↓ observation d'un effet « courbe en cloche », - pas d'effet significatif ; nd, non déterminé. Abbréviations : PC, phytochélatines ; ASC, ascorbate ; Prot, dommages aux protéines ; ADN : dommage à l'ADN ; Perox : peroxydation lipidique.

Dans le cas des atteintes cellulaires, le recul est plus important. Les données témoignent de hausses des altérations membranaires (peroxydation lipidique) et des dommages à l'ADN chez les plantes exposées aux matrices multicontaminées.

Le bilan de ces travaux de terrains fait apparaître un manque d'informations pour les réponses de defense. De plus, ces données ne sont pas associées à des données relevant de niveau d'observation biologiques plus élevés comme l'individu (croissance), les populations et encore moins les communautés.

Références

Adriano, D.C., 2001. *Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals*. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, 885 pp.

Ahsan, N., Lee, D.G., Lee, S.H., Kang, K.Y., Lee, J.J., Kim, P.J., Yoon, H.S., Kim, J.S., Lee, B.H., 2007. Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. *Chemosphere* 67, 1182-1193.

Aina, R., Labra, M., Fumagalli, P., Vannini, C., Marsoni, M., Cucchi, U., Bracale, M., Sgorbati, S., Citterio, S., 2007. Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots. *Environ. Exp. Bot.* 59, 381-392.

Alloway, B.J., 1995. Soil processes and the behaviour of heavy metals. *In*: Alloway, B.J. (Ed.). *Heavy metals in soils*. Chapman & Hall, London, pp. 11-35.

An, Y.J., 2004. Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. *Environ. Pollut.* 127, 21-26.

An, Y.J., 2006. Assessment of comparative toxicities of lead and copper using plant assay. *Chemosphere* 62, 1359-1365.

Ares, A., Hwang, S.G., Miyasaka, S.C., 1996. Taro response to different iron levels in hydroponic solution. *J. Plant. Nutr*. 19, 281-292.

Aruoma, O.I., Spencer, J.P.E., Mahmood, N., 1999. Protection against oxidative damage and cell death by the natural antioxydant ergothioneine. *Food Chem. Toxicol.* 37, 1043-1053.

Aruoma, O.I., Whiteman, M., England, T.G., Halliwell, B., 1997. Antioxydant action of ergothioneine: assessment of its ability to scavenge peroxynitrite. *Bioch. Bioph. Res. Com*. 231, 389-391.

Asada, K., 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physio. Plant Mol. Biol.* 50, 601-639.

Banzet, N., Richaud, C., Deveaux, Y., Kazmaier, M., Gagnon, J., Triantaphylides, C., 1998. Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptative response in tomato cells. *Plant J.* 13, 519-527.

Barcelo, J., Vazquez, M.D., Poschenrieder, C., 1988. Structural and ultrastructural disorders in cadmium treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *New Phytol*. 108, 37-49.

Beers, E.P., McDowell, J.M., 2001. Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. *Curr.Opin.Plant Biol*. 4, 561-567.

Béraud, E., Cotelle, S., Leroy, P., Férard J.F., 2007. Genotoxic effects and induction of phytochelatins in the presence of cadmium in *Vicia faba* roots. *Mutat. Res*. 633, 112-116.

Bert, V., Macnair, M.R., De Laguerie, P., Saumitou-Laprade, P., Petit, D., 2000. Zinc tolerance and accumulation in metallicolous and nonmetallicolous populations of *Arabidopsis halleri* (*Brassicaceae*). *New Phytol*. 146, 225-233.

Bidar, G., Garçon, G., Pruvot, C., Dewaele, D., Cazier, F., Douay, F., Shirali, P., 2007. Behavior of *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal contaminated field: Plant metal concentration and phytotoxicity. *Environ. Pollut*. 147, 546-553.

Blanchard, C., 2000. Caractérisation de la mobilisation potentielle des polluants inorganiques dans les sols pollués. Thèse : Ecole Doctorale de Chimie de Lyon, 302 pp.

Bolwell, G.P., 1999. Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr. Opi. Plant Biol.* 2, 287-294.

Bolwell, G.P., Wojtaszek, P., 1997. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiol. Mol. Plant Pathol*. 51, 347-366.

Boonsirichai, K., Guan, C., Chen, R., Masson, H., 2002. Root gravitropism: an experimental tool to investigate basic cellular and molecular processes underlying mechanosensing and signal transmission in plants. *Ann. Rev. Plant Biol*. 53, 421-447.

Boudet, A.M., Inze, D.G., Schuch, W.W., 1996. Modification of lignin synthesis in plants. *Biotech. Adv*. 14, 481.

Briat, J.F., Lebrun, M., 1999. Plant responses to metal toxicity. *Plant Biology and Pathology* 322, 43-54.

Brooks, R.R., 1998. Geobotany and hyperaccumulators. *In*: Brooks, R.R. (Ed.). Plants that hyperaccumulate heavy metals. CABI Publishing, Wallingford, pp. 55-94.

Brun, L.A., Le Corff, J., Maillet, J., 2003. Effects of elevated soil copper on phenology, growth and reproduction of five ruderal plant species. *Environ. Pollut*. 122, 361-368.

Brune, A., Urbach, W., Dietz, K.J., 1994. Compartimentation and transport of zinc in barley primary leaves as basic mechanisms involved in zinc tolerance. *Plant Cell Environ.* 17, 153-162.

Bruns, I., Friese, K., Markert, B., Krauss, G.-J., 1997. The use of *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. as a bioindicator for heavy metals. 2. Heavy metal accumulation and physiological reaction of *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. in active biomonitoring river Elbe. *Sci. Total Environ*. 204, 161-176.

Cavalini, A., Natali, L., Durante, M., Maserti, B., 1999. Mercury uptake, distribution and DNA affinity in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) plants. *Sci. Tot. Envion*. 243, 119-127.

Cazalé, A.C., Clemens, S., 2001. *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional phytochelatin synthase. *FEBS Letters* 507, 215-219.

Cervantes, E., 2001. ROS in root gravitropism: the auxin messengers ? *Plant Sci*. 6, 556.

Chaignon, V., 2001. Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées. Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides. Thèse : Ecole doctorale, Sciences de l'Environnement : Système Terre, Université d'Aix-Marseille, 183 pp.

Chardonnens, A.N., Koevoets, P.L.M., Van Zanten, A., Schat, H., Verkleij, J.A.C., 1999. Properties of enhanced tonoplast zinc transport in naturally selected zinc-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Physiol*. 120, 779-785.

Chaudière, J., Ferrari-Iliou, R., 1999. Intracellular Antioxydants: from Chemical to Biochemical Mechanisms. *Food Chem. Toxicol.* 37, 949-962.

Chugh, L.K., Shawney, S.K., 1999. Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in presence of cadmium. *Plant Physiol. Biochem*. 37, 297-303.

Clemens, S., Palmgren, M.G., Krämer, U. 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci*. 7, 309-315.

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

Clemens, S., Schroeder, J.I., Dengenkold, T., 2001. *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. *Eur. J. Biochem*. 268, 3640-3643.

Cobbett, C., 1999. A family of phytochelatin synthase genes from plant, fungal and animal species. *Trends Plant Sci*. 4, 335-337.

Cobbett, C., Goldsbrough, P., 2000. Mechanisms of metal resistance: phytochelatins and metallothioneins. *In*: Raskin, I., Ensley, B.D. (Eds) Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment. John Wiley & Sons, New-York, pp 247-269.

Cobbett, C., Goldsbrough, P., 2002. Phytochelatins and metallothioneines: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol*. 53, 159-182.

Corpas, F.J., Barroso, J.B., Del Rio, L.A., 2001. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci*. 6, 145-150.

Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Vasseur, P., 1997. Mécanismes de formation et effets des espèces réactives de l'oxygène. *In* : Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. (Eds) *Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux*, Masson, Paris, pp. 125-148.

Couée, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., El Amrani, A., 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot*. 57, 449-459.

Da Rosa Correa, A.X., Rorig, L.R., Verdinelli, M.A., Cotelle, S., Férard, J.F., Radetski, C.M. 2006. Cadmium phytotoxicity: Quantitative sensitivity relationships between classical endpoints and antioxidative enzyme biomarkers. *Sci. Total Environ*. 357, 120-127.

Dahmani-muller, H., Van Oort, F., Gelie, B., Balabane, M., 1999. Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environ. Pollut*. 109, 1-8.

Darley-Usmar, V., Wiseman, H., Halliwell, B., 1995. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Letters* 369, 131-135.

Dazy, M., Béraud, E., Cotelle, S., Meux, E., Masfaraud, J.F., Férard, J.F., 2008. Antioxidant enzyme activities as affected by trivalent and hexavalent chromium species in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere* 73, 281-290.

De Gara, L., de Pinto, M.C., Tommasi, F., 2003. The antioxidant system vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant. Physiol. Bioch*. 41, 863-870.

De Knecht, J.A., Van Baren, N., Ten Brookum, W.M., Fong Sang, H.W.W., Koevets, P.L.M., Schat, H., Verkleij, J.A.C., 1995. Synthesis and degradation of phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Sci*. 106, 9-18.

De Marco, A., Guzzardi, P., Jamet, E., 1999. Isolation of Tobacco isoperoxidases accumulated in cell-suspension culture medium and characterization of activities related to cell wall metabolism. *Plant Physiol*. 120, 371-382.

Delledonne, M., Murgia, I., Ederle, D., Sbicego, P.F., Biondani, A., Polverani, A., Lamb, C., 2002. Reactive oxygen intermediates modulate nitric oxide signalling in the plant hypersensitive disease resistance response. *Plant Physiol. Biochem*. 40, 605-610.

Dempsey, D.A., Klessig, D.F., 1995. Signals in plant disease. *Bull. Inst. Pasteur* 93, 167-186.

Deneux-Mustin, S., Roussel-Debet, S., Mustin, C., Henner, P., Munier-Lamy, C., Colle, C., Berthelin, J., Garnier-Laplace, J., Leyval, C., 2003. Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces : influence des micro-organismes du sol. TEC & DOC (Ed), Paris, 282 pp.

Desikan, R., Mackerness, S.A.H., Hancock, J.T., Neill, S.J., 2001. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol*. 127, 159-172.

Desikan, R., Neill, S.J., Hancock, J.T., 2000. Hydrogen peroxide induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Free Radical Biol. Med.* 28, 773-778.

Dietz, K.J., Baier, M., Kramer, U., 1999. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. *In*: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems. Springer-Verlag, Berlin, pp. 73-97.

Dixon, D.P., Cummins, I., Cole, D.J., Edwards, R., 1998. Glutathione mediated detoxication systems in plants. *Cur. Opi. Plant Biol*. 1, 258-266.

Duchaufour, PH., 1995. Pédologie : sol, végétation, environnement. Masson (Ed), Paris, 324 pp.

Durner, J., Klessig, D.F., 1999. Nitric oxyde as a signal in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 2, 369-374.

Ebbs, S., Lau, I., Ahner, B.A., Kochian, L., 2002. Phytochelatin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Planta* 214, 635-640.

Eide, D., Broderius, M., Fett, J., Guerinot, M.L., 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 93, 5624-5628.

Foy, C.D., Chaney, R.L., White, M.C., 1978. The Physiology of metal toxicity in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 29, 511-566.

Foyer, C., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F., Scott, I.M., 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plant*. 100, 241-254.

Foyer, C., Mullineaux, P.M., 1998. The presence of dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase in plant tissues. *FEBS Letters* 425, 528-529.

Foyer, C.H., Noctor, G., 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytol*. 146, 359-388.

Foyer, C.H., Noctor, G., 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants : a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.* 28, 1056-1071.

Fridovich, I., 1997. Superoxide anion radical, superoxide dismutases and related matters. *J. Biol. Chem.* 272, 18515-18517.

Fusconi, A., Repetto, O., Bona, E., Massa, N., Gallo, C., Dumas-Gaudot, E., Berta, G., 2006. Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 58, 253-260.

Gallego, S.M., Benavides, M.P., Tomaro, M.L., 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves : evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci*. 121, 151-159.

Garrec, J.P., Van Haluwyn, C., 2002. *Biosurveillance végétale de la qualité de l'air – Concepts, méthodes et applications*. Tec&Doc (Ed), Paris, 117 pp.

Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E.L., Zenk, M.H., 1989. Survey of the plant kingdom for the ability to bind heavy metals through phytochelatins. *Zeit Naturforsch* 44c, 361-369.

Gichner, T., Patkova, Z., Szakova, J., Demnerova, K., 2006. Toxicity and DNA damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 65, 420-426.

Gichner, T., Patkova, Z., Szakova, J., Znidar, I., Mukherjee, A., 2008a. DNA damage in potato plants induced by cadmium, ethyl methanesulphate and γ-rays. *Environ. Exp. Bot*. 62, 113-119.

Gichner, T., Znidar, I., Szakova, J., 2008b. Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by lead in tobacco plants. *Mut. Res*. 652, 186-190.

Godiard, L., Sauviac, L., Dalbin, N., Liaubet, L., Callard, D., Czernic, P., Marco, Y., 1998. CYP76C2, an *Arabidopsis thaliana* cytochrome P450 gene expressed during hypersensitive and developmental cell death. *FEBS Letters* 438, 245-249.

Gombert, S., Galmsomiès, L., 2005. *Pollution atmosphérique par les métaux. Biosurveillance par des retombées*. Edition ADEME/EDP-Sciences, Paris, 108 pp.

Greger, M., 1999. Metal availability and bioconcentration in plants. *In*: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems*. Springer- Verlag, Berlin, pp. 1-27.

Grill, E., Gekeler, W., Winnacker, E.L., Zenk, M.H., 1986. Homo-phytochelatins are metal-binding peptides of homo-glutathione containing Fabales. *FEBS Letters* 205, 47-50.

Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E.L., Zenk, M.H., 1989. Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6838-6842.

Grill, E., Winnacker, E.L., Zenk, M.H., 1985. Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230, 674-676.

Grill, E., Winnacker, E.L., Zenk, M.H., 1987. Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 439-443.

Grune, T., Reinheheck, T., Davies, K.J.A., 1997. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J*. 11, 526-534.

Guo, T.R., Zhang, G.P., Zhang, Y.H., 2007. Physiological changes in barley plants under combined toxicity of aluminum, copper and cadmium. *Colloids Surf. B.* 57, 182-188.

Gupta, M., Cuypers, A., Vangronsveld, J., Clijsters, H., 1999. Copper affects the enzymes of the ascorbate-glutathione cycle and its related metabolites in the roots of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.* 106, 262-267.

Gusmao-Lima, A.I., Corticeiro, S.C., Figueira, E.M., 2006. Glutathione-mediated cadmium sequestration in *Rhizobium leguminosarum*. *Enz. Microb. Technol*. 39, 763-769.

Ha, S.B., Smith, A.P., Howden, R., Dietrich, W.M., Bugg, S., O'Connell, M.J., Goldsbrough, P., Cobbett, C.S., 1999. Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccaromyces pombe*. *Plant Cell* 11, 1153-1163.

Halliwell, B., 1976. Photorespiration. *FEBS Letters* 64, 266-270.

Halliwell, B., Chirico, S., 1993. Lipid peroxydation: its mechanism, measurement and significance. *Am. J. Clin/ Nutr*. 57, 715S-725S.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2000. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford, 704 pp.

Hancock, J.T., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D., Neill, S.J., 2002. Cell signalling following plant/pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species. *Plant Physiol. Bioch*. 40, 611-617.

Harmens, H., Hartog, D.R.P., Bookun, W.M.T., Verkleij, J.A.C., 1993. Increased zinc tolerance in *Silene vulgaris* garcke is not due to increased production of phytochelatins. *Plant Physiol*. 103, 1305-1309.

Harrington, C.F., Roberts, D.J., Nickless, G., 1996. The effect of cadmium, zinc and copper on growth, tolerance index, metal uptake, and production of malic acid, in two strains of the grass *Festuca rubra*. *Canadian Journal of Botany*, 74, 1742-1752.

Hewkin, D.J., Prince, R.H., 1970. The mechanism of octahedral complex formation by labil metal ions. *Coord. Chem. Rev*. 5, 45-73.

Himelblau, E., Mira, H., Lin, S.J., Clotta, V.C., Penarrubia, L., Amasino, R.M., 1998. Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 117, 1227–1234.

Hirayama, T., Kieber, J.J., Hirayama, N., Kogan, M., Guzman, P., Nourizadeh, S., Alonso, J.M., Dailey, W.P., Dancis, A., Ecker, J.R., 1999. RESPONSIVE-TOANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis. Cell* 97, 383–393.

Horemans, N., Foyer, C.H., Asard, H., 2000. Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Plant Sci.* 5, 263-267.

Howden, R., Goldsbrough, P.B., Andersen, C.R., Cobbett, C.S., 1995. Cadmium-sensitive, cad1, mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin-deficient. *Plant Physiol*. 107, 1059-1067.

Inzé, D., Van Montagu, M., 1995. Oxidative stress in plants. *Curr. Opi. Biotech.* 6, 153-158.

Joo, J.H., Bae, Y.S., Lee, J.S., 2001. Role of auxin induced reactive oxygen species in root gravitropisme. *Plant Physiol*. 126, 1055-1060.

Jouili, H., El Ferjani, E.E., 2003. Changes in antioxydant and lignifying enzyme activities in sunflower roots (*Helianthus annuus* L.) stressed with copper excess. *Plant Biol. Pathol*. 326, 639-644.

Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. Trace elements in soils and plants. CRC Press, Boca Raton, London, New-York, Washington D.C, 436 pp.

Kagan, V.E., Serbinova, E.A., Stoyanovsky, D.A., Khwaja, S., Packer, L., 1994. Assay of ubiquinones and ubiquinols as antioxydants. *Methods in enzymology* 234, 343-354.

Kairong, C, Gengsheng, X., Xinmin, L., Gengmei, X., Yafu, W., 1999. Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. *Plant Sci.* 146, 9-16.

Karley, A.J., Leigh, R.A., Sanders, D., 2000. Where do all the ions go? The cellular basis of differential ion accumulation in leaf cells. *Trends Plant Sci.* 5, 465–470.

Kieffer, P., Dommes, J., Hoffmann L., Hausman, J.F., Renaut, J., 2008. Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants. *Proteomics* 8, 2514-2530.

Kim, Y.O., Takeuchi, F., Hara, M., Kuboi, T., 2000. Characterization of cadmium-tolerant carrot cells in response to cadmium stress. *Soil Sci. Plant Nutr*. 46, 807-814.

Klapheck, S., Flieger, W., Zimmer, I., 1994. Hydroxymethyl-phytochelatins are metal-induced peptides of the Poaceae. *Plant Physiol*. 104, 1325-1332.

Klapheck, S., Schluz, S., Bergman, L., 1995. Synthesis of phytochelatins and homophytochelatins in *Pisum sativum* L. *Plant Physiol*. 107, 515-521.

Kneer, R., Kutchan, T.M., Hochberger, A., Zenk, M.H., 1992. *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestring phytochelatin. *Arch. Microbiol.* 157, 305-310.

Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E., 1999. Miochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* 26, 463-471.

Krämer, U., Cotter-Howells, J.D., Charnock, J.M., Baker, A.J.M., Smith, J.A.C. 1996. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 379, 635-638.

Krämer, U., Pickering, I.J., Prince, R.C., Raskin, I., Salt, D.E., 2000. Subcellular localization and speciation of Ni in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. *Plant Physiol.* 122, 1343–1353.

Krupa, Z., Moniak, M., 1998. The stage of leaf maturity implicates the response of the photosynthetic apparatus to cadmium toxicity. *Plant Sci.* 138, 149-156.

Kubota, H., Sato, K., Yamada, T., Maitani, T., 2000. Phytochelatins homologs induced in hairy roots of horseradish. *Phytochemistry* 53, 239-245.

Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F.J., McGrath, S.P., 2000. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri. Planta* 212, 75–84.

Küpper, H., Zhao, F.J., McGrath, S.P., 1999. Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens. Plant Physiol.* 119, 305–312.

Kuriyama, H., Fukuda, H., 2002. Developmental programmed cell death in plants. *Cur. Opin. Plant Biol*. 5, 568-573.

Kutschera, U., 2001. Gravitropism of axial organs in multicellular plants. *Adv. Space Res*. 27, 851-860.

Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J-C., Ramade, F., 1997. *Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux*. Dunod Eds, Paris, 419 pp.

Langebartels, C., Wohlgemuth, H., Kschieschan, S., Grun, S., Sandermann, H., 2002. Oxidative burst and cell death in ozone exposed plants. *Plant Physiol. Bioch*. 40, 567-575.

Lasat, M.M., 2002. Phytoextraction of toxic metals: A Review of Biological Mechanisms. *Journal of Environmental Quality* 31, 109-120.

Lee, S., Moon, J.S., Domier, L.L., Korban, S.S., 2002. Molecular characterization of phytochelatins synthase expression in transgenic Arabidopsis. *Plant Physiol. Biochem*. 40, 727-733.

Leon, A.M., Palma, J.M., Corpas, F.J., Gomez, M., Romero-Puertas, M.C., Chatterjee, D., Mateos, R.M., Del Rio, L.A., Sandalio, L.M., 2002. Antioxidative enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium. *Plant Physiol. Biochem*. 40, 813-820.

Leopold, I., Gunther, D., Schmidt, J., Neumann, D., 1999. Phytochelatins and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 50, 1323-1328.

Lidon, F.C., Ramalho, J.C., Henriques, F.S., 1993. Copper inhibition of rice photosynthesis. *J. Plant Physiol.* 142, 12-17.

Lin, A.J., Zhang, X.H., Chen, M.M., Cao, Q., 2007. Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. *J. Environ. Sci*. 19, 596-602.

Liszkay, A., Van der Zalm, E., Schopfer, P., 2004. Production of reactive oxygen intermediates (O_2-, H_2O_2 and •OH) by Maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiol*. 136, 3114-3123.

Loeffler, S., Hochberger, A., Grill, E., Winnacker, E.L., Zenk, H., 1989. Termination of the phytochelatin synthase reaction through sequestration of the heavy metals by the reaction product. *FEBS Letters* 258, 42-46.

Lolkema, P.C., Vooijs, R., 1986. Copper tolerance in *Silene cucubalus*. *Planta* 167, 30-36.

Lu, F.C., 1991. *Toxicologie*. Masson, Paris, 361 pp.

Ma, T.H., Xu, Z., Xu, C., McConnell, H., Rabago, E.V., Arreola, G.A., Zhang, H., 1995. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mut. Res*. 334, 185-195.

Ma, J.F., Zheng, S.J., Hiradate, S., Matsumoto, H., 1997. Detoxifying aluminium with buckwheat. *Nature* 390, 569-570.

Maksymiec, W., Baszynski, T., 1999. The role of Ca2+ ions in modulating changes induced in bean plants by an excess of Cu2+ ions. Chlorophyll fluorescense measurements. *Physiol. Plant*. 105, 562-568.

Manceau, A., Marcus, M.A., Tamura, N., 2002. Quantitative speciation of heavy metals in soils and sediments by synchroton X-ray techniques. *Rev. Min. Geochem*. 49, 341-428.

Marschner, H., 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, Cambridge, 888 pp.

Maschner, R., Lippmann, B., Holzinger, S., Bergmann, H., 2002. Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Sci*. 163, 961-969.

Mayer, A.M., Staples, R.C., Gil-Ad, N.L., 2001. Mechanisms of survival of necrophytic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. *Phytochemistry* 58, 33-41.

Mazel, A., Levine, A., 2001. Induction of cell death in *Arabidopsis* by superoxide in combination with salicylic acid or with protein synthesis inhibitors. *Free Rad. Biol. Med.* 30, 98-106.

McCarthy, I., Romero-Puertas, M.C., Palma, J.M., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Gomez, M., del Rio, L.A., 2001. Cadmium induces senescence symptoms in leaf peroxisomes of pea plants. *Plant Cell Environ*. 24, 1065-1073.

McLaughlin, M.J., Zarcinas, B.A., Stevens, D.P., Cook, N., 2000. Soil testing for heavy metals. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 31 (11-14), 1661-1700.

Meharg, A.A., 1993. The role of the plasmalemma in metal tolerance in angiosperms. *Physiologia Plantarum* 88, 191-198.

Mehra, R.K., Miclat, J., Kodati, R., Abdullah, R., Hunter, T.C., Mulchandani, P., 1995. Optical spectrometric and reverse phase HPLC analyses of Hg(II) binding to phytochelatins. *Biochem. J.* 314, 73-82.

Mehra, R.K., Tran, K., Scott, G.W., Mulchandani, P., Saini, S.S., 1996. Ag(I)-binding to phytochelatins. *J. Inorg. Biochem*. 61, 125-142.

Meuwly, P., Thibault, P., Rauser, W.E., 1993. Gamma-glutamylcysteinglutamic acid – a new homologue of glutathione in maize seedlings exposed to cadmium. *FEBS Letters* 336, 472-476.

Mishra, S., Srivastava, S., Tipathi, R.D., Kumar, R., Seth, C.S., Gupta, D.K., 2006. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere* 65, 1027-1039.

Misra, S., Gedamu, L., 1989. Heavy metal tolerant transgenic *Brassica napus* and *Nicotiana*

tabacum plants. *Theoretical and Applied Genetics* 78, 161-168.

Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*. 7, 405-410.

Mohanty, S., Das, A.B., Das, P., Mohanty, P., 2004. Effect of a low dose of aluminium on mitotic and meiotic activity, 4C DNA content, and pollen sterility in rice, *Oryza sativa* L. cv. Lalat. *Ecotoxicol. Environ. Saf. 59, 70-75.*

Monnet, F., Vaillant, N., Vernay, P., Coudret, A., Sallanon, H., Hitmi, A., 2001. Relationship between PSII activity, CO_2 fixation, and Zn, Mn and Mg contents of *Lolium perenne* under zinc stress. *J. Plant Physiol.* 158, 1137-1144.

Morelli, E., Cruz, B.H., Somovigo, S., Scarango, G., 2002. Speciation of cadmium-gamma-glutamyl peptides complexes in cells of the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Sci*. 163, 807-813.

Murata, Y., Pei, Z.M., Mori, I.C., Schroeder, J., 2001. Abscisic acid activation of plasma membrane Ca2+ channels in guard cells requires cytosolic NADPH an dis differentially disrupted upstream and downstream of ROS production in *abi1-1* and *abi2-1* PP2C mutants. *Plant Cell* 13, 2513-2523.

Murphy, A., Taiz, L., 1995. Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes. Correlation with copper tolerance. *Plant Physiology* 109, 945-954.

Nakazawa, R., Takenaga, H., 1998. Interaction between cadmium and several heavy metals in the activation of the catalytic activity of phytochelatins synthase. *Soil Sci. Plant Nutr*. 44, 265-268.

Nakazawa, R., Kato, H., Kameda, Y., Takenaga, H., 2002. Optimum assay conditions of the activity of phytochelatins synthase from tobacco cells. *Biol. Planta*. 45, 311-313.

Navari-Izzo, F., 1999. Superoxide and hydroxyl radical generation, and superoxide dismutase in PSII membrane fragments from wheat. *Free Rad. Res*. 31, 3-9.

Neumann, D., Lichtenberger, O., Gunther, D., Tschiersch, K., Nover, L., 1994. Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. *Planta* 194, 360-367.

Noctor, G., 2006. Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant Cell Environ*. 29, 409-425.

Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 49, 249-279.

Nultsch, W., 1998. *Botanique générale*. De Boeck (Ed), Paris-Bruxelles, 602 pp.

Oncel, I., Keles, Y., Ustun, A.S., 2000. Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. *Environ. Pollut*. 107, 315-320.

Ortiz, D.F., Kreppel, L., Speiser, D.M., Scheel, G., McDonald, G., Ow, D.W., 1992. Heavy-metal tolerance in the fission yeast required ATP-Binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *EMBO J*. 11, 3499.

Ouzounidou, G., Symeonidis, L., Babalonas, D., Karataglis, S., 1994. Comparative responses of a copper-tolerant and a copper-sensitive population of Minuarta hirsute to copper toxicity. *J. Plant Physiol*. 144, 109-115.

Palma, J.M., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Romero-Puertas, M.C., McCarthy, I., Del Rio, L.A., 2002. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxysomes. *Plant Physiol. Bioch.* 40, 521-530.

Palozza, P., Krinsky, N.I., 1992. Astaxanthin and cantaxanthin are potent antioxydants in a membrane model. *Arch Bioch. Bioph*. 297, 291-295.

Paradiso, A., Berardino, R., de Pinto, M.C., Sanita di Toppi, L., Storelli, MM., Tommasi, F., De Gara, L., 2008. Increase in ascorbate-glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants. *Plant Cell Physiol*. 49, 362-374.

Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, B., Sharma, A., 2004. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environ. Exp. Bot*. 52, 199-223.

Pena, L.B., Pasquini, L.A., Tomao, M.L., Gallego, S.M., 2007. 20S proteasome and accumulation of oxidized and ubiquitinated proteins in maize leaves subjected to cadmium stress. *Phytochemistry* 68, 1139-1146.

Pena, L.B., Zawoznik, M.S., Tomaro, M.L., Gallego, S.M., 2008. Heavy metals effects on proteolytic system in sunflower leaves. *Chemosphere* 72, 741-746.

Perfus-Barbeoch, L., Leonhardt, L., Vavasseur, A. Forestier, C., 2002. Heavy-metal toxicity : cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J*. 32, 539-548.

Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O., 2002. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme* 16, 233-239.

Pontier, D., Balagué, C., Roby, D., 1998. The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. *CR Académie des Sciences.* Biologie et Génétique Moléculaires 321, 721-734.

Prasad, M.N.V., 1995. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environ. Exp. Bot*. 35, 525-540.

Prasad, M.N.V., 1999. *Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 462 pp.

Prasad, M.N.V., Drej, K., Skawinska, A., Skawinska, K., 1998. Toxicity of cadmium and copper in *Chlamydomonas reinhardtii* wild-type (WT2137) and cell wall deficient mutant strain (CW15). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 306-311.

Prasad, M.N.V., Freitas, H.M.O., 2003. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electr. J. Biotech*. 6, 285-321.

Prasad, M.N.V., Malec, P., Waloszek, A., Bojko, M., Strzalka, K., 2001. Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (Duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation. *Plant Sci*. 161, 881-889.

Radetski, C.M., Ferrari, B., Cotelle, S., Masfaraud, J.F., Férard, J.F., 2004. Evaluation of the genotoxic, mutagenic and oxidant stress potentials of municipal solid waste incinerator bottom ash leachates. *Sci. Tot. Environ.* 333, 209-216.

Rauser, W.E., 2000. The role of thiols in plants under metal stress. *In*: Brunold C., Haupt, P. (Eds) *Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in higher plants*. SPB Academic, Bern, pp. 169-183.

Reinheckel, T., Noack, S., Lorenz, S., Wiswedel, I., Augustin, W., 1998. Comparison of protein oxidation and aldehyde formation during oxidative stress in isolated mitochondria. *Free Rad. Res.* 29, 297-305.

Rengel, Z., 1999. Heavy Metals as Essential Nutrients. *In*: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 231-251.

Robinson, N.J., Tommey, A.M., Kuske, C., Jackson, P.J., 1993. Plant metallothioneins. *Biochem. J.* 295, 1-10.

Roldan-Arjona, T., Ariza, R.R., 2008. Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. *Mut Res*. doi: 10.1016/j.mrrev.2008.07.003

Rosen, E., Chen, R., Masson, P.H., 1999. Root gravitropism: a complex response to a simple stimulus ? *Plant Sci.* 4, 407-412.

Ryser, P., Sauder, R., 2006. Effects of heavy-metal-contaminated soil on growth, phenology and biomass turnover of *Hieracium piloselloides*. *Environ. Pollut*. 140, 52-61.

Salt, D.E., Prince, R.C., Pickering, I.J., Raskin, I., 1995. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiology* 109, 1427-1433.

Salt, D.E., Rauser, W.E., 1995. MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiol*. 107, 1293-1301.

Salt, D.E., Wagner, G.J., 1993. Cadmium transport across tonoplast of vesicle from oat roots. *J. Biol. Chem.* 268, 12297-12302.

Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gomez, M., Romero-Puertas, M.C., del Rio, L.A., 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot*. 52, 2115-2126.

Schat, H., Llugany, M., Vooijs, R., Hartley-Whitaker, J., Bleeker, P.M., 2002. The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *J. Exp. Bot*. 53, 2381-2392.

Scheifler, R., Schwartz, C., Echevarria, G., De Vaufleury, A., Badot, P-M., Morel, J-L., 2003. "Nonavailable" soil cadmium is bioavailable to snails: Evidence from isotopic dilution experiments. *Environ. Sci. Technol.* 37, 81-86.

Schmöger, M.E.V., Oven, M., Grill, E., 2000. Detoxication of arsenic by phytochelatins in plants. *Plant Physiol*. 122, 793-801.

Schonbaum, G.R., Chance, B., 1976. Catalase. *In* : Boyer, P.D. (Ed) *The Enzymes*, New-York Academy, New-York, pp. 363-408.

Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langelfeld-Heyser, R., Godbold, D.L., Polle, A., 2001. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots Pine roots. Plant Physiol. 127, 887-898.

Shalygo, N.V., Averina, N.G., Grimm, B., Mock, H.P., 1997. Influence of cesium on tetrapyrrole biosynthesis in etiolated and greening barley leaves. *Physiol. Plant*. 99, 160-168.

Siedlecka, A., Baszynskin T., 1993. Inhibition of electron flow around photosystem I in chloroplasts of Cd-treated maize plants is due to Cd-induced iron deficiency. *Physiol. Plant*. 87, 199-202.

Siedlecka, A., Krupa, Z., 1996. Interaction between cadmium and iron and its effects on photosynthetic capacity of primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol. Biochem*. 34, 833-842.

Singh, S., Saxena, R., Pandley, K., Bhatt, K., Sinha, S., 2004. Response of antioxidants in sunflower (*Helianthus annuus* L.) grown on different amendments of tannery sludge: its metal accumulation potential. *Chemosphere* 56, 1663-1673.

Singh, S., Sinha, S., 2005. Accumulation of metals and its effects in *Brassica juncea* (L.) Czern. (cv. Robini) grown on various amendments of tannery waste. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 62, 118-127.

Sinha, S., Mallick, S., Misra, R.K., Singh, S., Basant, A., Gupta, A.K., 2007b. Uptake and translocation of metals in *Spinacia oleracea* L. grown on tannery sludge-amended and contaminated soils: Effect on lipid peroxidation, morpho-anatomical changes and antioxidants. *Chemosphere* 67, 176-187.

Sinha, S., Saxena, R., 2006. Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and non-enzymatic antioxidants and bacoside-A content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 62, 1340-1350.

Sinha, S., Saxena, R., Singh, S., 2005. Chromium induced lipid peroxidation in the plants of *Pistia stratiotes* L.: role of antioxidants and antioxidant enzymes. *Chemosphere* 58, 595-604.

Skorzynska-Polit, E., Tukendorf, A., Selstam, E., Baszynski, T., 1998. Calcium modifies Cd effect on runner bean plants. *Environ. Exp. Bot.* 40, 275-286.

Smirnoff, N., 1998. Plant resistance to environmental stress. *Curr. Opin. Biotechnol*. 9, 214-219.

Smith, M.J., Flowers, T.H., Duncan, H.J., Alder, J., 2006. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues. *Environ. Pollut.* 141, 519-525.

Speranza, A., Ferri, P., Battistelli, M., Falcieri, E., Crinelli, R., Scoccianti, V., 2007. Both trivalent and hexavalent chromium strongly alter *in vitro* germination and ultrastructure of kiwifruit pollen. *Chemosphere* 66, 1165-1174.

Srivastava, S., Mishra, S., Tripathi, R.D., Dwivedi, S., Gupta, D.K., 2006. Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatins in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Aqua. Toxicol.* 80, 405-415.

Stobart, A.K., Griffiths, W.T., Ameen-Bukhari, I., Sherwood, R.P., 1985. The effects of Cd2+ on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiol. Plant*. 63, 293-298.

Strasdeit, H., Duhme, A.K., Kneer, R., Zenk, M.H., Hermes, C., Nolting, H.S., 1991. Evidence for discrete Cd(SCys)4 units in cadmium phytochelatin complexes from EXAFS spectroscopy. *J. Chem. Soc*. 1129-1130.

Sun, R.L., Zhou, Q.X., Sun, F.H., Jin, C.X., 2007. Antioxidative defense and proline/phytochelatin accumulation in a newly discovered Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Environ. Exp. Bot*. 60, 468-476.

Sundquist, E.A., Briviba, K., Sies, H., 1994. Singlet oxygen quenching by carotenoids. *Methods in Enzymology* 234, 354-366.

Sverdrup, L.E., Krogh, P.H., Nielsen, T., Kjaer, C., Stenersen, J., 2003. Toxicity of eight polycyclic aromatic compounds to red clover (*Trifolium pratense*), tyegrass (*Lolium perenne*), and mustard (*Sinapsis alba*). *Chemosphere* 53, 993-1003.

Tao, S., Jiao, X.C., Chen, S.H., Xu, F.L., Li, Y.J., Liu, F.Z., 2006. Uptake of vapor and particulate aromatic hydrocarbons by cabbage. *Environ. Pollut*. 140, 13-15.

Tian, M., Gu, Q., Zhu, M., 2003. The involvement of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the process of shoot organogenesis of strawberry callus. *Plant Sci.* 165, 701-707.

Toppi, S.D.L., Gabbrielli, R., 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot*. 41, 105-130.

Turrens, J.F., 1997. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci. Rep*. 17, 3-8.

Ursini, F., Maiorino, M., Flohé, L., 1995. The diversity of glutathione peroxydase. *Methods in Enzymology* 252, 38-53.

Van Assche, F., Clijsters, H., 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ*. 13, 195-206.

Van Breusegem, F., Vranova, E., Dat, J.F., Inzé, D., 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci.* 161, 405-414.

Van Camp, W., Van Montagu, M., Inzé, D., 1998. H2O2 and NO: redox signals in disease resistance. *Plant Sci.* 3, 330-334.

Vatamaniuk, O.K., Mari, S., Lu, Y.P., Rea, P.A., 2000. Mechanism of heavy metals ion activation of phytochelatins (PC) synthase. *J. Biol. Chem*. 275, 31451-31459.

Vivares, D., Arnoux, P., Pignol, D., 2005. A papain-like enzyme at work: native and acyl-enzyme intermediate structures in phytochelatins synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 18848-18853.

Wilkins, R.G., 1991. *Kinetics and mechanism of reactions of transition metal complexes*. VCH (Ed), Weinheim, 465 pp.

Willekens, H., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Camp, M., 1997. Catalase is a sink for H2O2 and is indispensable for stress defence in C3 Plants. *EMBO J*. 16, 4806-4816.

Wojcik, M., Vangronsveld, J., Tukiendorf, A., 2005. Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens* – I. Growth parameters, metal accumulation and phytochelatins synthesis in response to cadmium. *Environ. Exp. Bot*. 53, 151-161.

Xiong, Z.T., Peng, Y.H., 2001. Response of pollen germination and tube growth to cadmium with special reference to low concentration exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 48, 51-55.

Yan, S.L., Tsay, C.C., Chen, Y.R., 2000. Isolation and characterization of phytochelatins synthase in rice seedlings. *Proc Natl Sci Counc* 24, 202-207.

Zenk, M.H., 1996. Heavy metal detoxification in higher plants: a review. *Gene* 179, 21-30.

Zhang, X., Miao, Y.C., An, G.Y., Song, C.P., 2001. K+ channels inhibited by hydrogen peroxide mediate ABA signalling in *Vicia faba* guard cells. *Cell Res*. 11, 195-202.

Zhu, Y.L., Pilon-Smits, E.A.H., Jouanin, L., Terry, N., 1999a. Overexpression of glutathione synthetase in Indian Mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiol*. 119, 73-80.

Zhu, Y.L., Pilon-Smits, E.A.H., Tarun, A.S., Weber, S.U., Jouanin, L., Terry, N., 1999b. Cadmium tolerance and accumulation in Indian Mustard is enhanced by overexpressing gamma-glutamylcystein synthetase. *Plant Physiol*. 121, 1169-1177.

2ème PARTIE :
RESULTATS EXPERIMENTAUX

CHAPITRE 3.

PREMIERE APPROCHE : ETUDE DES COMMUNAUTES VEGETALES LE LONG DE GRADIENTS DE POLLUTION

Study of plant communities and leaves antioxidant responses along soil pollution gradients

Marc Dazy*, Eric Béraud, Sylvie Cotelle, Frédérique Grévilliot, Jean-François Férard and Jean-François Masfaraud

Article soumis à la revue Chemosphere

Abstract

This work describes an ecological and ecotoxicological study of polluted wasteland plant communities in a former coke-factory located in Homécourt (France). Phytosociological analyse was performed along two transects to investigate changes of plant community structure through species richness (S), biodiversity (H') and equitability (J). Five species (*Arrhenatherum elatius*, *Bromus tectorum*, *Euphorbia cyparissias*, *Hypericum perforatum* and *Tanacetum vulgare*) were then selected to assess cellular responses to pollution through antioxidant enzyme activities and phytochelatins contents. The results showed that species richness and biodiversity correlated negatively to Cd and Hg concentrations in soil. With the exception of *E. cyparissias*, species abundances were not related to metal levels in the soils. On the contrary, the cellular antioxidant system and phytochelatins responded to soil contamination for all species and we hypothesized that this allowed plants to establish successfully in polluted areas.

Key words: biodiversity, species richness, pollution gradient, heavy metals, antioxidant enzymes, phytochelatins.

I-) Introduction

Composition and structure of plant communities within an area depend on the geological, ecological and seasonal factors resulting from naturally occurring changes in the environment and disturbances induced by man's activity (Regvar et al., 2006). The composition of local flora, the distance from colonised areas, the germination and establishment probabilities are decisive for the formation of pioneer plant communities. The composition of vegetation on polluted sites depends on tolerance and avoidance mechanisms among which dispersal models, vitality maintaining mechanisms, phenological adaptations and mycorrhizal associations have been described (Wilcox, 1998; Prach and Pysek, 2001; Wiegleb and Felinks, 2001).

During the last century in Northern and Eastern France, coal tar processing, metallurgical industry complexes and mining activities caused extensive damages to local vegetation, including diversity loss, and important changes in soil characteristics with the highest disturbed areas found immediately in the surroundings of industrial exploitations. Such areas are generally characterised by bare and sparsely vegetated lands, dominated by pollution resistant plant species and by severely polluted soils with high levels of heavy metals and hydrocarbons (Gunn, 1995; Dudka and Adriano, 1997).

If the phytotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) is still a matter of debate (Sverdrup et al., 2003; Smith et al., 2006; Lin et al., 2007a), heavy metal effects on plants have been largely described. They include water imbalance, disruption of mineral nutrition and photosynthesis processes, growth inhibition, and chlorosis (Toppi and Gabbrielli, 1999). Then, the survival of a given plant species in a heavy metal contaminated environment is determined by its sensitivity to metal toxicity (Prasad, 1997) and its evolutionary and adaptive responses (Wu et al., 1975; Brej, 1998). Therefore, plants have to adapt to the prevailing conditions for their survival, resulting in the acquisition of a wide range of tolerance mechanisms and defence strategies (Hall, 2002). Among them, avoidance of metal entry into the cell via exclusion or metal binding to the cell wall and other excreted ligands like organic acids or amino acids, and sequestration through chelation with glutathione or phytochelatins (PCs) reduces metal uptake and interactions with cellular components (Krämer et al., 1996; Ma, 2000; Clemens et al., 2002; Kerkeb and Krämer, 2003). Other defence system is provided by antioxidants which can cope with ROS over-

production caused by the interactions between heavy metals and normal metabolic functions (Foyer et al., 1994; Foyer and Noctor, 2005).

Synthesis of PCs, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, with n=2-11, and their homologues, is a constitutive mechanism to cope with toxic metals in various plants (Grill et al., 1985; 1987). These peptides are synthesized by a transpeptidase named phytochelatin synthase (PCS, E.C. 2.3.2.15) using glutathione or its homologues as substrate (Grill et al., 1989; Cobbett and Goldsbrough, 2002). The enzyme is post-translationally activated by various heavy metals including Cd (Grill et al., 1989; Zenk, 1996). Complexes of metal with PCs are finally sequestered in the vacuole. A large number of studies had demonstrated the critical role of PCs in Cd detoxification and tolerance (Gupta and Goldsbrough, 1991; Howden et al., 1995). However, several studies with plant species that exhibit unusual hypertolerance to Cd, such as *Thlaspi caerulescens*, suggested that PCs were not responsible for the observed metal hypertolerance phenotypes (Schat and Kalff, 1992; Ebbs et al., 2002; Schat et al., 2002; Ernst et al., 2008).

Relationships between heavy metal toxicity and oxidative stress have also been studied in many systems. The key step in oxidative stress is the production of reactive oxygen species (ROS) which initiates a variety of autooxidative reactions on membrane unsaturated fatty acids, producing lipid hydroperoxides and thereby cascades of reactions ultimately leading to the destruction of macromolecules and organelles (Foyer et al., 1994). Removal of ROS is regulated by antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, catalase, or peroxidases, and a complex antioxidant system, the ascorbate-glutathione cycle and the associated glutathione metabolism enzymes (Noctor and Foyer, 1998).

High heavy metal concentrations in soils have been usually cited as one of the primary factors limiting vegetation establishment and growth in industrial wastelands (Gunn, 1995). Therefore, revegetation capacities of these areas are relatively low, with difficulties to re-establish productive ecosystems, and they are often characterised by the establishment of several exclusive and highly-plastic species. *De facto*, plant communities of post-industrial landscapes are difficult to compare to those of undisturbed areas (Prach and Pysek, 2001; Wiegleb and Felinks, 2001).

However, identification and characterization of plant species capable of growing and surviving on polluted areas could be very helpful to develop phytostabilization technologies (Kramer et al., 2000). Experimentations have already been undertaken in order to elucidate and overcome limitations to vegetation establishment, allowing large-scale revegetation schemes to be formulated (Tordoff et al., 2000). These studies were performed in a number of

potentially hazardous sites including a former metallurgical landfill (Remon et al., 2005), a copper-smelter grassland (Ginocchio, 2000), ancient gasworks and coke-factories (Henner et al., 1999) but only took into account descriptions of plant communities and measurements of growth and heavy metal accumulation. None of these studies investigated how plants do adapt at the cellular level to their polluted environment.

Yet, it would be interesting to collect information on wild pioneer plant cellular responses when exposed *in situ* to high pollutant concentrations. Indeed, the only studies assessing plant responses to multicontaminated soils only focused on a few laboratory models such as *Helianthus annuus* (Singh et al., 2004), *Brassica juncea* (Singh and Sinha, 2005), *Nicotiana tabacum* and *Solanum tuberosum* (Gichner et al., 2006), or *Lolium perenne* and *Trifolium repens* (Bidar et al., 2007).

In this work, a vegetation survey was conducted on an industrial wasteland located at a former coke-factory site in Homécourt, in the North-East of France. Coke production activities from 1922 to 1980 led to the release of PAHs, cyanides and heavy metals, especially Cd, Cu, Hg and Zn. The aims of the present study were (i) to run a phytosociological analysis in order to compare plant communities in areas differing by their pollutant loads (ii) to assess some leaf cellular defence, antioxidant systems and phytochelatins, in a few species selected according to their relative abundance in the studied areas.

II-) Materials and methods

II-1-) Site description and physico-chemical properties

This work was performed at a former coke-factory site (Fig. 3.1a) in Homécourt (Lorraine, North-East of France: latitude 49°23′33”N, longitude 5°98′33”E). Local mean annual rainfall and temperature are 720 mm and 11°C, respectively. Two well-established concentric horizontal vegetation gradients were identified and supposedly linked to pollutant concentrations. Two transects were drawn from central to peripheral areas for each of them, as described in Fig. 3.1b, and each zone was clearly delimited by using vegetation profile (Fig. 3.1c and 3.1d).

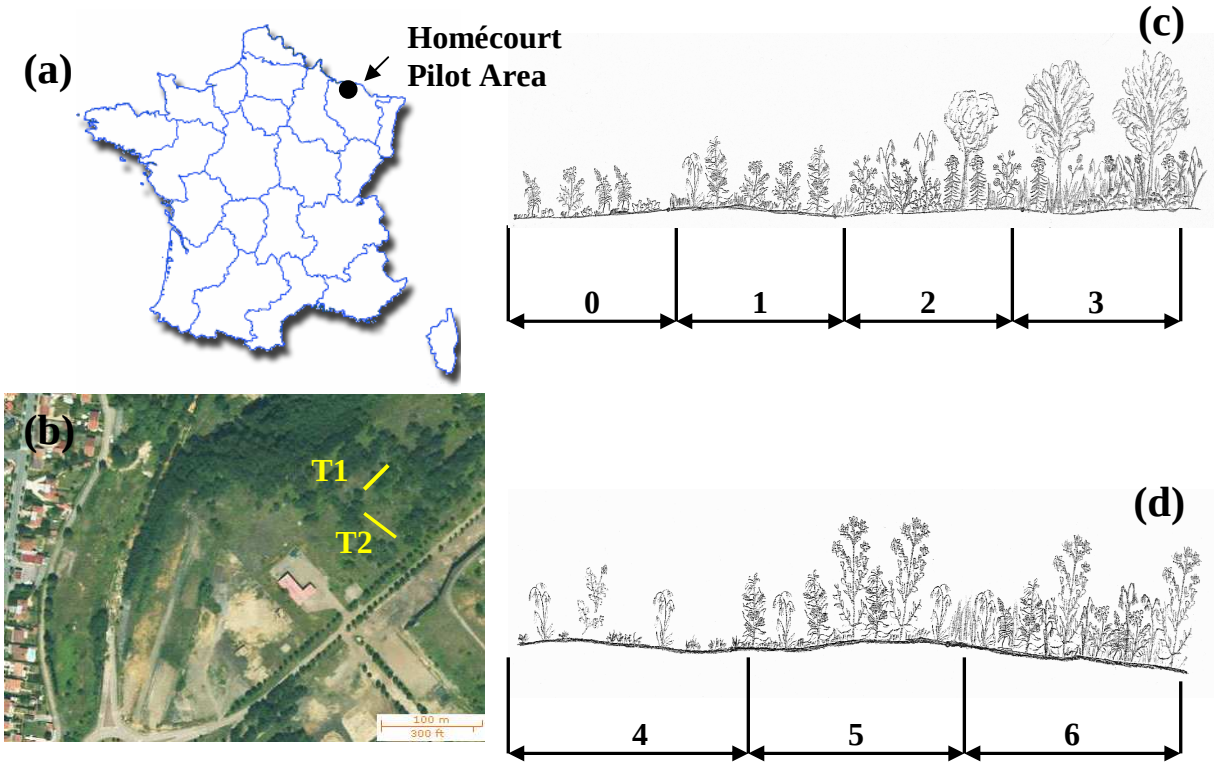


Figure 3.1. Localization of pilot area and the two transects T1 and T2 (a and b) and zones (0 to 6) with their respective vegetation profiles (c and d).

For each zone, soil physico-chemical properties and pollutant concentrations were analysed (Tables 3.1 and 3.2) following the method of Mathieu and Pieltain (1998). The granulometric distribution of soil samples was homogenous through zones 0 to 6. Some discrepancies were observed for C/N, pH or CEC values, but no general trends could be delineated (Tab. 3.1).

Zone n°	C/N	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)	pH H_2O	CEC (meq/100g dw)
0	69.6	0.9	11.6	87.5	8.9	72.4
1	76.6	0.3	6	93.7	8.7	37.5
2	66.9	0.1	2.1	97.8	8.5	47.5
3	83.3	0.1	2.8	97.1	7.5	80.4
4	23.1	0.3	4.2	95.5	8.1	58.2
5	68.1	0.2	5.7	94.1	8.2	43.2
6	5.1	0.6	7.9	91.5	8.6	56.3

Table 3.1. Physico-chemical characteristics of soil samples from zones 0 to 6

Moreover, substantial levels of Cd, Cu, Hg and Zn were recorded in soil samples (Tab.3.2). Zn and Cu concentrations were homogenous throughout the zones with levels comprised between 211-367 and 23-95 mg/kg, respectively. Cd was only detected in a few areas, reaching 28 mg/kg. High disparities between Hg levels were observed with concentrations varying from 4.6 mg/kg to 560 mg/kg. PAH concentrations exhibited similar discrepancies with values comprised between 99.5 mg/kg in zone 6 and 4651.6 mg/kg in zone 0. High levels of phenanthrene, pyrene, benzo(b+k)fluoranthene and fluoranthene were found with concentrations reaching 422.8, 701.8, 721.3 and 854.9 mg/kg respectively. Moreover, except for Hg, pollutant concentrations found in zone 6 were always below or close to VDSS values (French soil concentration values above which soil is considered as a pollution source) revealing its low degree of pollution (BRGM, 2001). Thus, this zone could be considered as a control area.

		Zones						
		0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Heavy Metals (mg/kg soil dw)	Cadmium (Cd)	4	1	1	2	28	9	1
	Copper (Cu)	74	40	58	22	67	58	95
	Mercury (Hg)	68	26	10.8	4.6	560	197	27
	Zinc (Zn)	271	307	268	367	336	312	211
	Total Heavy Metals	**417**	**374**	**337.8**	**395.6**	**991**	**576**	**334**
PAHs (mg/kg soil dw)	Naphtalene	14.7	19.3	9.0	6.4	4.5	2.7	0.9
	Acenaphtylene	281.1	132.2	16.4	31.7	22.1	8.4	4.2
	Acenaphtene	4.7	2.2	0.1	0.9	0.5	0.6	0.6
	Fluorene	16.9	14.2	2.2	3.2	3.9	0.9	1.1
	Phenanthrene	422.8	308.1	41.9	61.5	63.5	16.9	11.2
	Anthracene	94.5	59.5	11.7	12.9	13.9	3.3	3.2
	Fluoranthene	854.9	490.5	80.2	122.5	95.9	29.4	18.7
	Pyrene	701.8	393.3	65.9	95.3	71.6	23	14.2
	Benzo(a)anthracene	345.6	190.0	37.0	43.4	36.1	11.5	8.1
	Chrysene	343.4	173.4	35.7	43.9	32.6	11.6	6.9
	Benzo(b+k)fluoranthene	721.3	367.3	75.7	102.8	63.8	23.6	13.8
	Benzo(a)pyrene	233.8	129.7	37.4	40.9	25.7	8.8	5.7
	Dibenzo(a,h)anthracene	123.5	60.4	11.1	13.9	8.2	1.3	1.3
	Indeno(1,2,3-cd)pyrene	258.4	126.1	28.3	34.5	20.2	7.2	4.9
	Benzo(g,h,i)perylene	234.2	117.7	31.0	37.1	20.8	7.6	4.7
	Total PAHs	**4651.6**	**2583.9**	**483.6**	**650.9**	**483.3**	**156.8**	**99.5**

Table 3.2. Concentrations (mg/kg dw) of the major pollutants of soil samples from zones 0 to 6 (see figure 1). Other metals (Al, As, Cr, Ni, Pb) were also measured but their concentrations were always below detection limits.

II-2-) Ecological analyses

During the survey performed in June 2004, the following data were recorded for each zone: (i) a plant inventory, (ii) the plant coverage of each species, estimated from the abundance-dominance (Ci) scale of Braun-Blanquet (1932) and (iii) the proportion of bare soil. For the determination of plant composition, a 50×50 cm quadrat was used, following a random pattern throughout each zone. Some plants could only be identified at the genus level since at the time of sampling they had not flowered. Species richness (S) was then estimated, indexes of Shannon-Weaver's diversity (H') and Pielou's equitability (J) were calculated according to Shannon and Weaver (1963) and Pielou (1966) respectively.

II-3-) Biochemical analyses

Five species that were established in most of the zones were chosen according to their degree of apparent sensitivity to pollution since their abundance (evaluated through Ci values) changed throughout the gradients. These selected species all had Braun-Blanquet coefficients based on the number of individuals counted in each zone and not on the surface occupied by each individual.

Seven individuals of each species were then taken from each zone of the two vegetation gradients at the flowering stage so that data were comparable. Samples were brought back to laboratory and stored at -80°C until analysis. Then, 100 mg of mature leaves were excised and washed prior to analysis in order to remove dust particles. They were suspended in 125 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8) and crushed in a mortar placed on ice. The resulting suspension was centrifuged at 15,000 *g* for 10 min at 4°C and supernatant (henceforth designed as "plant extract") was used for biochemical analyses.

II-3-1-) Antioxidant enzymes

Activities of superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), guaiacol peroxidase (GPX, EC 1.11.1.7), ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) and glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) were measured according to Dazy et al. (2008). In order to calculate enzyme activities, protein contents were determined according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard.

II-3-2-) PC contents

PC standards were produced *in vitro* as described by Ruotolo et al. (2004) and PCs contents in plant extracts were measured according to Courbot et al. (2004). Briefly, 100 µL of plant extract were added to 20 µL of 2 M NaOH, 270 µL of 0.2 M borate buffer (pH 9.0) and finally 50 µL of 5 % tri-*n*-butylphosphine (TBP) solution in dimethylformamide (DMF). Reaction mixtures were shaken and maintained at 50°C over 5 min under nitrogen atmosphere to avoid sample oxidation. For derivatization, 30 µL of 11.5 mM 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonamide (ABD-F) solution in DMF were added and incubated for 20 min at 50°C. To stop the reaction, samples were placed on ice and 70 µl of 1M HCl were added to adjust pH to 1. Then, the samples were placed in the HPLC autosampler tray and cooled at 4°C for a maximum period of 12 hours before analysis. The thiol-ABD adducts were separated and quantified by using a 250 × 3 mm reversed-phase column (Nucleosil 100 C18, Macherey Nagel) and a fluorescence detector. The column temperature was set at 40°C and the mobile phases flow at 0.4 $mL.min^{-1}$. Mobile phase A and B contained 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water and 0.1% TFA in acetonitrile/water (50:50, v/v) respectively. An elution gradient was performed to improve compound separation and column cleaning prior to subsequent injections. The elution profile was : 0-5 min, 20% B; 5 to 20 min, 20 to 40% B; 20 to 50 min, 40 to 100% B; 50 to 55 min, 100% B; 55 to 60 min, 100 to 20% B; 60 to 80 min, 20% B. The fluorescence detector was set at 385 nm and 515 nm for the excitation and emission wavelength, respectively. PC_2 standards were used to obtain calibration curves.

II-4-) Data analyses

Significant differences ($p<0.05$) between plant biochemical responses were highlighted by using ANOVA and Tukey's HSD test, performed with Statistica 6.0 Software (©Statsoft). Correlation analysis was performed using KyPlot 2.0 (©KyensLab Inc). The nonlinear cover scale of Braun-Blanquet (1932) was converted into cover percentages for the statistical analysis using the median value of cover. We used: 0.05 for the class (1) cover < 5%; 0.15 for the class (2) 5% < cover < 25%; 0.375 for the class (3) 25% < cover < 50%; 0.625 for the class (4) 50% < cover < 75%; 0.875 for the class (5) cover > 75%. Finally, for the class "+", we used the frequency 0.0125.

III-) Results

The abundance of each species was evaluated in each zone (Tab.3.3). In the first transect, zone 0 presented about 80% of bare soil while the other zones did not exceeded 30% (Tab. 3.3).

	Zone 0	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Zone 4	Zone 5	Zone 6
Achillea millefolium							1
Acinas arvensis	+	+					
Agropyron repens				+			
Agrostis sp.		+	+	+			1
Arrhenatherum elatius	1	+	1	2	+	1	1
Artemisia vulgaris		+	+	+	+	+	1
Betula sp.	+	1					
Bromus mollis		1	2		+		
Bromus tectorum	1	2	3	3	2	2	2
Campanula patula		+	+				
Cardamine pratensis	+			+	+	+	+
Cerastium fontanum		+	1	2	1	1	1
Cirsium arvense				+			
Clematis vitalba			+	2			+
Crataegus monogyna				1		+	+
Dactylis glomerata			+	2			
Daucus carota	+	+	+	+	1	+	1
Echium vulgare	1	2	+	+	1	2	2
Epilobium hirsutum	2	+	+	1	1	1	1
Epilobium montanum			+				2
Epipactis helleborine			+				
Erigeron strigosus	+	+	+	1		+	1
Erodium cicutarium	+	+	+		1	+	+
Euphorbia cyparissias	1	1	2	2		+	1
Festuca arundinacea			+	+			
Festuca rubra	+	+	+	+	1	+	+
Fragaria vesca							+
Galium aparine						+	+
Geranium rotundifolium	+	+	2	1	+		
Glechoma hederacea		+				+	+
Hieracium algatum	+	+				1	1
Hieracium piloselloïdes	1					2	1
Holcus lanatus					+		
Hypericum perforatum	+	1	+	1	1	2	2
Lamnium maculatum						+	
Lotus corniculatus				+			
Melandrium album				+			+
Myosotis arvensis	+	+	+	+	+	1	+
Oenothera biennis					2		
Origanum vulgare		1	2	1			
Pastinaca sativa	+		+	+	1	2	1
Petrorhagia prolifera	+						+
Plantago lanceolata	+	+	+	1			1
Plantago psyllium		1					

Table 3.3 (continued)

Poa pratensis		+	1	+		+	2
Populus tremula		1	1	1			
Reseda lutea				+			+
Robinia pseudoccacia			1	3			+
Rosa canina					+		
Rubus sp.			+	2			+
Rumex acetosa			+	+			
Salix caprea							+
Sanguisorba minor	1				1	1	1
Saxifragia tridactylis	+	+	+		+		+
Scofularia sp.					+		
Sedum acre	2	+	+	+	+	+	+
Senecio erucifolius							+
Senecio jacobea	+	+	+		+	+	+
Tanacetum vulgare	2	2	+	1	+	1	2
Taraxacum officinale	+	+	+	+	+	+	+
Tragopogon pratensis	+	+	+				
Trifolium aureum	+	+	1	1			+
Trifolium minus		1	+	1	+	+	1
Valerianella olitoria		+	+	+	+	+	+
Veronica hederifolia	+					+	+
Vesicaria sp.			+	+			+
Vicia craca	+	+	+	1			
Vicia sepium	+	+	+	1			
Vicia vienna		1	+				+
Bare soil	**4**	**1**	**1**	**1**	**4**	**1**	**+**

Table 3.3. Phytosociological table containing species occurrence (Braun-Blanquet indices) on each zone of the Homécourt wasteland

Zone 0 was dominated by *Sedum acre*, *Tanacetum vulgare* and *Epilobium hirsutum* while zone 1 was dominated by *Bromus tectorum* and *Echium vulgare*. The presence of *Robinia pseudoacacia* and *Rubus sp*. in zone 2 expressed an evolution of the community with the appearance of bushes. This evolution increased in zone 3 with the dominance of *Clematis vitalba* and *Robinia pseudoacacia* and the noticeable presence of *Crataegus monogyna*. Concerning the second transect, the same kind of evolution was noticed for both bare soil proportion and vegetation cover. Zone 4 was characterized by a large proportion of bare soil on which only a few individuals of *B. tectorum* or *Sanguisorba minor* were growing. Zones 5 and 6 were dominated by *B. tectorum*, *E. vulgare* and *Hypericum perforatum* but only zone 6 was colonized by *R. pseudoacacia*. In addition, changes in the plant community structure through each transect were also noticed when considering life-form categories (Fig.3.2). In

both transects, annuals and biennials dominated the central zones while perennials and woody species were more abundant in the peripheral zones.

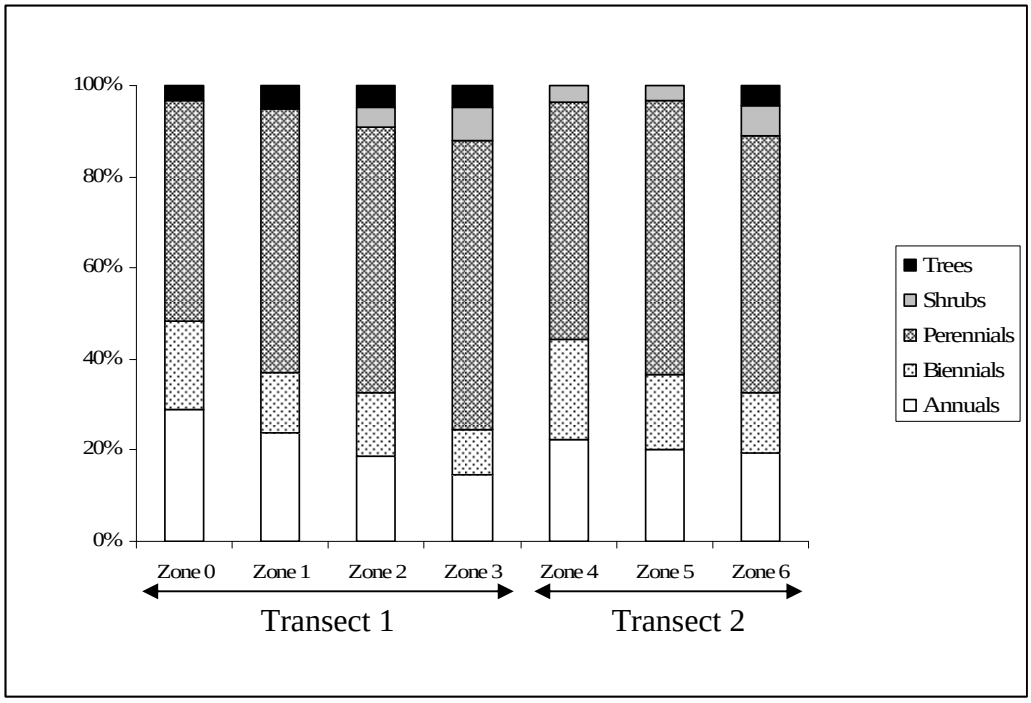


Figure 3.2. Proportion of life forms in the different zones of the two transects, expressed as % of the total species.

In order to improve the characterization of these communities, ecological indices were calculated (Tab.3.4). In the first transect, zones differed in term of species richness (31 species in zone 0 to 41 and 43 in zones 3 and 2 respectively) and biodiversity (with H' values of 4.29 and 4.78 for zones 0 and 3 respectively). The same tendency was observed along the second transect with constant increases of species richness (27 up to 46) and biodiversity (4.23 to 4.99) from central to peripheral zones. No effect on Pielou index was noticed.

Zones	S	H'	J
0	31	4.29	0.86
1	38	4.64	0.88
2	43	4.64	0.85
3	41	4.78	0.89
4	27	4.23	0.89
5	34	4.43	0.87
6	46	4.99	0.90

Table 3.4. Richness (S), Shannon-Weaver diversity (H') and Pielou equitability (J) indices determined for each zone

The influence of soil pollutant concentrations on ecological indices was evaluated through linear regression analyses and associated correlation coefficients (Tab.3.5). The results indicated that soil heavy metal concentrations, contrarily to PAHs, had a strong negative influence on plant community composition (r = -0.79 with S) and structure (r = -0.69 with H'). Interestingly, only non-essential metals Cd and Hg had significant influences on both richness and diversity (r <-0.68; p<0.05).

	S	H'	J
Σ Metals	***-0.79****	***-0.69****	***0.16***
Zinc (Zn)	-0.45	-0.37	0.07
Copper (Cu)	-0.02	-0.02	0.05
Cadmium (Cd)	-0.78*	-0.68*	0.16
Mercury (Hg)	-0.77*	-0.68*	0.16
Σ PAHs	***-0.37***	***-0.40***	***-0.41***
Naphtalene	-0.16	-0.22	-0.40
Acenaphtylene	-0.38	-0.41	-0.41
Acenaphtene	-0.37	-0.37	-0.32
Fluorene	-0.37	-0.37	-0.30
Phenanthrene	-0.37	-0.38	-0.35
Anthracene	-0.37	-0.40	-0.39
Fluoranthene	-0.37	-0.40	-0.40
Pyrene	-0.37	-0.40	-0.40
Benzo(a)anthracene	-0.37	-0.40	-0.42
Chrysene	-0.37	-0.41	-0.43
Benzo(b+k)fluoranthene	-0.36	-0.40	-0.43
Benzo(a)pyrene	-0.35	-0.39	-0.44
Dibenzo(a,h)anthracene	-0.36	-0.40	-0.43
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	-0.36	-0.40	-0.44
Benzo(g,h,i)perylene	-0.35	-0.40	-0.44

Table 3.5. Correlation coefficients between ecological indices and pollutant concentrations in soils. * indicates significance at the 0.05 level (n=7)

In order to improve our understanding of the interactions between pollutant concentrations and community structure, we assessed pollutant effects at the species level. In this way, we selected 5 species (*Arrhenatherum elatius*, *B. tectorum*, *Euphorbia cyparissias*, *H. perforatum* and *T. vulgare*) which were present in most of the zones with enough individuals (n>7) to perform subsequent biochemical analyses of cellular defences. The relationships between their respective abundances (Ci) and non-essential metal concentrations

in soils were evaluated using the method previously described. The results (Tab.3.6) tended to prove that *E. cyparissias* was the most sensitive species (r >0.73) as its abundance decreased with increasing metal concentrations. On the contrary, no effects of heavy metals were highlighted for *A. elatius, T. vulgare, B. tectorum* and *H. perforatum* as no correlations between metal concentrations and Ci were observed. Moreover, all species were found in the 7 zones except *E. cyparissias* which was unable to grow on zone 4.

	Cd	**Hg**
Arrhenatherum elatius	-0.48	-0.53
Bromus tectorum	-0.19	-0.22
Euphorbia cyparissias	-0.73*	-0.77*
Hypericum perforatum	0.08	0.12
Tanacetum vulgare	-0.55	-0.52

Table 3.6. Correlation coefficients between species abundances and heavy metal concentrations in soils. * indicates significance at the 0.05 level (n≥6)

The responses of the five species were studied at the cellular level through their antioxidant enzyme activities and PC contents (Fig.3.3). Clear dose-effect relationships (r >0.75; p<0.05) were observed for SOD (Fig.3.3a) and CAT (Fig.3.3b) activities for all species. The other enzymes (APX, GPX and GRD) presented bell-shaped dose-response curves. For APX (Fig.3.3c), the highest activities were recorded in zone 0 for *E. cyparissias* and *T. vulgare* and in zone 5 for *A. elatius, B. tectorum* and *H. perforatum*. Concerning GPX (Fig.3.3d), maximum responses were observed in zone 3 for *E. cyparissias*, in zone 0 for *T. vulgare*, and in zone 5 for *A. elatius, B. tectorum* and *H. perforatum*. Finally, highest GRD activities (Fig.3.3e) were observed in zone 0 for *E. cyparissias* and in zone 5 for the other species. Moreover, *H. perforatum* was always the species which presented the lowest enzyme-activity inductions, except for GPX. Furthermore, total PC contents (Fig.3.3f) showed dose-effect relationships for all species (r >0.88; p<0.05).

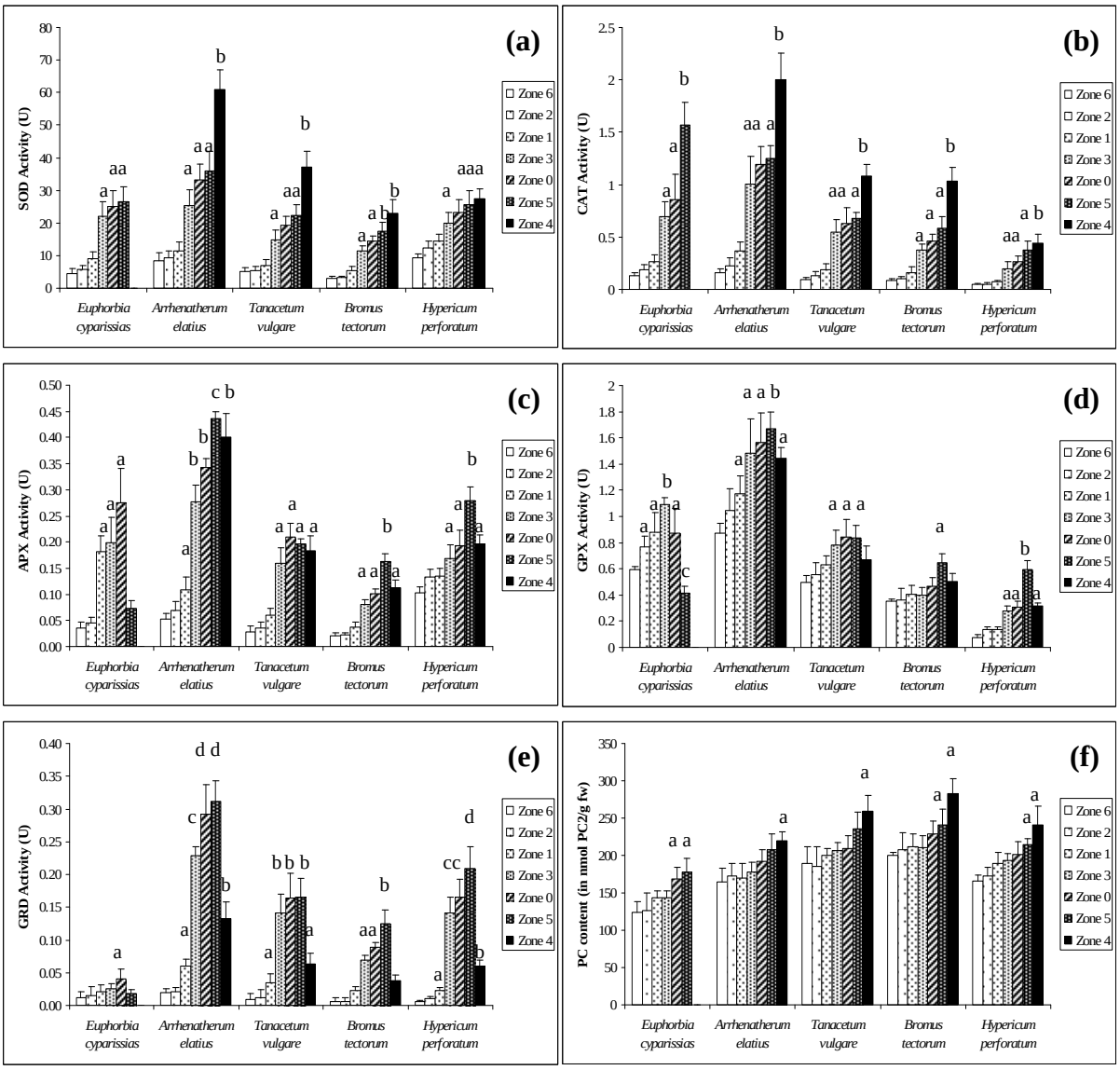


Figure 3.3. Biochemical responses in the leaves of the five species collected in the Homécourt wasteland succession zones. Zones are classified from left to right according to their ascending total heavy metal concentrations. Antioxidant enzyme activities are expressed in U (µmol/min/mg of proteins) and total phytochelatin contents in nmol eq. PC_2/ g of fresh weight. Letters above bars indicate values significantly different from zone 6 (considered here as control). For a given species, different letters discriminate statistical differences between the corresponding zones (ANOVA followed by HSD test from Tuckey, $p<0.05$).

IV-) Discussion

Physico-chemical analyses have highlighted the presence of heavy metals (Cd, Cu, Hg, Zn) and PAHs at very high concentrations in several soil zones. Heavy metal concentrations of the same range of values have already proven to induce phytotoxic effects. As an example, An (2004) observed a 50% root growth inhibition in *Sorghum bicolor* exposed to 39 mg/kg Cd while Da Rosa Correa et al. (2006) recorded significant germination inhibition of *Lactuca sativa* and *Avena sativa* exposed to 25 and 50 mg/kg Cd, respectively. The same authors also observed significant decreases in plant biomass since 6.25 and 12.5 mg/kg, respectively. Similarly, An (2006) recorded 50% root and shoot inhibitions in *Cucumis sativus* exposed to 70 mg/kg Cu for 5 days. Moreover, Smith et al. (2006) observed biomass decreases in *Festuca arundinacea*, *Festuca rubra*, *Locus corniculatus*, *Trifolium pratense* and *Trifolium repens* exposed to soils contaminated with 1000 mg/kg PAHs. Several PAHs, such as phenanthrene, pyrene or fluoranthene, have already demonstrated a potential phytotoxicity on plant growth in *Sinapsis alba*, *Trifolium repens* and *Lolium perenne* since 37 mg/kg (Sverdrup et al., 2003). This experimental data clearly suggests that pollution such as the one of Homécourt soils can lead to disturbances of plant communities. In our study, occurrences and/or absences of some species in the different zones suggested a pollution effect. Also, plant richness (S) and diversity (H') were shown to be linked negatively to soil Cd and Hg levels. However, for the species that were able to colonize all zones, abundances seemed to be independent of soil metal-contents.

For a better understanding and causal explanation of vegetation structure, we turned our interest to the study of community structure and its changes through the action of both abiotic and biotic ecological factors. In the two transects, plant communities differed between zones. In both cases, annuals were out-competed by perennials in peripheral zones, often with temporarily prevailing biennials, leading to the establishment of woody species. Moreover, as described above, shrubs and/or trees were observed as scattered specimens or juveniles in the central zones of each transect while healthy adults of the same species were noticed in the peripheral zones. The increasing complexity of plant communities was also demonstrated by the rise of species richness (S) and biodiversity index (H') from central to peripheral zones.

Such discrepancies could be considered as different maturation levels of the communities. In this way, the vegetation structure observed in central zones would be

explained by disturbances of vegetation dynamics which left the community at a state corresponding to the first succession stages described by Bazzaz (1996). Indeed, in these zones, we found species with a short life-span, mostly annuals producing a great number of seeds, which usually prevailed in initial successional stages. The short life cycle and the great amount of seeds produced are convenient adaptations to a highly varying environment causing a high pre-reproductive mortality which is a typical feature of young successional stages.

In other ways, peripheral zones presented mainly perennials and woody species, often considered as characteristics of older communities (Bazzaz, 1996). Indeed, in successions, after the stages of annuals and biennials, the stage of perennials possessing intensive vegetation spreading occurs. Later, their cover gradually increases in accordance with their life history characteristics and competitive interactions. The first dominant perennials are mostly broadleaf forbs (such as *Artemisia vulgaris* or *Plantago lanceolata*) which can quickly overgrow the field owing to their high capacity to spread vegetatively. Finally, the last succession stages will be characterized by the appearance and development of shrubs and trees (Bazzaz, 1996).

However, some perennial species characterizing late succession stages can grow as scattered specimens, sometimes juvenile, even in the first succession stages, while annuals, usually showing a less competitive ability compared to perennials, can survive in the field for some years mostly in specimens of lower size and vitality and/or in locally disturbed places inside the community (Bazzaz, 1996). Our observations are in accordance with such an analysis.

In order to explain these vegetation structures, ecological indices for each zone were correlated to pollutant concentrations. A negative effect of heavy metal concentrations, especially non-essential Cd and Hg, on both plant richness and diversity was highlighted. Such negative effects were also observed at the species level for *E. cyparissias* when linking its abundance to pollutant concentrations while no such relationships were observed for the other selected species. These observations suggested a selection pressure exerted by non-essential heavy metals on plant communities, leading to the disappearance of the most sensitive species (e.g. *E. cyparissias*) in the most contaminated areas while resistant species (e.g. *H. perforatum*) established successfully. For the five species selected in our study, we hypothesized that their relative abundance was related partly from the efficiency of their respective cellular defence systems, conferring them varying degrees of resistance to soil pollutants.

Toxic compounds such as heavy metals can be taken up by plants, causing molecular damages to plant cells either directly or indirectly through the burst of ROS (Prasad, 1999). Plant cells are able to respond to elevated levels of ROS by activating antioxidative defence systems comprising enzymatic and non-enzymatic antioxidants (Foyer et al., 1994). The co-operative function of these antioxidants plays an important role in scavenging ROS and maintaining the physiological redox status of organisms (Cho and Seo, 2005).

In the present study, significant and monotonous dose-related increases of SOD and CAT activities were observed for all species. The highest activities were observed in individuals taken from the most contaminated areas, with a 7-fold increase compared to zone 6 (less contaminated zone) except for *H. perforatum* for which only 3-fold and 5-fold increases were noticed for SOD and CAT activities, respectively. These increases may be attributed to an increased production of superoxide ion, resulting in the activation of existing enzyme pools or in an increased expression of genes encoding SOD, and leading to H_2O_2 molecules detoxified by CAT (Foyer et al., 1997; Mishra et al., 2006). Increased SOD activity caused by heavy metals has been previously observed in several plant species, and is routinely considered as an adjustment response to stress. In this way, Verma and Dubey (2003) observed increases in SOD activity in rice (*Oryza sativa*) exposed to 500 and 1000 µM Pb, while Zhou et al. (2008) noticed the same tendency for both CAT and SOD in alfalfa (*Medicago sativa*) exposed to 40 µM Hg. Zhang et al. (2005) also observed increases in SOD and CAT activities in garlic (*Allium sativum*) exposed to 5 and 10 mM Cd.

The three other H_2O_2-scavenging enzymes (APX, GPX and GRD) showed similar responses, probably due to their co-regulation (Foyer et al., 1997; Mishra et al., 2006). The significant induction of enzyme activities may indicate excessive accumulation of H_2O_2. However, the decreased enzyme levels observed in individuals sampled from highly contaminated zones (zones 5 and 4) might be attributed to cytotoxic effects and especially enzyme damages due to excessive cellular H_2O_2 or heavy metal levels. Bell-shaped concentration-response curves were also found by Lin et al. (2007b) for the same enzymes in wheat seedlings (*Triticum aestivum*) exposed to 0-33 $mg.kg^{-1}$ of Cd with maximum responses observed for 10 $mg.kg^{-1}$. In our study, the highest Cd concentration (28 $mg.kg^{-1}$) was found in zone 4 and maximum responses were found in zone 5 contaminated with 9 $mg.kg^{-1}$ of Cd.

These results are in concert with the two main ROS detoxication pathways described by Foyer et al. (1994) and Prasad (1998) who considered the SOD/CAT pathway and the ascorbate-glutathione cycle as two complementary ROS-scavenging systems. The “two-way defence system” was also supported by Mittler (2002) on the basis of differences in affinities

for H_2O_2 between peroxidases (order of the µM) and CAT (order of the mM) (Halliwell, 1974).

In parallel to the increases of antioxidant enzyme activities, monotonous rises of PC contents were also observed for all species in response to elevated metal concentrations. Increases of PC contents were already noticed by Xiang and Oliver (1998) in *Arabidopsis thaliana* seedlings exposed to 25-400 µM $CdCl_2$ while Béraud et al. (2007) observed synthesis of PC_2 to PC_5 in *Vicia faba* roots exposed to 10^{-5} to 10^{-3} M of Cd. All these results confirm the general picture of an initiation of PC synthesis by SH-reactive heavy metals (Grill et al., 1987).

In the present study, PC contents measured in the leaves of the five species all ranged between 120 and 290 nmol/g fw. These values were higher than the concentrations found by Ernst et al. (2000) in mature leaves of *Silene vulgaris* taken from Zn-Cu mine tailings and an abandoned Cu mine (15.1-29.9 and 115 nmol/g dw, respectively) but lower than the constitutive 600 nmol/g fw observed by Sun et al. (2007) in leaves of *Solanum nigrum* and *Solanum melongena*. Thus, PC contents in leaves seemed to depend on both plant species and populations taken into account.

Furthermore, Sun et al. (2007) observed that the hyperaccumulator *S. nigrum* was able to double its leaf PC content while the non-hyperaccumulator *S. melongena* only exhibited a 17% increase. However, the same authors observed higher PC contents in the roots of *S. melongena* compared to *S. nigrum*, suggesting that PCs were not the primary source of plant Cd tolerance even if they were induced by increasing Cd concentrations. In our study, all plant species showed similar PC levels (220-280 nmol/g fw.) in leaves of plants taken from contaminated areas, with the exception of *E. cyparissias* which exhibited a maximum foliar PC concentration of 177 nmol/g fw. One may hypothesize that this lower PC production capacity of *E. cyparissias* was partly responsible of its higher sensitivity to heavy metals. On other way, for the other plant species, increases in foliar PC concentrations in exposed plants were comprised between 34 and 46% and there were no relationships with species abundances in the different zones, suggesting that the involvement of PCs was not crucial for plant heavy-metal-tolerance in these species. Laboratory experiments using the γ-glutamylcysteine synthetase inhibitor, L-buthionine-[S,R]-sulphoximine (BSO) would be required to assess the involvement degree of PCs in the pollution tolerance capacity of the species described in this study (Schat et al., 2002).

From an applied point of view, this study has permitted to identify several plant species that are able to establish themselves on highly contaminated sites and thus presenting a potential interest for phytostabilization purposes. Among these species were *A. elatius*, *Artemisia vulgaris*, *B. tectorum*, *Echium vulgare*, *Festuca rubra*, *H. perforatum*, *Myosotis arvensis* and *T. vulgare*. If most of these species were already described as plants with potential use in toxic metal remediation (Prasad and Freitas, 2003), *B. tectorum*, *E. vulgare* and *M. arvensis* were not immediately considered for such purposes. Further experiments studying the uptake, translocation and accumulation of heavy metals in these plants will be useful to assess their whole potential to the clean-up of toxic metals.

V-) Conclusion

The present work showed that non-essential heavy metals exhibited the highest impact on plant community structure with a loss of species richness and biodiversity linked to increasing pollutant concentrations. In the pioneer plants that were able to colonize the site, we demonstrated that leaf cellular antioxidant systems and phytochelatins responded to soil contamination, consequently suggesting their involvement in the mechanisms which allowed plants to establish successfully in such polluted areas. To confirm this idea, some supplementary experiments would be necessary, notably those dedicated to the determination of leaf cellular defences in the species that were unable to grow in the more contaminated areas.

VI-) Acknowledgments

Marc Dazy's PhD thesis is supported by the French Ministry of Education and Research. The present work was granted by GISFI (Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles) and Region Lorraine. Authors wish to thank Laure Sevin and the SARM team of the Centre de Recherches Pétrographiques et Géochimiques (CRPG - Nancy) for skilful technical assistance on physicochemical analyses, and the ecotoxicological team of Institut Forel (University of Geneve, Switzerland) for providing us PC_2 standards.

VII-) References

An, Y.J., 2004. Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. Environ. Pollut. 127, 21-26.

An, Y.J., 2006. Assessment of comparative toxicities of lead and copper using plant assay. Chemosphere 62, 1359-1365.

Bazzaz, F.A., 1996. Plants in changing environments: linking physiological, population and community ecology. Cambridge University Press, Cambridge.

Béraud, E., Cotelle, S., Leroy, P., Férard J.F., 2007. Genotoxic effects and induction of phytochelatins in the presence of cadmium in *Vicia faba* roots. Mutat. Res. 633, 112-116.

Bidar, G., Garçon, G., Pruvot, C., Dewaele, D., Cazier, F., Douay, F., Shirali, P., 2007. Behavior of *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal contaminated field: Plant metal concentration and phytotoxicity. Environ. Pollut. 147, 546-553.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Braun-Blanquet, J., 1932. Plant Sociology. McGraw-Hill, New-York.

Brej, T., 1998. Heavy metal tolerance in *Agropyron repens* (L.) P. Bauv. population from the Legnica copper smelter area, Lower Silesia. Acta Soc. Bot. Pol. 67, 325-333.

BRGM, 2001. Guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués. BRGM (Ed.), Orléans.

Cho, U.H., Seo, N.H., 2005. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. Plant Sci. 168, 113–120.

Clemens, S., Palmgren, M.G., Krämer, U. 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. Trends Plant Sci. 7, 309-315.

Cobbett, C., Goldsbrough, P., 2002. Phytochelatins and metallothioneines: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Annu. Rev. Plant Biol. 53, 159-182.

Courbot, M., Diez, L., Ruotolo, R., Chalot, M., Leroy, P., 2004. Cadmium responsive thiols in the Ectomycorrhizal *Fungus involutus*. Appl. Environ. Microbiol. 70, 7413-7417.

Da Rosa Correa, A.X., Rorig, L.R., Verdinelli, M.A., Cotelle, S., Férard, J.F., Radetski, C.M. 2006. Cadmium phytotoxicity: Quantitative sensitivity relationships between classical endpoints and antioxidative enzyme biomarkers. Sci. Total Environ. 357, 120-127.

Dazy, M., Béraud, E., Cotelle, S., Meux, E., Masfaraud, J.F., Férard, J.F., 2008. Antioxidant enzyme activities as affected by trivalent and hexavalent chromium species in *Fontinalis antipyretica* Hedw. Chemosphere 73, 281-290.

Dudka, S., Adriano, D., 1997. Environmental impacts of ore mining and processing: a review. J. Environ. Qual. 26, 590-602.

Ebbs, S., Lau, I., Ahner, B., Kochian, L., 2002. Phytochelatin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Planta 214, 635-640.

Ernst, W.H.O., Krauss, G.J., Verkleij, J.A.C., Wesenberg, D., 2008. Interaction of heavy metals with the sulphur metabolism in angiosperms from an ecological point of view. Plant Cell Environ. 31, 123-143.

Ernst, W.H.O., Nelissen, H.J.M., Ten Bookum, W.M., 2000. Combination toxicology of metal-enriched soils: physiological responses of a Zn- and Cd-resistant ecotype of *Silene vulgaris* on polymetallic soils. Environ. Exp. Bot. 43, 55-71.

Foyer, C., Lelandais, M., Kunert, K.J., 1994. Photooxidative stress in plants. Physiol. Plant. 92, 696-717.

Foyer, C., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F., Scott, I.M., 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. Physiol. Plant. 100, 241-254.

Foyer, C., Noctor, G., 2005. Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. Plant Cell 17, 1866-1875.

Gichner, T., Patkova, Z., Szakova, J., Demnerova, K., 2006. Toxicity and DNA damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metals. Ecotoxicol. Environ. Saf. 65, 420-426.

Ginocchio, R., 2000. Effects of a copper smelter on a grassland community in the Puchuncavi Valley, Chile. Chemosphere 41, 15-23.

Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E.L., Zenk, M.H., 1989. Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6838-6842.

Grill, E., Winnacker, E.L., Zenk, M.H., 1985. Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. Science 230, 674-676.

Grill, E., Winnacker, E.L., Zenk, M.H., 1987. Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants are functionally analogous to metallothioneins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 439-443.

Gunn, J.M., 1995. Restoration and Recovery of an Industrial Region. Springer, New-York.

Gupta, S.C., Goldsbrough, P.B., 1991. Phytochelatin accumulation and stress tolerance in tomato cells exposed to cadmium. Plant Physiol. 97, 306-312.

Hall, J.L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. J. Exp. Bot. 53, 1-11.

Halliwell, B., 1974. SOD, CAT and GPX: solutions to the problems of living with O_2. New Phytol. 73, 1075-1086.

Henner, P., Schiavon, M., Druelle, V., Lichtfouse, E., 1999. Phytotoxicity of ancient gaswork soils. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on plant germination. Org. Geochem. 30, 963-969.

Howden, R., Goldsbrough, P.B., Andersen, C.R., Cobbett, C.S., 1995. Cadmium-sensitive, cad1, mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin-deficient. Plant Physiol. 107, 1059-1067.

Kerkeb, L., Krämer, U., 2003. The role of free histidine in xylem loading of nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea*. Plant Physiol. 1312, 716-724.

Kramer, P.A., Zabowski, D., Scherer, G., Everett, R.L., 2000. Native plant restoration of copper mine tailings: I. Substrate effect on growth and nutritional status in a greenhouse study. J. Environ. Qual. 29, 1762-1769.

Krämer, U., Cotter-Howells, J.D., Charnock, J.M., Baker, A.J.M., Smith, J.A.C. 1996. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. Nature 379, 635-638.

Lin, H., Tao, S., Zuo, Q., Coveney, R.M., 2007a. Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by maize plants. Environ. Pollut. 148, 614-619.

Lin, R., Wang, X., Luo, Y., Du, W., Guo, H., Yin, D., 2007b. Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). Chemosphere 69, 89-98.

Ma, J.F., 2000. Role of organic acids in detoxification of aluminium in higher plants. Plant Cell Physiol. 41, 383-390.

Mathieu C., Pieltain F., 1998. Analyse physique des sols. Méthodes choisies. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.

Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Kumar, R., Seth, C.S., Gupta, D.K., 2006. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. Chemosphere 65, 1027-1039.

Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci. 7, 405-410.

Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49, 249-279.

Pielou, E.C., 1966. Shannon's formula as a measure of species diversity: its use and misuse. Am. Nat. 100, 463-465.

Prach, K., Pysek, P., 2001. Using spontaneous succession for restoration of human-disturbed habitats, Experience from Central Europe. Ecol. Eng. 17, 55-62.

Prasad, M.N.V., 1997. Plant ecophysiology. John Wiley Inc, New-York.

Prasad, M.N.V., 1998. Metal-biomolecule complexes in plants: occurrence, functions and applications. Analysis 26, 25-28.

Prasad, M.N.V., 1999. Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.

Prasad, M.N.V., Freitas, H.M.O., 2003. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. Electr. J. Biotech. 6, 285-321.

Regvar, M., Vogel-Mikus, K., Kugonic, N., Turk, B., Batic, F., 2006. Vegetational and mycorrhizal successions at a metal polluted site: indications for the direction of phytostabilisation ? Environ. Pollut. 144, 976-984.

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

Ruotolo, R., Peracchi, A., Bolchi, A., Infusini, G., Amoresano, A., Ottonello, S., 2004. Domain organization of phytochelatin synthase: functional properties of truncated enzyme species identified by limited proteolysis. J. Biol. Chem. 279, 14686-14693.

Schat, H., Kalff, M.M.A., 1992. Are phytochelatins involved in differential metal tolerance or do they merely reflect metal-imposed strain? Plant Physiol. 99, 1475-1480.

Schat, H., Llugany, M., Vooijs, R., Hartley-Whitaker, J., Bleeker, P.M., 2002. The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. J. Exp. Bot. 53, 2381-2392.

Shannon, C.E., Weaver, W., 1963. The Mathematical Theory of Communication. University of Illinois Press, Urbana.

Singh, S., Saxena, R., Pandey, K., Bhatt, K., Sinha, S., 2004. Response of antioxidants in sunflower (*Helianthus annuus* L.) grown on different amendments of tannery sludge: its metal accumulation potential. Chemosphere 57, 1663-1673.

Singh, S., Sinha, S., 2005. Accumulation of metals and its effects in *Brassica juncea* (L.) Czern. (cv. Rohini) grown on various amendments of tannery waste. Ecotoxicol. Environ. Saf. 62, 118-127.

Smith, M.J., Flowers, T.H., Duncan, H.J., Alder, J., 2006. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues. Environ. Pollut. 141, 519-525.

Sun, R.L., Zhou, Q.X., Sun, F.H., Jin, C.X., 2007. Antioxidative defense and proline/phytochelatin accumulation in a newly discovered Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. Environ. Exp. Bot. 60, 468-476.

Sverdrup, L.E., Krogh, P.H., Nielsen, T., Kjaer, C., Stenersen, J., 2003. Toxicity of eight polycyclic aromatic compounds to red clover (*Trifolium pratense*), tyegrass (*Lolium perenne*), and mustard (*Sinapsis alba*). Chemosphere 53: 993-1003.

Toppi, S.D.L., Gabbrielli, R., 1999. Response to cadmium in higher plants. Environ. Exp. Bot. 41, 105-130.

Tordoff, G.M., Baker, A.J.M., Willis, A.J., 2000. Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. Chemosphere 41, 219-228.

Verma, S., Dubey, R.S., 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. Plant Sci. 164, 645–655.

Wiegleb, G., Felinks, B., 2001. Primary succession in post-mining landscapes of Lower Lusatia – chance or necessity. Ecol. Eng. 17, 199-217.

Wilcox, A., 1998. Early plant succession on former arable land. Agric. Ecosyst. Environ. 69, 143-157.

Wu, L., Bradshaw, A.D., Thurman, D.A., 1975. The potential for evolution of heavy metal tolerance in plants. III. The rapid evolution of copper tolerance in *Agrostis stolonifera*. Heredity 34, 165-187.

Xiang, C., Oliver, D., 1998. Glutathione metabolic genes co-ordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. Plant Cell 10, 1539–1550.

Zenk, M.H., 1996. Heavy metal detoxification in higher plants: a review. Gene 179, 21-30.

Zhang, H., Jiang, Y., He, Z., Ma, M., 2005. Cadmium accumulation and oxidative burst in garlic (*Allium sativum*). J. Plant Physiol. 162, 977-984.

Zhou, Z.S., Wang, S.J., Yang, Z.M., 2008. Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (*Medicago sativa*) plants. Chemosphere 70, 1500-1509.

CHAPITRE 4.

SECONDE APPROCHE : ROLE DES BANQUES DE GRAINES ET DES SYSTEMES DE DEFENSE CELLULAIRE DANS LA COLONISATION VEGETALE D'UN SOL POLLUE

Roles of soil seed banks and plant cellular defence systems in the revegetation of a polluted industrial-wasteland

Marc Dazy*, Vincent Jung, Jean-François Férard and Jean-François Masfaraud

Article soumis à la revue Environmental Pollution

Abstract

In this study, we compared the vegetation that colonized experimental plots filled with an industrial soil to its viable seed bank. Also, five species present both in plots and seed banks were studied for their antioxidant enzymes and malondialhehyde level since we hypothesized that cellular defences could be involved in plant establishment on such soils. Results showed that the soil seed-bank influences, together with seed-rain, the composition and structure of the aboveground vegetation. Seed-banks presented higher species richness and biodiversity while plants established in the plots often had decreased growth and increases in antioxidant enzymes and lipid peroxidation level. The most sensitive species (*P. aviculare*) even exhibited an inhibition of the ascorbate-glutathione cycle, translating the phytotoxic effects of soil pollutants. In this way, our results showed that the establishment and the abundance of a species on a contaminated soil may also depend on the plant individual capacities to tolerate pollution.

Keywords: seed bank, seed rain, antioxidant enzymes, soil pollution, plant colonization

Capsule: The roles of seed-banks, seed rains and plant antioxidant capacities on the revegetation of an industrial soil are questioned.

I-) Introduction

Coke-factories, coal plants or metal industries cause extensive damages to local vegetation and important changes in soil characteristics with the highest contaminated areas found immediately surrounding the industrial exploitations (Gunn, 1995; Dudka and Adriano, 1997). These areas are generally characterised by bare and sparsely vegetated lands, dominated by pollution resistant plant species and by severely polluted soils with high levels of heavy metals and hydrocarbons (Gunn, 1995).

Restoration of a vegetation cover can fulfil the objectives of stabilization, pollution control, visual improvement and removal of threats to human beings. The constraints related to plant establishment, the amendment of soil physicochemical properties and the choice of appropriate plant species have been widely discussed (Tordoff et al., 2000; Bleeker et al., 2002). Indeed, a variety of higher plant populations are known to colonize degraded soils in which other cultivated plant species can not survive. Thus, the plant community tolerant to trace elements plays a major role in the remediation of industrial wasteland soils (Freitas et al., 2004).

High heavy metal concentrations in soils have been usually cited as one of the primary factors influencing vegetation establishment and growth in industrial wastelands (Gunn, 1995). It is remarkable that almost all the studies carried out in heavy metal polluted areas have mainly characterised changes in plant communities as changes in the standing vegetation (Regvar et al., 2006; Conesa et al., 2007; Martinez-Ruiz et al., 2007). However, these changes cannot only be explained by the death of adult individuals but also by alterations produced at the other stages of the plant life including seed production, seed germination and seedlings establishment (Feret et al., 1990; Ginocchio, 2000). For this reason, it is important to determine if pollution is able to affect the regeneration capabilities of plant communities from the soil seed bank. Indeed, in primary succession, plant colonization of abandoned fields results mainly from species availability occurring through autochthonous seed banks and allochthonous seed rains (Pickett et al. 1987).

The understanding of the potential of the seed bank for restoring species-rich pastures (McDonald et al. 1996; Vécrin et al., 2007) and maintaining floristic diversity (Bakker et al. 1991; Willems et al. 1993) are some of the reasons that have motivated researchers to compare the composition of the aboveground vegetation with seed reserves buried in the soil. Indeed, the soil seed-bank constitutes a major functional compartment of a plant community

through its role of "storage compartment" which allows population maintenance either between years (Thompson and Grime, 1979) or between sites (Templeton and Levin, 1979). De facto, they have already been investigated to elucidate many aspects of plant community dynamics such as recolonization after fire and volcanic eruptions (Tsuyyzaki, 1994), sensitivity of wetlands to oil pollution (Leck and Simpson, 1992), restoration of degraded or mined lands (Bakker et al., 1996), and improving production in cultivated areas (Forcella, 1984). However, the role of seed-banks in the colonization process of industrial soils by plants has been poorly studied.

Moreover, it is well known that heavy metals can cause severe damages to vegetation and even lead to complete death of sensitive individuals (Kapustka et al., 1995). Indeed, even if some heavy metals are essential micronutrients for plants as part of electron transport enzymes or by catalyzing redox reactions in mitochondria and chloroplasts, all exert toxic effects at high concentrations including alterations in photosynthetic and respiration processes or inhibition of plant growth (Vazquez et al., 1987; Kimbrough et al., 1999; Aravind and Prasad, 2005) and stimulate the formation of reactive oxygen species (ROS). Oxygen free radicals, such as hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide ($O_2^{\bullet -}$) and hydroxyl ($OH^{\bullet}$) radicals, are amongst the most reactive compounds produced during heavy metal stress (Prasad, 1999). When in excess, ROS lead to multiple toxic effects like lipid peroxidation, protein cleavage or DNA damages (Unyayar et al., 2006). However, plants possess many defence mechanisms, like cellular antioxidants and antioxidant enzymes, in order to scavenge ROS and avoid oxidative damages (Apel and Hirt, 2004). Ascorbate, carotenoids and thiols act as free radicals scavengers while antioxidant enzymes, like catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and peroxidases play an important role in ROS scavenging and cell injury protection (Harris, 1992).

De facto, we hypothesized that the absence of a species from a particular polluted site could be due as much to its absence from the seed-banks as to its inability to establish resulting from inefficient cellular defence systems. Conversely, high abundance of a colonist would be explained as much by its abundance in the seed-banks as by its pollutant tolerance, growth rate, or competitive ability.

In this study, the viable seed-bank and the above ground vegetation of experimental plots filled with a contaminated soil were characterized and compared during the first successional stage. The aims of the present study were (i) to determine the size, composition, species richness, diversity and equitability of soil seed-bank and aboveground vegetation of a

contaminated soil in order to assess the relative contribution of seed-bank and seed rain to plant-colonization processes; (ii) to determine in the colonizing plants the level of antioxidant enzymes and define their role in plant establishment success. Considered together, we wondered which species are likely to contribute to the restoration of former species-richness and which mechanism(s) would base this contribution.

II-) Materials and methods

II-1-) Site description and physico-chemical properties

Clay (< 2 µm)	101 - 150
Silts (2/20 µm)	105 - 158
Silts (20/50 µm)	59 - 93
Sands (50/200 µm)	61 - 104
Sands (200/2000 µm)	508 - 644
C/N	21 - 24
pH	6.8 - 7.3
Pollutant Concentrations (mg/kg soil DW)	
Chromium (Cr)	562 - 679
Cobalt (Co)	24 - 25
Copper (Cu)	128 - 133
Nickel (Ni)	94 - 99
Zinc (Zn)	1870 - 2350
Cadmium (Cd)	2 - 3
Lead (Pb)	421 - 543
Mercury (Hg)	4 - 24
Naphthalene	35 - 39
Acenaphtylene	45 - 51
Acenaphtène	53 - 64
Fluorene	50 - 63
Phenanthrene	135 - 139
Anthracene	69 - 86
Fluoranthene	250 - 259
Pyrene	176 - 180
Benzo[a]anthracene	128 - 137
Chysene	63 - 77
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	114 - 120
Benzo[b]fluoranthene	146 - 152
Benzo[k]fluoranthene	49 - 51
Benzo[a]pyrene	111 - 114
Dibenzo[a,h]anthracene	23 - 24
Benzo[g,h,i]perylene	67 - 71
16 US-EPA PAH (mg/kg DW)	**1528 - 1606**

This work was performed at an experimental site located at Homécourt (Lorraine region, North-East of France: latitude 49°23′33", longitude 5°98′33"). Local mean annual rainfall and temperature are 720 mm and 11°C respectively. On the site, four 6 m²-plots were filled up in june 2005 with a soil sampled at the former cokery site of Neuves-Maisons (Lorraine region, France) and whom physico-chemical properties and pollutant concentrations are presented in Tab.4.1. This soil was contaminated by heavy metals, especially Cr, Pb and Zn, and exhibited PAHs concentration of about 1500 mg/kg soil dw. Phytotoxicity of soils containing such high concentrations in metals and PAHs have already been demonstrated by several authors (Sverdrup et al., 2003; An, 2006; Da Rosa Correa et al., 2006).

Table 4.1. Physico-chemical properties of the Homecourt coke-factory soil. Values are expressed as min-max of 4 replicates.

II-2-) Seed-bank sampling

Choosing an appropriate sampling method for seed-bank studies is problematic because of the difficulty to determine the sample size needed to adequately quantify seed-banks (Major and Pyott, 1966). It is generally agreed that many smaller samples are preferable to a few larger ones, but there are no standard sampling units in use (Roberts, 1981; Benoit et al., 1989). In this way, many authors have offered guidelines about the size of the sample required (Table 4.2). In our study, for each plot, a composite soil sample was prepared from six randomly distributed 10x10 cm squares of 5 cm depth (3000 cm^3) subsamples which were put together. The species composition of soil samples was revealed according to the seedling emergence methods described by Ter Heerdt et al. (1996). Soil was washed through two sieves of 2.0 and 0.2 mm to remove both coarse and fine soil materials, roots and vegetative parts. These concentrated samples were then spread in a thin layer (< 2 cm) on plastic trays filled with 20 cm of a 80% 5M LUFA soil (LUFA-speyer standard soil) – 20% barren compost (Fertiligène) mix. The trays were placed in a greenhouse for 8 months and daily watered.

References	Land type	Guidelines
Numata et al., 1964	Non-cultivated	400 cm^3
Hayashi and Numata, 1968	Non-cultivated	4000-6000 cm^3
Hayashi and Numata, 1971	Non-cultivated	500-600 cm^3
Forcella, 1984	Cultivated	100 cm^2
Carter, 1985	Cultivated	1500-2000 cm^2

Table 4.2. Recommendations about seed bank sample sizes from the literature

II-3-) Ecological analyses

We analyzed above ground vegetation on the plots and their corresponding seed-banks 3 months (September 2005) and 14 months (August 2006) after the plots were filled with contaminated soil in order to study plant colonization over the first succession year.

The following data were recorded at both times in seed-banks and wasteland-plots: (i) plant inventory, (ii) number of individual per species, (iii) the density of each species. Some plants could only be identified at the genus level since at the time of sampling they were not

flowered. Species richness (S) was then estimated and indexes of Shannon-Weaver's diversity (H') and Pielou's equitability (J) were calculated according to Shannon and Weaver (1963) and Pielou (1966), respectively. Finally, plant growth was assessed by measuring their biomasses and heights, in august 2006 only.

II-4-) Biochemical analyses

After phytosociological data analyses, 5 species were chosen for biochemical analysis: *Chenopodium album*, *Erigeron canadensis*, *Matricaria recutita*, *Polygonum aviculare* and *Sonchus oleraceus*. These species all presented enough individuals ($n \geq 4$) in both plots and seed-banks to allow relevant statistical analyses. Moreover, *C. album*, *E. canadensis*, *P. aviculare* and *S. oleraceus* were present since the beginning of the experiments while *M. recutita* was deposited by the seed rains between 2005 and 2006. *L. perenne* was not taken into account as its high abundance was considered as an artefact due to seed spreading in the surroundings of the plots during summer 2005.

Four individuals of each species were then taken from the plots and seed-banks. Samples were brought back to laboratory, washed to eliminate dust particles, and stored at -80°C until analysis. Then, 100 mg of mature leaves were suspended in 125 mM potassium phosphate buffer (pH 7.6) and crushed in a mortar placed on ice. The resulting suspension was centrifuged at 15,000 *g* for 10 min at 4°C and supernatant (designed as "plant extract") was used for biochemical analyses. All methods presented below were optimised for our experimental conditions and are described with references to the original articles. In order to calculate enzyme activities, protein contents were determined according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard.

II-4-1-) Superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

Superoxide dismutase was measured by the method of Qiu-Fang *et al.* (2005). In the presence of SOD, the photochemical reduction of nitro blue tetrazolium (NBT) is inhibited and the level of inhibition was used to quantify the activity. The reaction medium consisted of 600 µL of a 125 mM potassium-phosphate buffer (pH 7.8) containing 3 mM $MgSO_4$, 3.1 mM EDTA and 2% polyvinyl polypyrrolidone (PVPP). The mixture was then completed to a final volume of 1 mL with 100 µL of methionine (130 mM), 100 µL of riboflavin (600 µM), 100

µL of NBT (22.5 mM), and 100 µL of plant extract. The reaction mixture was illuminated for 15 min and turning the light off stopped the reaction. A control reaction was performed without plant extract which was replaced by an equal volume of buffer. Assays were carried at 25°C and the reaction was measured spectrophotometrically at 560 nm. One unit of enzyme activity was defined as the quantity of enzyme that reduced the A_{560} of control by 50%.

II-4-2-) Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

Catalase was determined according to Chaoui *et al.* (1997). The disappearance of H_2O_2 was evaluated by measuring the decrease in absorbance at 240 nm (molar extinction coefficient: $\varepsilon = 36.6\ mM^{-1}cm^{-1}$) of a reaction mixture containing 100 µL of H_2O_2 (100 mM), 100 µL of plant extract and completed to 1 mL final volume with 125 mM potassium phosphate buffer (pH 7.6).

II-4-3-) Guaiacol peroxidase (GPX, EC 1.11.1.7)

Guaiacol peroxidase was assayed according to Roy *et al.* (1996). The reaction mixture consisted of 100 µL plant extract, 100 µL guaiacol (22 mM), 100 µL H_2O_2 (100 mM) and completed to 1 mL final volume with 125 mM potassium phosphate buffer (pH 7.6). The increase in absorbance was measured spectrophotometrically at 470 nm ($\varepsilon = 26.6\ mM^{-1}\ cm^{-1}$).

II-4-4-) Ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11)

Ascorbate peroxidase was determined according to Garcia-Limones *et al*. (2002). The reaction mixture consisted of 100 µL ascorbate (5 mM), 100 µL H_2O_2 (100 mM), 100 µL EDTA (1 mM), 100 µL of plant extract and was completed to a final volume of 1 mL with 125 mM potassium phosphate buffer (pH 7.6). The oxidation of ascorbate was determined by the increase in absorbance at 290 nm ($\varepsilon = 2.8\ mM^{-1}\ cm^{-1}$).

II-4-5-) Glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2)

Glutathione reductase was assayed according to Garcia-Limones *et al.* (2002). The reaction mixture consisted of 100 µL plant extract, 100µL NADPH (60 mM), 100 µL

oxidised glutathione (5 mM) and was completed to a final volume of 1 mL with 125 mM potassium phosphate buffer (pH 7.6). The oxidation of NADPH was determined by its absorbance decrease at 340 nm ($\varepsilon = 6.2\ mM^{-1}\ cm^{-1}$).

II-4-6-) Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was evaluated by the thiobarbituric assay of Aravind and Prasad (2003). Briefly, 900 µL of a 0.5% TBA in 20% TCA (w/v) solution were added to 100 µL of plant extract. The mixture was incubated at 95°C for 30 min and the reaction was stopped by transferring tubes on ice. The non-specific absorbance at 600 nm was subtracted from the 532 nm absorbance and $\varepsilon = 155\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ was used for the calculation of malondialdehyde (MDA) level.

II-5-) Data analysis

We defined an emergence rate (ER) for each species as the density of a species in a plot divided by its density after seed-bank germination. To allow comparisons between plot and seed-bank densities, density of a species in the seed-bank was calculated in accordance to the sampling volume of soil. Sorensen's similarity coefficient (Sorensen, 1948) was calculated between all plots, all seed-banks and between the plots and their corresponding seed-banks for each sampling time.

Student's *t*-test was applied to highlight significant differences ($p<0.05$) between plots and seed-bank responses. Analyses were performed with Statistica 6.0 Software (©Statsoft).

III-) Results

Plant species and corresponding number of individuals determined in plots and seed-banks in Autumn 2005 and Spring 2006 are presented in Table 4.3. In autumn 2005, seed-banks contained 8 species while only *C. album* was found in the plots. In spring 2006, 22 species were observed in the seed-banks with *C. album* and *L. perenne* as the dominant species. In the plots, only 13 species were observed and *C. album* and *L. perenne* were still among the most abundant species, together with *S. oleraceus* and *E. canadensis*. However, the

high abundance of *L. perenne*, as shown in Tab.3, was an artefact since seeds were (inadequately) sown in the surroundings of the plots in summer 2005. In other ways, new species found between September 2005 and August 2006 samples were considered as coming from the seed rain.

	Autumn 2005		**Spring 2006**	
	Seed-banks	Plots	Seed-banks	Plots
Atriplex sp.	3.0 ± 0.8		4.0 ± 1.2	
Capsella bursa-pastoris M.	0.3 ± 0.5		0.5 ± 0.6	0.5 ± 0.6
Chenopodium album L.	5.3 ± 2.1	5.5 ± 5.8	6.8 ± 2.6	141.8 ± 118.1
Dactylis glomerata L.	0.8 ± 0.5		1.0 ± 0.0	1.8 ± 2.2
Erigeron canadensis L.	1.3 ± 0.5		1.0 ± 0.0	16.0 ± 3.8
Polygonum aviculare L.	1.3 ± 0.5		1.3 ± 0.5	3.0 ± 1.6
Sonchus oleraceus L.	1.0 ± 0.8		1.3 ± 0.5	22.3 ± 17.2
Trifolium repens L.	0.8 ± 0.5		0.8 ± 0.5	
Agrostis capillaris L.			1.3 ± 0.5	
Arabidopsis thaliana L.			1.0 ± 0.0	
Artemisia vulgaris L.			1.0 ± 0.0	0.5 ± 1.0
Cirsium arvense L.			0.8 ± 0.5	4.8 ± 6.2
Galium aparine L.			0.8 ± 0.5	0.5 ± 1.0
Hypericum perforatum L.			0.5 ± 0.6	
Lolium perenne L.			14.0 ± 7.6	217.8 ± 116.1
Matricaria recutita L.			1.0 ± 1.2	2.5 ± 1.3
Poa pratensis L.			0.8 ± 1.0	
Portulaca oleracea L.			0.5 ± 0.6	
Senecio vernalis Waldst. Et Kit.			0.5 ± 0.6	1.8 ± 1.7
Tanacetum vulgare L.			2.0 ± 0.8	
Taraxacum sp.			0.8 ± 0.5	
Veronica officinalis L.			1.0 ± 0.8	3.0 ± 2.2

Table 4.3. Differences in species composition between the seed-bank and the expressed vegetation within plots. Results are expressed as average numbers of seedlings in 6x10 cm^2 of soils for seed-banks and 2x3 m^2 for plots.

Sorensen coefficients revealed high degrees of similarity (Cs > 80 %) between plots and between seed-banks in both autumn 2005 and spring 2006 (Fig.4.1). However, comparisons between plots and seed-banks at a given time showed high discrepancies as only 27 ± 5 % of similarity were found in autumn 2005 and 65 ± 8 % in spring 2006. Moreover, from all these results, we concluded that seeds from 14 species were deposited in the soil through winter seed-rains and that only 7 of them were able to grow in the plots. Individuals of all these species were also found in the wasteland in the neighbourhood of the plots (data not shown).

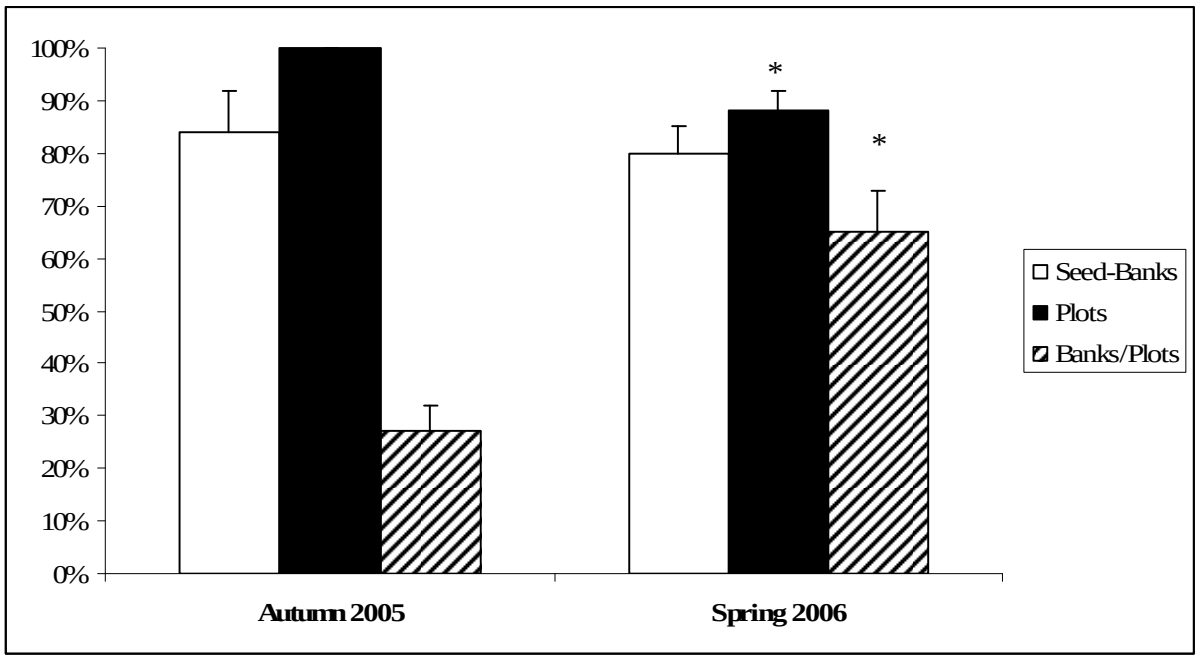


Figure 4.1. Values of Sorensen's coefficient of similarity. Asterisks discriminate significant differences ($p<0.05$) between sampling periods using Student's *t*-test.

To complete these results, the proportions of plant life forms in both plots and seed banks in 2006 were determined (Fig.4.2). In seed-banks (Fig.4.2A), 59% of the viable species were perennials while annuals represented the remaining proportion (41%). On the opposite, in plots (Fig.4.2B), annuals were the most abundant (63%) compared to perennials (37%). Details of vegetation composition by families revealed that both seed-banks (Fig.4.3A) and plots (Fig.4.3B) were dominated by the 3 same families: *Asteraceae*, *Chenopodiaceae* and *Poaceae*.

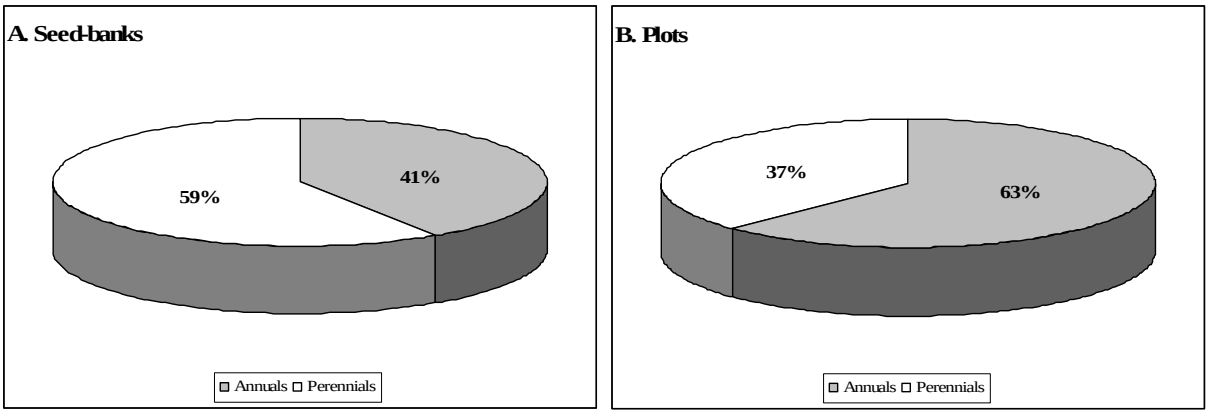


Figure 4.2. Representation of plant life-forms in plots and seed-banks.

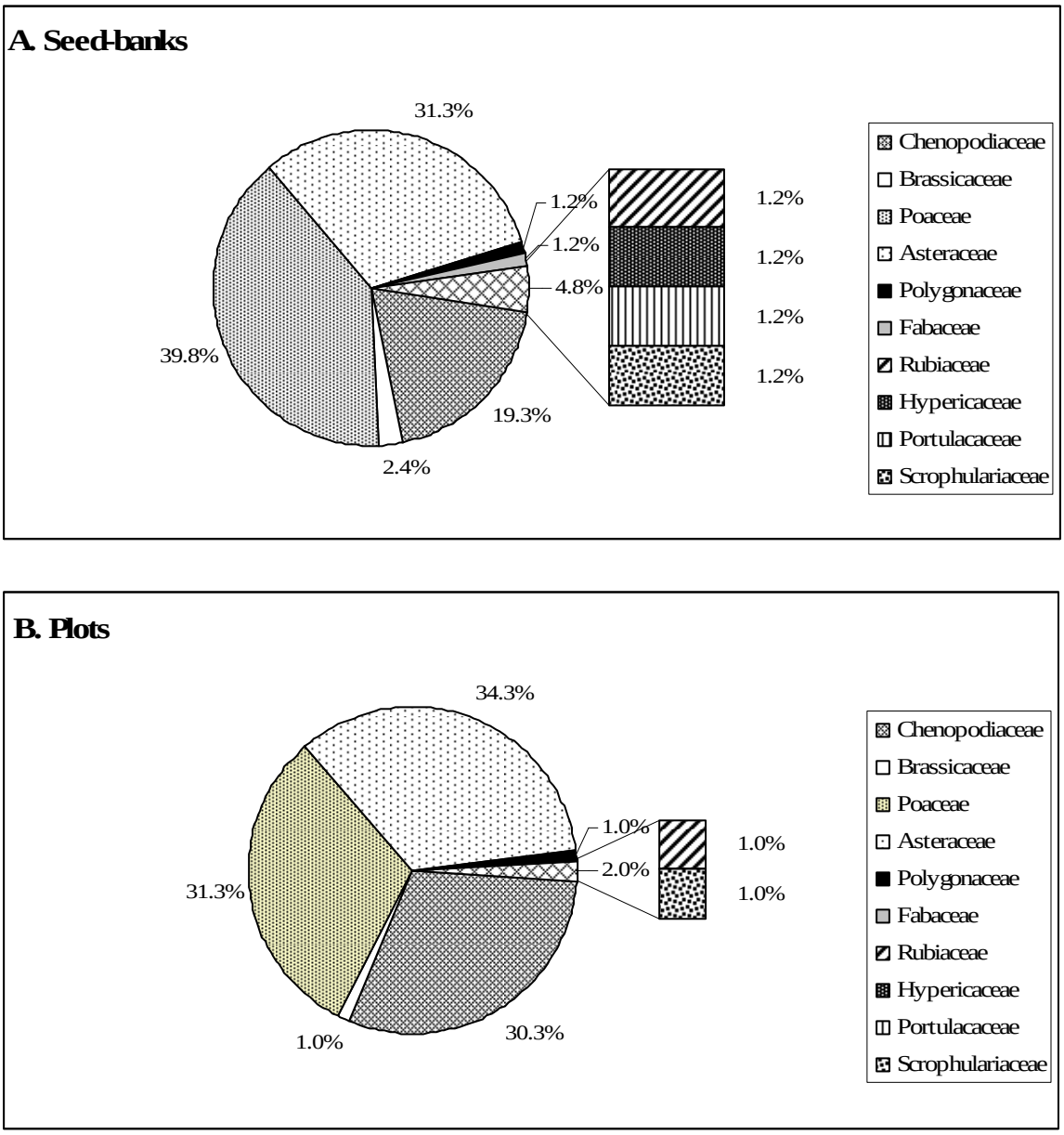


Figure 4.3. Details of vegetation composition of seed-banks and plots by plant families.

Ecological indexes calculated for plots and seed-banks in Spring 2006 are presented in Fig.4.4. Significant differences affected species richness and the Shannon-Weaver diversity indice. Indeed, species richness in the banks was 18 ± 2.3 against 9.5 ± 0.6 in the plots. In the same way, H' value was higher in the banks (3.3 ± 0.4) than in the plots (1.596 ± 0.6). No effect was noticed on Pielou equitability.

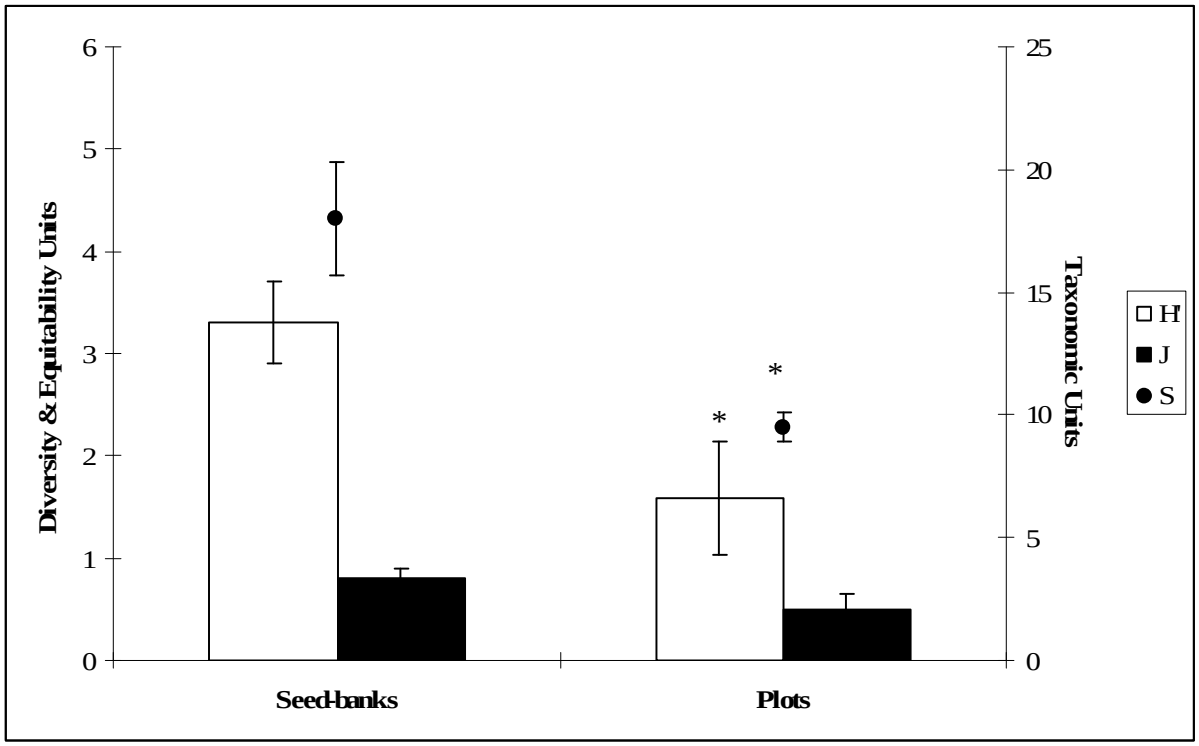


Figure 4.4. Richness (S), Shannon-Weaver diversity (H') and Pielou equitability (J) indexes determined for each treatment at the end of the experiment. Asterisks discriminate significant differences ($p<0.05$) between compartments using Student's *t*-test.

Densities of all species were recorder for both plots and banks in spring 2006 (Fig.4.5). Globally, all species had higher densities in the banks than in the plots. Moreover, two species were more abundant than the others: *C. album* and *L. perenne* with average density values of 112.50 and 233.33 individuals/m² in the banks and 23.63 and 36.29 in the plots, respectively. The other species all exhibited densities comprised between 8.33 and 20.83 individuals/m² in the banks and ranging from 0.08 to 3.71 in the plots. Moreover, an emergence rate (ER) could be derived from individual densities on banks and plots (Fig 4.6). For most of species, ER did not exceeded 6% but a group of 4 species could be distinguished, exhibiting ER above 15%: *C. album, E. canadensis, L. perenne* and *S. oleraceus.*

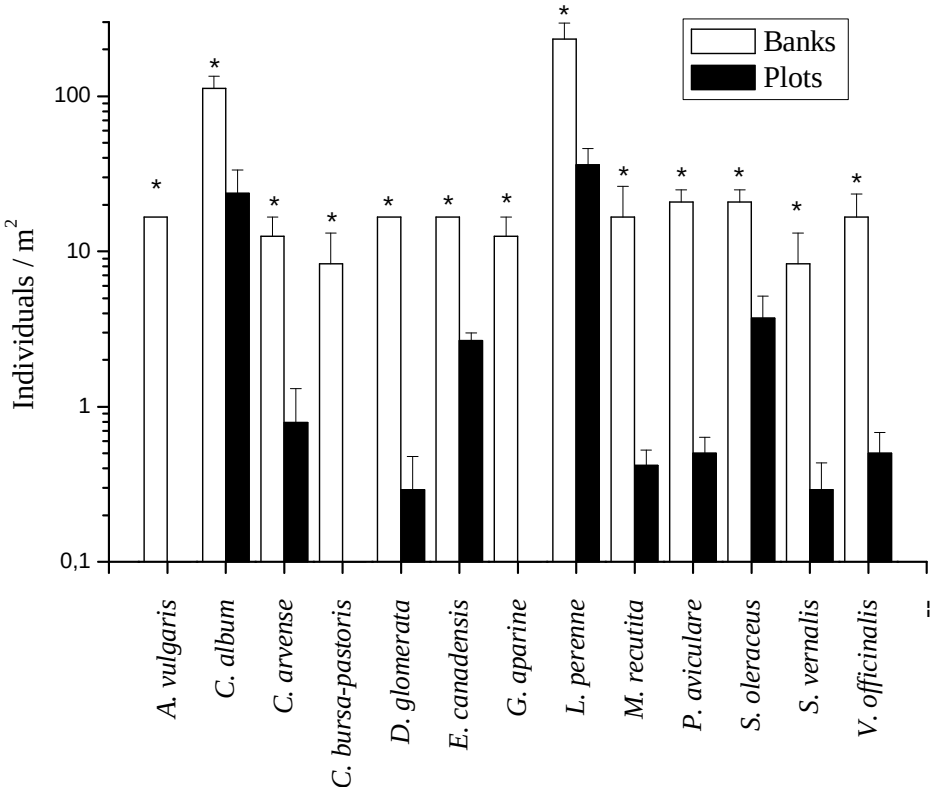


Figure 4.5. Densities of each species in seed-banks and plots expressed as means ± standard errors. Asterisks discriminate significant differences ($p<0.05$) between compartments using Student's *t*-test.

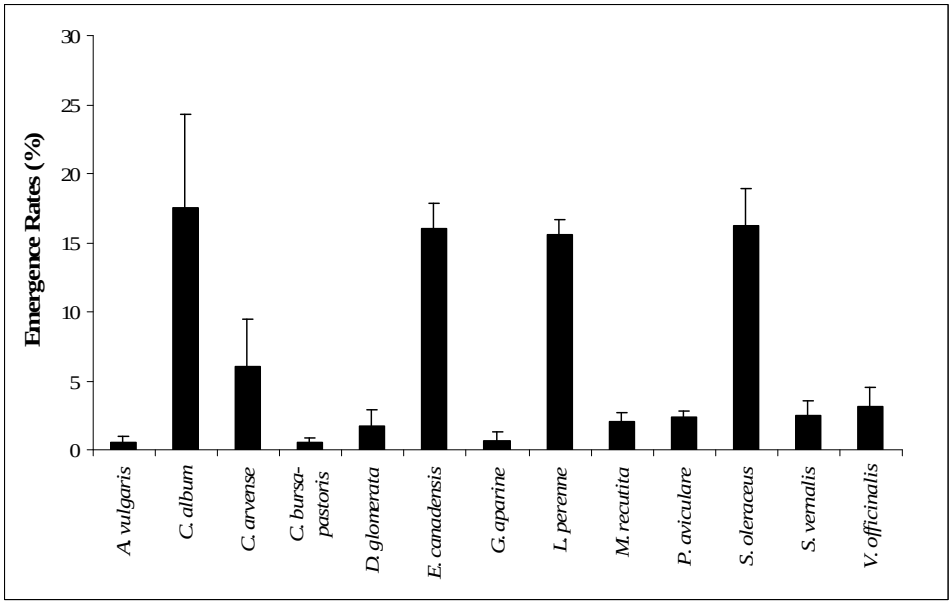


Figure 4.6. Emergence rates (ER) of all species determined at the end of the experiments and expressed as means ± standard errors

When looking at the species level, discrepancies in plant performances were recorded (Fig.4.7). All species, excepted *M. recutita*, exhibited lowered height when taken from the plots. The difference reached 18% for *C. album*, 25% for *E. canadensis*, 32% for *S. oleraceus* and 48% for *P. aviculare*. On the contrary, *M. recutita* height was 44% higher in plots than in seed bank. Concerning biomass, the same trends could be highlighted even if significant lowered biomass production in plots was only observed for *P. aviculare* (45% difference). Lowered biomass in plots (*C album*, *E. canadensis*, *S. oleraceus*) or in banks (*M. recutita*) were non-significant.

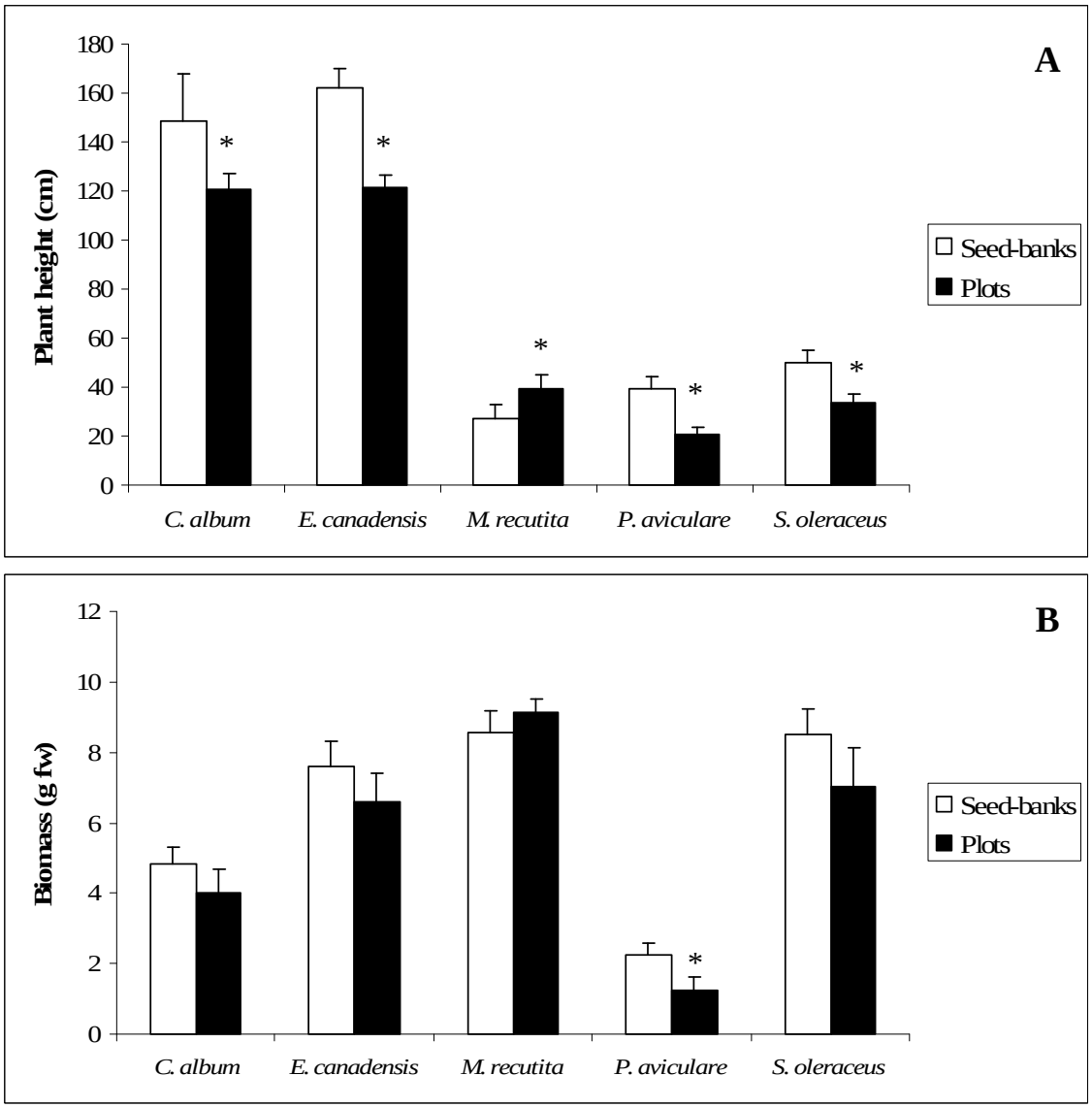


Figure 4.7. Plant height (A) and biomass (B) of individuals taken from the seed-banks and plots. Asterisks discriminate significant differences ($p<0.05$) between treatments using Student's *t*-test.

Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in plants are presented in Fig.4.8. For all species, excepted *M. recutita*, SOD activity (Fig.4.8A) was higher in plants taken from the plots with a 3-fold increase for *P. aviculare* and 2-fold ones for the other species. A 3-fold increase in CAT activity (Fig.4.8B) was also noticed for *P. aviculare* and *E. canadensis* while only 2-fold one was recorded for *S. oleraceus*. APX activities (Fig.4.8C) were two times higher in plants taken from the plots compared to seed-bank ones for *S. oleraceus* and *E. canadensis* while a 34% decrease was noticed for *P. aviculare*. Increases in GPX activity (Fig.4.8D) were also recorded for *E. canadensis*, *P. aviculare* and *S. oleraceus*. GRD activity (Fig.4.8E) exhibited an increase for plants of *S. oleraceus* taken from the plots while a 25% decrease was observed for *P. aviculare*. Finally, lipid peroxidation level (Fig.4.8F) was higher in plants taken from the plots for *E. canadensis*, *P. aviculare* and *S. oleraceus* with the highest increase (3.6-fold) recorded for *P. aviculare*.

IV-) Discussion

The composition of a seed-bank depends on the species composition and the seed production of the present and previous plant communities, as well as on the longevity of the seeds of each species under local conditions (Thompson and Grime, 1979). It was supposed that in a case of disturbed plant community, the seed-bank may intervene in re-establishing the original community (Fredrickson and Taylor, 1982). In this study, average values of Sorensen similarity index for the vegetations found on seed-bank and plots (27 and 65%) indicated a lack of correspondence between them. This discrepancy was similar to the one found by Kinucan and Smeins (1992) in a semiarid Texas grassland. Such relationships were also described in other studies realized on grasslands (Millberg, 1992; Peco *et al*., 1998) or salt marshes (Egan and Ungar, 2000). The weak similarity between aboveground vegetation and seed-bank was then attributed to the great proportion of species that were absent from the vegetation and whose seeds have a significant viability in the ground in relation to their strategies of opportunistic species (Thompson and Grime, 1979).

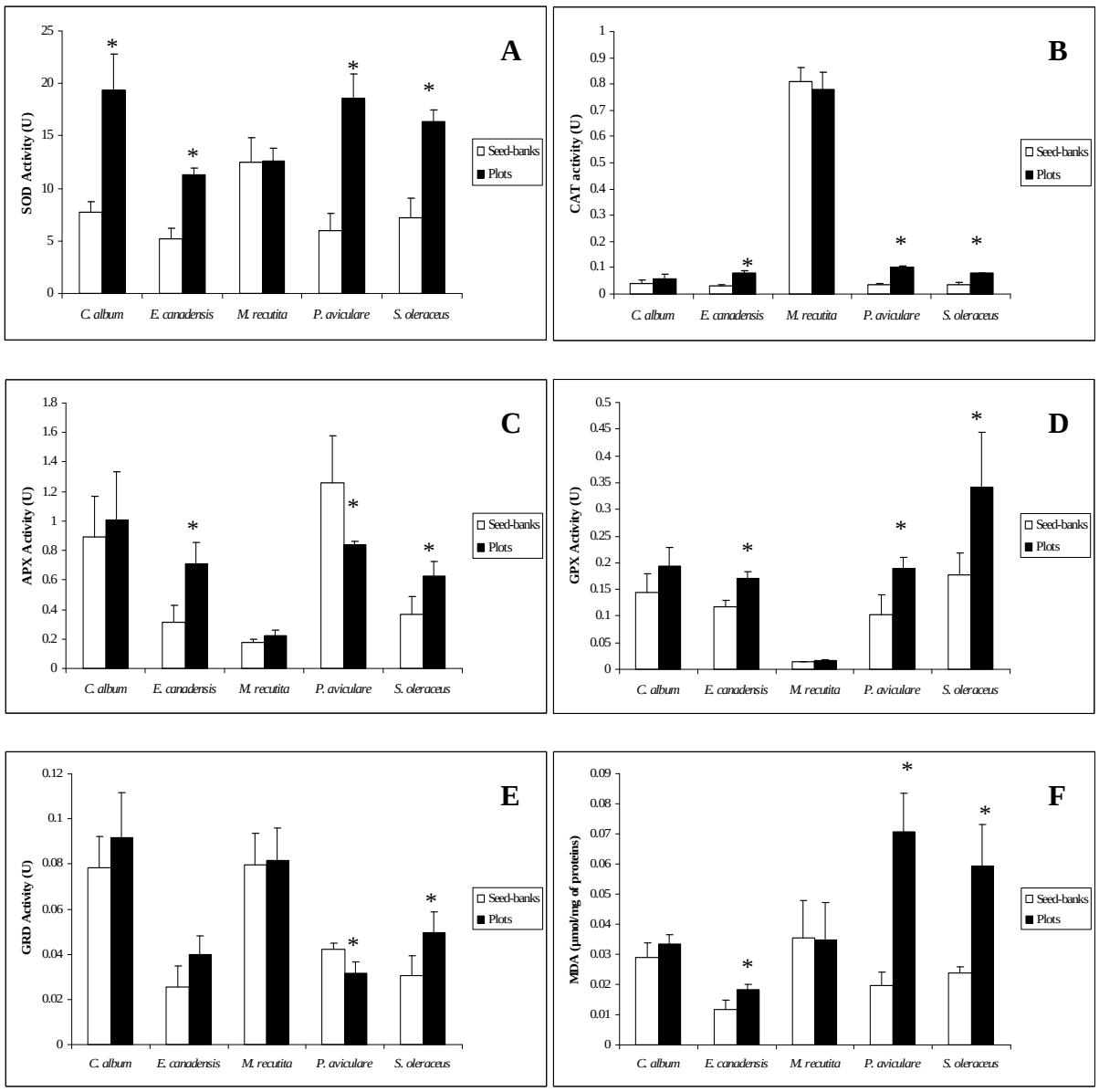


Figure 4.8. Biochemical responses in the leaves of the five species collected from seed-banks and wasteland-plots. Antioxidant enzyme activities are expressed in U (µmol/min/mg of proteins) and MDA in µmol/mg of proteins. Asterisks discriminate significant differences ($p<0.05$) between compartments using Student's *t*-test.

Moreover, the fact that some species were only found in the seed-bank and not in cover was often imputed to interspecific competition, which prevents many species from settling. However, in our plots, interspecific competition was reduced, suggesting that the difficulty for some species to be established on the cover (even in summer 2006) was probably due to abiotic constraints, in particular heavy metal levels which are known to exert

phytotoxic effects on seeds and seedlings (Brun et al., 2003; Ryser and Sauder, 2006; Ahsan et al., 2007; Gianazza et al., 2007). Thus, the conclusion presented by Fredrickson and Taylor (1982) seemed to be questionable in the case of highly contaminated areas.

Details of the species compositions of our seed-banks and plots aboveground vegetation were not surprising as *S. oleraceus*, *C. arvense*, *L. perenne* were already observed in such middles by Luzuriaga *et al.* (2005) while *C. bursa-pastoris*, *P. oleracea* and *P. pratensis* were described by Tracy *et al.* (2004). Moreover, *C. album*, *P. aviculare*, *T. officinale* and *T. repens* were observed in both studies. Most of the species determined in the seed-banks of Spring 2006 were deposited in the plots soil through winter seed-rains from adjacent areas. The importance of such seed-rains in recreating species-rich grassland was already supposed by Hutchings and Booth (1996).

In this way, we noticed that the similarity between plots and seed-banks was higher in spring 2006 than in autumn 2005. This observation may result from the combined effects of seed rain, seed mortality and germination (Williams, 1984; Kinucan and Smeins, 1992). Meissner and Facelli (1999) already suggested that higher correspondence could be expected for long-term studies.

Moreover, our results showed that perennials dominated seed-bank composition (59%) while annuals were the most abundant species in the plots (63%). These results could be explained by the difference of ER found between annuals (15%) and perennials (6%). Bazzaz (1996) already noticed that annuals usually dominated during the first year of succession, and considered *Asteraceae* as one of the most representative family of the first succession steps. In our study, *Asteraceae* represented 31.3 and 34.3% of the individuals found in the seed-banks and plots, respectively. Thus, these results are in total agreement with the traditional scheme of plant succession in open lands. Bazzaz (1996) also observed that most of the species composing young plant communities were weeds commonly found in agricultural fields and roadsides whom seeds were usually present in large numbers in the soil prior to disturbances occurred and succession started. Soil seed banks would probably be the main component of annual plant populations in wasteland ecosystems and may play a critical role in their community dynamics. Indeed, annual plants may constitute an important functional part of wasteland ecosystems, using resources not available to perennial plants and providing temporary ground cover.

Ecological indexes calculated after one year of succession also proved that the plant communities found in the plots represented partly the potential community suggested by the

seed-bank vegetation as only half of the bank species were present in the plots. Moreover, species richness in our seed-banks was 18.0 ± 2.3. This value was closed to the 16 species found in grassland seed-banks by Bossuyt *et al.* (2006) but much lower than the 46 and 50 species determined in pasture by Tracy *et al.* (2004) and in grassland by Luzuriaga *et al.* (2005). In the same way, Shannon-Weaver index proved that plot communities have lost some diversity compared to seed-bank ones. These decreases in biodiversity and species richness could be partly explained by differences between field and greenhouse germinating conditions but was also supposedly linked to the germination and establishment deficits resulting from the high contamination of the plot soils.

As an example, the mean density found in the seed-banks was 695 ± 107 seeds/m² and was closed to the results found in grassland (942-1129 seeds/m^2) by Bossuyt *et al*. (2006) and in pasture (744 seeds/m^2) by Tracy *et al*. (2004). On the contrary, only 69 ± 25 seeds/m² were found in our plots. Such difference suggested a possible impact of plot soil pollutants on seeds viability which could also partly explain the low ER found for all species.

Indeed, only four species, *C. album*, *E. canadensis*, *S. oleraceus* and *L. perenne* exhibited ER above 15% and were considered as among the most efficient colonizators of such polluted soils. Among these species, *C. album* and *L. perenne* had extremely high densities in banks (> 100 seeds/m²) reflecting a higher concentration of seeds, a better survival of seeds and seedlings, or better adaptation to field conditions (faster growth, highly competitive for nutrients, water and light). For these 2 plants, densities in plots decreased but remained still higher than for the other species. In that case, high ER may be related to high seed and seedling survival and strong competition ability (note that seed concentration is not appropriate for any explanation concerning high ER since these concentrations are supposed the same in plots and banks). For *E. canadensis* and *S. oleraceus*, densities in banks were low with only 15-20 seeds/m² (explanation may lie in low seed concentration, limited seed and seedling survival, poor adaptation to greenhouse conditions). So, their high ER values cannot, as in the case of *C. album* and *L. perenne*, be explained solely by the above-mentioned parameters. In a polluted environment, these 2 species became intermediate competitors.

Another species could be taken into account while considering best colonizators: *M. recutita*. This species did not exhibit high densities (about 8 seeds/m²) or ER (about 2% in average). However, this plant was the only one to exhibit individual acclimation response through an increase of growth and biomass when experiencing polluted soil in the plots.

These data suggested that *M. recutita* took advantage of the lack of competitors for light and nutrients to impose itself as a dominant species.

Moreover, when studying biochemical responses, *M. recutita* was the only species which did not present rises in antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation level when taken from the plots. These results suggested that pollutants induced neither stress nor cellular damages in this case, which is in agreement with the results of Kovacik et al. (2006) who observed a high tolerance degree of *M. recutita* to heavy metals. On the contrary, the other species presented significant responses to plot pollutants. *C. album*, which growth was moderately slowed in the plots by comparison to the seed bank was also the only species to present only an increase in SOD activity while *E. canadensis* and *S. oleraceus*, for which growth was more clearly slowed in the plots, exhibited increases in all antioxidant enzyme activities and presented cellular damages as shown through increased MDA level. Finally, *P. aviculare*, which growth was highly reduced in plots, exhibited not only rises in SOD, CAT and GPX activities but also APX and GRD inhibitions. These results indicated an inhibition of the ascorbate-glutathione cycle considered by Foyer et al. (1994) and Prasad (1998) as the major detoxifying system of the plant cells, and translated a high degree of cytotoxicity, confirmed by the rise of lipid peroxidation level. De facto, responses of plant cellular defence systems seemed to partly explain the overall organism responses and the pollutant effects observed at the community level.

V-) Conclusion

The colonization of polluted soils by plants is a complex process which depends on several parameters. First is the composition of the soil seed-bank which will influence, with the seed rain, the composition and structure of the aboveground vegetation. Then, the establishment of a species and its abundance will depend on the number of seeds produced by its ancestors and the individual capacities to adapt themselves to the high pollution degree. Our results suggest that antioxidant systems may play a major role in individual adaptation processes, allowing (or not) the plants to develop themselves without presenting symptoms of the pollutant phytotoxicity.

VI-) Acknowledgements

This study has been realized within the framework of a transversal interdisciplinary project (GISFI) contributing to the resolution of pollution-related issues and designed to promote clean technologies for decontamination and treatment of industrial wastelands. This work was granted by Region Lorraine and Marc Dazy's PhD thesis was supported by the French Ministry of Education and Research.

VII-) References

Ahsan, N., Lee, D.G., Lee, S.H., Kang, K.Y., Lee, J.J., Kim, P.J., Yoon, H.S., Kim, J.S., Lee, B.H., 2007. Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. Chemosphere 67, 1182-1193.

An, Y.J., 2006. Assessment of comparative toxicities of lead and copper using plant assay. Chemosphere 62, 1359-1365.

Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology 55, 373-399.

Aravind, P., Prasad, M.N.V., 2003. Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: a free floating freshwater macrophyte. Plant Physiology and Biochemistry 41, 391-397.

Aravind, P., Prasad, M.N.V., 2005. Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism. Plant Physiology and Biochemistry 43, 107-116.

Bakker, J.P., Bos, A.F., Hoogveld, J., Muller, H.J., 1991. The role of the seed bank in restoration management of semi-natural grasslands, in: Ravera, O. (Ed.), Terrestrial and aquatic ecosystems: perturbation and recovery. Ellis Horwood, London, pp. 449–455.

Bakker, J. P., Poschlod, P., Strykstra, R.J., Bekker, R.M., Thompson, K., 1996. Seed banks and seed dispersal - important topics in restoration ecology. Acta Botanica Neerlandica 45, 461-490.

Bazzaz, F.A., 1996. Plants in changing environments, first ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Benoit, D.L., Kenkel, N.C., Cavers, R.B., 1989. Factors influencing the precision of soil seed bank estimates. Canadian Journal of Botany 67, 2833–2840.

Bleeker, P.M., Assuncao, A.G.L., Teiga, P.M., de Koe, T., Verkleij, J.A.C., 2002. Revegetation of the acidic, As contaminated Jales mine spoil tips using a combination of spoil amendments and tolerant grasses. Science of the Total Environment 200, 1-13.

Bossuyt, B., Butaye, J., Honnay, O., 2006. Seed bank composition of open and overgrown calcareous grassland soils - a case study from Southern Belgium. Journal of Environmental Management 79, 364-371.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248-254.

Brun, L.A., Le Corff, J., Maillet, J., 2003. Effects of elevated soil copper on phenology, growth and reproduction of five ruderal plant species. Environmental Pollution 122, 361-368.

Carter, E.D., 1985. Core sampling methods for measuring seed resources of legume pastures. University of Adelaide, Waite Agricultural Research Institute 1984–85 Biennial Report.

Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M.H., El Ferjani, E., 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Science 127, 139-147.

Conesa, H.M., Garcia, G., Faz, A., Arnaldos, R., 2007. Dynamics of metal tolerant plant communities' development in mine tailings from the Cartagena-La Union Mining District (SE Spain) and their interest for further revegetation purposes. Chemosphere 68, 1180-1185.

Da Rosa Correa, A.X., Rorig, L.R., Verdinelli, M.A., Cotelle, S., Férard, J.F., Radetski, C.M., 2006. Cadmium phytotoxicity: Quantitative sensitivity relationships between classical endpoints and antioxidative enzyme biomarkers. Science of the Total Environment 357, 120-127.

Dudka, S., Adriano, D., 1997. Environmental impacts of ore mining and processing: a review. Journal of Environmental Quality 26, 590-602.

Egan, T.P., Ungar, I.A., 2000. Similarity between seed banks and aboveground vegetation along a salinity gradient. Journal of Vegetation Science 11, 189-194.

Feret, P.P., Diebel, K.E., Sharik, T.L., 1990. Effect of simulated acid rain on reproductive attributes of red spruce (*Picea rubens* Sarg.). Environmental and Experimental Botany 30, 309-312.

Forcella, F., 1984. A species-area curve for buried viable seeds. Australian Journal of Agricultural Research 35, 645-652.

Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunert, K.H., 1994. Photooxidative stress in plants. Physiologia Plantarum 92, 696-717.

Fredrickson, L.H., Taylor, T.S., 1982. Management of seasonally flooded impoundments for wildlife. U.S. Fish and Wildlife Service Resource Publication 148. 29pp.

Freitas, H., Prasad, M.N.V., Pratas, J., 2004. Plant community tolerant to trace elements growing on the degraded soils of Sao Domingos mine in the south east of Portugal: environmental implications. Environment International 30, 65-72.

Garcia-Limones, C., Hervas, A., Navas-Cortes, J.A., Jimenez-Diaz, R.M., Tena, M., 2002. Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris*. Physiological and Molecular Plant Pathology 61, 325-337.

Gianazza, E., Wait, R., Sozzi, A., Regondi, S., Saco, D., Labra, M., Agradi, E., 2007. Growth and protein profile changes in *Lepidium sativum* L. plantlets exposed to cadmium. Environmental and Experimental Botany 59, 179-187.

Ginocchio, R., 2000. Effects of a copper smelter on a grassland community in the Puchuncavi Valley, Chile. Chemosphere 41, 15-23.

Gunn, JM., 1995. Restoration and Recovery of an Industrial Region: Progress in Restoring the Smelter-Damaged Landscape near Sudbury, Canada, first ed. Springer-Verlag, New York.

Harris, E.D., 1992. Regulation of antioxidant enzymes. FASEB Journal 6, 2675-2683.

Hayashi, I., Numata, M., 1968. Ecological studies on the buried seed population of the soil as related to plant succession. Ecological studies of biotic communities in the National Park for nature study 2, 1-7.

Hayashi, I., Numata, M., 1971. Viable buried-seed population in the Miscantos and Zoysia type grasslands in Japan. Japanese Journal of Ecology 20, 243-252.

Hutchings, M.J., Booth, K.D., 1996. Studies on the feasibility of re-creating chalk grassland vegetation on ex-arable land I. The potential roles of the seed bank and the seed rain. Journal of Applied Ecology 33, 1171-1181.

Kaputska, L.A., Lipton, J., Galbraith, H., Cacela, D., LeJeune, K., 1995. Metal and arsenic impacts to soils, vegetation communities and wildlife habitat in southwest Montana uplands contaminated by smelter emissions. II. Laboratory phytotoxicity studies. Environmental Toxicology and Chemistry 14, 1905-1912.

Kimbrough, D.E., Cohen, Y., Winer, A.M., Creelman, L., Mabuni, C., 1999. A critical assessment of chromium in the environment. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 29, 1-46.

Kinucan, R.J., Smeins, F.E., 1992. Soil seed bank of a semiarid Texas grassland under three long-term (36 years) grazing regimes. American Midland Naturalist 128, 11-21.

Kovacik, J., Tomko, J., Backor, M., Repcak M., 2006. *Matricaria chamomilla* is not a hyperaccumulator, but tolerant to cadmium stress. Plant Growth Regulation 50, 239-247.

Leck, M.A., Simpson, R.L., 1992. Effect of oil on recruitment from the seed bank of two tidal freshwater wetlands. Wetlands Ecology and Management 1, 223-231.

Luzuriaga, A.L., Escudero, A., Olano, J.M., Loidi, J., 2005. Regenerative role of seed banks following an intense soil disturbance. Acta Oecologica 27, 57-66.

Major, J., Pyott, W.T., 1966. Buried, viable seeds in two California Bunchgrass sites and their bearing on the definition of a flora. Vegetatio 13, 253-282.

Martinez-Ruiz, C., Fernandez-Santos, B., Putwain, P.D., Fernandez-Gomez, M.J., 2007. Natural and man-induced revegetation on mining wastes: changes in the floristic composition during early succession. Ecological Engineering 30, 286-294.

Mcdonald, A.W., Bakker, J.P., Vegelin, K., 1996. Seed bank classification and its importance for the restoration of species-rich flood-meadows. Journal of Vegetation Science 7, 157-164.

Meissner, R.A., Facelli, J.M., 1999. Effects of sheep exclusion on the soil seed bank and annual vegetation in chenopod shrublands of South Australia Journal of Arid Environments 42, 117-128.

Milberg, P. 1992. Seed bank in a 35-year-old experiment with different treatments of a semi-natural grassland. Acta Oecologica 13, 743-752.

Numata, M., Hayashi, I., Komura, T., Oki, K., 1964. Ecological studies on the buried-seed population in the soil as related to plant succession. Japanese Journal of Ecology 14, 207-216.

Peco, B., Ortega, M., Levassor, C., 1998. Similarity between seed bank and vegetation in Mediterranean grassland: a predictive model. Journal of Vegetation Science 9, 815-828.

Pickett, S.T.A., Collins, S.L., Armesto, J.J., 1987. A hierarchical consideration of causes and mechanisms of succession. Vegetatio 69, 109-114.

Pielou, E.C., 1966. Shannon's formula as a measure of species diversity: its use and misuse. American Naturalist 100, 463-465.

Prasad, M.N.V., 1998. Metal-biomolecule complexes in plants: occurrence, functions and applications. Analysis, 26-28.

Prasad, M.N.V., 1999. Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems, second ed. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.

Qiu-Fang, Z., Yuan-Yuan, L., Cai-Hong, P., Cong-Ming, L., Bao-Shan, W., 2005. NaCl enhances thylakoid-bound SOD activity in leaves of C3 halophyte *Suaeda salsa* L. Plant Science 168, 423-430.

Regvar, M., Vogel-Mikus, K., Kugonic, N., Turk, B., Batic, F., 2006. Vegetational and mycorrhizal successions at a metal polluted site: indications for the direction of phytostabilisation ? Environmental Pollution 144, 976-984.

Roberts, H.A., 1981. Seed banks in soils. Advances in Applied Biology 6, 1-55.

Roy, S., Sen, C.K., Hänninen, O., 1996. Monitoring polycyclic aromatic hydrocarbons using 'moss bags': bioaccumulation and responses of antioxidant enzymes in *Fontinalis antipyretica* Hedw. Chemosphere 32, 2305-2315.

Ryser, P., Sauder, W.R., 2006. Effects of heavy-metal -contaminated soil on growth, phenology and biomass turnover of *Hieracium piloselloides*. Environmental Pollution 140, 52-61.

Shannon, C.E., Weaver, W., 1963. The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana.

Sorensen, T., 1948. A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content and its applications to analysis of the vegetation on Danish commons. Biologiske Skrifter 5, 1-34.

Sverdrup, L.E., Krogh, P.H., Nielsen, T., Kjaer, C., Stenersen, J., 2003. Toxicity of eight polycyclic aromatic compounds to red clover (*Trifolium pratense*), tyegrass (*Lolium perenne*), and mustard (*Sinapsis alba*). Chemosphere 53, 993-1003.

Templeton, A.R., Levin, D.A., 1979. Evolutionary consequences of seed pools. American Naturalist 114, 232-249.

Ter Heerdt, G. N. J., Verweij, G. L., Bekker, R. M., Bakker, J.P., 1996. An improved method for seed-bank analysis: seedling emergence after removing the soil by sieving. Functional Ecology 10, 144-151.

Thompson, K., Grime, J.P., 1979. Seasonal variation in the seed banks of herbaceous species in ten contrasting habitats. The Journal of Ecology 67, 893-921.

Tordoff, G.M., Baker, A.J.M., Willis, A.J., 2000. Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. Chemosphere 41, 219-228.

Tracy, B.F., Renne, I.J., Gerrish, J., Sanderson, M.A., 2004. Effects of plant diversity on invasion of weed species in experimental pasture communities. Basic and Applied Ecology 5, 543-550.

Tsuyyzaki, S., 1994. Fate of plants from buried seeds on Volcano Usu, Japan, after the 1977–1978 eruptions. American Journal of Botany 81, 395-399.

Unyayar, S., Celik, A., Cekic, F.O., Gozel, A., 2006. Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. Mutagenesis 21, 77-81.

Vazquez, M.D., Poschenrieder, C., Barcelo, J., 1987. Chromium VI induced structural and ultrastructural changes in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). Annals of Botany 59, 427-438.

Vécrin, M.P., Grévilliot, F., Muller, S., 2007. The contribution of persistent soil seed banks and flooding to the restoration of alluvial meadows. Journal for Nature Conservation 15, 59-69.

Willems, J.H., Peet, R.K., Bik, L., 1993. Change in chalk-grassland structure and species richness resulting from selective nutrient addition. Journal of Vegetation Science 4, 203-212.

Williams, E.D., 1984. Changes during 3 years in the size and composition of the seed bank beneath a long-pasture as influenced by defoliation and fertilizer regime. Journal of Applied Ecology 21, 603-615.

CHAPITRE 5.

TROISIEME APPROCHE : 1- COLONISATION VEGETALE D'UN SOL DE COKERIE : ROLE DES ENZYMES ANTIOXYDANTES

Ecological recovery of vegetation on a coke-factory soil: role of plant antioxidant enzymes and possible implications in site restoration

Marc Dazy*, Vincent Jung, Jean-François Férard and Jean-François Masfaraud

Article accepté par la revue Chemosphere (2008)

doi:10.1016/j.chemosphere.2008.09.014

Abstract

The present paper investigated the short-term colonization by plants of a highly degraded soil in field conditions. The objectives were to identify, through phytosociological analysis, the plant species able to grow on such polluted areas and to characterize pollutant effects at different biological levels through analyses of plant oxidative status, plant growth or community indexes of richness and biodiversity. Our results showed that among the plants present in the uncontaminated surrounding area, only few species were able to colonize the polluted soil. These species were typical of the first years of grassland successions. Ecological indexes proved that the polluted-soil vegetation presented a lower degree of species richness and biodiversity than the control area. These discrepancies were partly explained by pollutant phytotoxicity. Indeed, for several species including *E. canadensis* and *O. biennis*, we observed toxic effects of the polluted soil on plant height and biomass. Moreover, at the cellular level, changes in antioxidant enzyme activities (SOD, CAT, APX, GPX, GRD) and lipid peroxidation level (MDA) were observed. Such biochemical changes seemed to play an important role on plant sensitivity/tolerance to pollutants and thus to render them more or less competitive for colonization of such disturbed areas.

Keywords: species richness, biodiversity, pollution, colonization, antioxidant enzymes, lipid peroxidation

I-) Introduction

In northern and eastern France, coal tar processing, metallurgical industry complexes and mining activities during the last century caused extensive damages to local vegetation and important changes in soil characteristics with the highest disturbed areas found immediately in the surroundings of industrial plants (Gunn, 1995; Dudka and Adriano, 1997). Today, most of industrial wastelands are abandoned without particular safety measures and their potential environmental impacts have been poorly studied.

Indeed, in these areas, the risk of lateral dispersion by wind erosion of contaminated particles and leaching of contaminants into nearby watercourses or ground water due to water percolating through polluted soil is a realistic and significant hazard (Vangronsveld et al., 1996; Venditti et al., 2000; Bleeker et al., 2002).

A range of reclamation techniques is available for contaminated soils but only revegetation can complete their long-term rehabilitation (Bleeker et al., 2002), even if several studies suggested a possibility for pollutants to be accumulated by plants and to be biomagnified through food-chains (Dudka et al., 1996; Scheifler et al., 2002; Notten et al., 2005; Zheng et al., 2007) leading to human-health risks for local populations.

Restoration of an appropriate plant cover can be effective in providing the necessary surface stability to prevent wind-blow of contaminated particles, and in reducing water pollution by interception of a substantial proportion of incident precipitation (Vangronsveld et al., 1995; Wong, 2003). Vegetative stabilization also improves the chemical and biological characteristics of the contaminated soil by increasing the organic matter content, nutrient levels, cation exchange capacity and biological activity (Arienzo et al., 2004). These chemical, biological and physical improvements accelerate the development of a viable nutrient cycle and self-sustaining vegetative cover and restore the affected area to some acceptable steady-state condition for secondary land use (Norland and Veith, 1995).

Although revegetation is desirable, industrial wastelands are very unfavourable environments for plants because of the presence of many growth-limiting factors, particularly residual high levels of heavy metals, macronutrient deficiencies and poor substrate structure (Tordoff et al., 2000). Such features result, even many years after abandonment, in areas generally characterised by bare and sparsely vegetated lands dominated by pollution resistant plant species (Gunn, 1995; Dudka and Adriano, 1997).

De facto, it is necessary to improve our knowledge concerning the characteristics and behaviour of vegetation communities growing on these highly disturbed sites. Identification and characterization of plant species capable of growing and surviving on polluted areas could also be very helpful to develop phytostabilization technologies (Kramer et al., 2000). Consequently, experimentation has been undertaken in order to elucidate and overcome limitations to vegetation establishment, allowing large-scale revegetation schemes to be formulated (Tordoff et al., 2000). These studies were performed in a number of potentially hazardous sites including a former metallurgical landfill (Remon et al., 2005), a copper-smelter grassland (Ginocchio, 2000) or ancient gasworks and coke-factories (Henner et al., 1999) with descriptions of plant communities and measurements of heavy metal accumulation or pollutant effects on growth and germination. However, in none of these studies effects at the cellular level were taken into account, and no explanations of plant tolerance/sensitivity mechanisms to high pollutant concentrations were highlighted.

Heavy metals are often present in industrial-wasteland soils and have been demonstrated to exert toxic effects on plants including alterations in photosynthetic and respiration processes or inhibition of plant growth and germination (Vasquez et al., 1987; Kimbrough et al., 1999; Aravind and Prasad, 2005). They were shown to stimulate the formation of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide ($O_2^{\bullet -}$) and hydroxyl ($OH^{\bullet}$) radicals, which are amongst the most reactive compounds produced during heavy metal stress (Prasad, 1999) and lead to multiple toxic effects like lipid peroxidation, protein cleavage or DNA damages (Unyayar et al., 2006). However, in order to scavenge ROS and to avoid oxidative damages, cells are able to protect themselves by using enzymatic and non enzymatic mechanisms, including superoxide dismutase, catalase, peroxidases or glutathione (Apel and Hirt, 2004; Smirnoff, 1998). Consequently, we hypothesized that species colonizing polluted areas may present less sensitivity to contaminants due to efficient antioxidant defence systems.

In the present paper, we investigated the colonization by plants of a highly degraded soil in field condition. Our objectives were to i) to identify, through a phytosociological analysis, the plant species able to grow on such polluted areas and therefore susceptible to be used in a phytostabilization strategy; ii) to characterize pollutant biological effects at different organizational levels through analyses of plant oxidative status, plant growth or community indexes of richness and biodiversity.

II-) Material and methods

II-1-) Site description and physico-chemical properties

This work was performed in the industrial wasteland of a former coke-factory at the Homécourt experimental site (Lorraine, North-East of France: latitude 49°23′33", longitude 5°98′33"). The mean annual rainfall of the area is 720 mm and the mean annual temperature 11°C. In this site, plots were filled in Spring 2005 with a contaminated soil sampled in a former coke-factory located at Neuves-Maisons (Lorraine, France) in order to study its colonization by plants. At the same time, in an adjacent area, a soil that exhibited similar physico-chemical properties but containing much less metals and PAHs was considered as a control area. No aboveground vegetation was detected in the control area at the beginning of the experiment.

For both control and contaminated areas, soil physico-chemical properties and pollutant concentrations were analysed (Table 5.1). The granulometric distribution of the two soil samples was comparable. Some discrepancies were observed for C/N or pH as their values were higher in the control samples. On the contrary, all heavy metal concentrations were higher in the contaminated soil, especially concerning Cr, Cu, Zn and Pb. The same tendency was found for PAHs with a total concentration comprised between 8 and 152 mg/kg for the control area against 1528 and 1606 mg/kg for the polluted area with pyrene and fluoranthene as the two major compounds. Moreover, the control soil presented pollutant concentrations below French soil concentration values above which soil is considered as a pollution source (VDSS), excepted for As and Pb which were just above the limits (19 and 200 mg/kg dw, respectively), proving its low impact. On the contrary, in the contaminated soil, concentrations of Cr, Cu, Hg, Ni and Pb but also benzo[a]anthracene, indeno[1,2,3-cd]pyrene and benzo[a]pyrene were all above VDSS, proving a higher potential impact (BRGM, 2001).

	Control	**Polluted**
Soil characteristics		
Clay (< 2 µm) in g/kg	93 - 159	101 - 150
Silts (2/20 µm) in g/kg	107 - 134	105 - 158
Silts (20/50 µm) in g/kg	104 - 120	59 - 93
Sands (50/200 µm) in g/kg	208 - 291	61 - 104
Sands (200/2000 µm) in g/kg	372 - 487	508 - 644
C/N	27 - 55	21 - 24
pH	8.1 - 8.5	6.8 - 7.3
Pollutant Concentrations in mg/kg soil dw.		
Cr	43 - 70	562 - 679
As	34 - 54	nd
Cu	22 - 29	128 - 133
Ni	24 - 34	94 - 99
Zn	301 - 563	1870 - 2350
Cd	0.4 - 0.5	2 - 3
Pb	113 - 437	421 - 543
Hg	0.1 - 0.8	4 - 24
Naphthalene	0.5 - 3.5	35 - 39
Acenaphtylene	0.8 - 4	45 - 51
Acenaphtene	0.1 - 0.5	53 - 64
Fluorene	0 - 1.8	50 - 63
Phenanthrene	0.3 - 11	135 - 139
Anthracene	1.1 - 10	69 - 86
Fluoranthene	0.7 - 27	250 - 259
Pyrene	0.2 - 21	176 - 180
Benzo[a]anthracene	0.9 - 16	128 - 137
Chrysene	0.2 - 12	63 - 77
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	0 - 15	114 - 120
Benzo[b]fluoranthene	0.9 - 10	146 - 152
Benzo[k]fluoranthene	0 - 4.6	49 - 51
Benzo[a]pyrene	1.6 - 11	111 - 114
Dibenzo[a,h]anthracene	0 - 3	23 - 24
Benzo[g,h,i]perylene	0.7 - 7	67 - 71
Σ 16 US-EPA PAHs	**8 - 152**	**1528 - 1606**

Table 5.1. Physico-chemical properties of the control and contaminated soils expressed as min-max of 4 values. nd: not determined.

II-2-) Ecological analyses

In September 2006 (i.e. fourteen months after the soils were spread out on the field), the following data were recorded for both polluted and reference areas: (i) plant species inventory, (ii) plant coverage for each species, estimated from the abundance-dominance (Ci) scale of Braun-Blanquet (1932). Some plants could only be identified at the genus level since at the time of sampling they were not flowered. Species richness (S) was then estimated, indexes of Shannon-Weaver's diversity (H') and Pielou's equitability (J) were calculated according to Shannon and Weaver (1963) and Pielou (1966) respectively. As the sampling method used for vegetation was the nonlinear cover scale of Braun-Blanquet (1932), it was necessary to convert it into cover percentages for the statistical analysis using the median value of cover. We used: 0.05 for the class (1) cover < 5%; 0.15 for the class (2) 5% < cover < 25%; 0.375 for the class (3) 25% < cover < 50%; 0.625 for the class (4) 50% < cover < 75%; 0.875 for the class (5) cover > 75%. Finally, for the class "+", we used the frequency 0.0125.

II-3-) Physiological and biochemical analyses

Consecutively to phytosociological analyses, three species (*Erigeron canadensis*, *Matricara recutita* and *Oenothera biennis*) were chosen according to their distribution in polluted and reference areas, which reflected hypothetically their degree of sensitivity/tolerance to pollution. For each species, biomass and height were measured on 7 individuals found in both areas at the flowering stage (highest degree of the plant life cycle) so that data were comparable.

The same individuals were used for biochemical analyses. Samples were brought back to laboratory and stored at -80°C until analysis. Then, 100 mg of leaves were suspended in 125 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8) and crushed in a mortar placed on ice. The resulting suspension was centrifuged at 15,000 *g* for 10 min at 4°C and supernatant (from then on designed as "plant extract") was used for biochemical analyses. All methods presented below were optimised for our experimental conditions and are thus described with references to the original articles. In order to calculate enzyme activities, protein contents were determined according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard.

II-3-1-) Superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

Superoxide dismutase was measured by the method of Qiu-Fang *et al.* (2005). The photochemical reduction of nitro blue tetrazolium (NBT) is inhibited and the level of inhibition was used to quantify the activity. The reaction solution consisted of 600 µL of a 125 mM potassium-phosphate buffer (pH 7.8) containing 3 mM $MgSO_4$, 3.1 mM EDTA and 2% polyvinyl polypyrrolidone (PVPP). The mixture was then completed to a final volume of 1 mL with 100 µL of methionine (130 mM), 100 µL of riboflavin (600 µM), 100 µL of NBT (22.5 mM), and 100 µL of plant extract. The reaction mixture was illuminated for 15 min and turning the light off stopped the reaction. A control reaction was performed without plant extract which was replaced by an equal volume of buffer. Assays were carried at 25°C and the reaction was measured spectrophotometrically at 560 nm. One unit of enzyme activity was defined as the quantity of enzyme that reduced the A_{560} of control by 50%.

II-3-2-) Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

Catalase was determined according to the method published by Chaoui *et al.* (1997). The disappearance of H_2O_2 was evaluated by measuring the decrease in absorbance at 240 nm (molar extinction coefficient: $\varepsilon = 36.6\ mM^{-1}cm^{-1}$) of a reaction mixture containing 100 µL of H_2O_2 (100 mM), 100 µL of plant extract and completed to 1 mL final volume with 125 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0).

II-3-3-) Guaiacol peroxidase (GPX, EC 1.11.1.7)

Guaiacol peroxidase was assayed according to the method developed by Roy *et al.* (1996). The reaction mixture consisted of 100 µL plant extract, 100 µL guaiacol (22 mM), 100 µL H_2O_2 (100 mM) and completed to 1 mL final volume with 125 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0). The increase in absorbance was measured spectrophotometrically at 470 nm ($\varepsilon = 26.6\ mM^{-1}\ cm^{-1}$).

II-3-4-) Ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11)

Ascorbate peroxidase was determined according to Garcia-Limones *et al*. (2002). The reaction mixture consisted of 100 µL ascorbate (5 mM), 100 µL H_2O_2 (100 mM), 100 µL EDTA (1 mM), 100 µL of plant extract and was completed to a final volume of 1 mL with 125 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0). The oxidation of ascorbate was determined by the increase in absorbance at 290 nm ($\varepsilon = 2.8\ mM^{-1}\ cm^{-1}$).

II-3-5-) Glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2)

Glutathione reductase was assayed according to Garcia-Limones *et al.* (2002). The reaction mixture consisted of 100 µL plant extract, 100µL NADPH (60 mM), 100 µL oxidised glutathione (5 mM) and was completed to a final volume of 1 mL with 125 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8). The oxidation of NADPH was determined by its absorbance decrease at 340 nm ($\varepsilon = 6.2\ mM^{-1}\ cm^{-1}$).

II-3-6-) Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was evaluated by the thiobarbituric assay of Aravind and Prasad (2003). Briefly, 900 µL of a 0.5% thiobarbituric acid (TBA) in 20% trichloroacetic acid (TCA) (w/v) solution were added to 100 µL of plant extract. The mixture was incubated at 95°C for 30 min and the reaction was stopped by transferring tubes on ice. The non-specific absorbance at 600 nm was subtracted from the 532 nm absorbance and $\varepsilon = 155\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ was used for the calculation of malondialdehyde (MDA) level.

II-4-) Data analyses

Significant differences ($p<5\%$) from control were highlighted by using Dunnett's test, performed with Statistica 6.0 Software (©Statsoft).

III-) Results

After 14 months of colonization, several species appeared in the plots and were compared to the species composing the plant community of the control area. Most of these species were opportunistic and ruderal species often founds during the first-steps of ecological successions (Bazzaz, 1996).

The abundance of each species was evaluated in both control and contaminated area (Table 5.2). In the control area, *Holcus lanatus* and *Solidago canadensis* were the most abundant species while *Chenopodium album* dominated the polluted area. Moreover, the control area presented shrub species like *Crateagus monogyna* and *Rubus* sp. which were not found in the polluted area. With the exception of the 2 species *Capsella bursa-pastoris* and *C. album*, all species identified on the polluted area were also present on the control area. For these 2 particular species, one may hypothesize that soil contamination was not the environmental factor that governed first their distribution. Differences in the seed-bank compositions of the two soils may explain these discrepancies.

Ecological indexes highlighted structural differences between both communities. Indeed, 35 species were observed in the control area while only 15 were able to grow in the polluted area. The two areas also differed in term of species diversity (with H' values of 2.98 and 1.32 for the control and polluted areas, respectively) and equitability (with J values of 0.58 and 0.33, respectively).

To complete these results, Fig. 5.1 presented the community proportions of each plant family for the two areas. In the control area (Fig.5.1A), *Asteraceae* and *Poaceae* represented more than 50% of the individuals followed by *Rosaceae*, *Scrophulariaceae* and *Boraginaceae*. A total of 16 families were found in this area. At the opposite, on the polluted area (Fig.5.1B) only 8 families were observed, among which *Chenopodiaceae*, *Asteraceae* and *Poaceae* represented more than 85% of the individuals.

	Control Area	**Polluted Area**
Arabidopsis thaliana	+	
Artemisia vulgaris	+	1
Capsella bursa-pastoris		+
Cardamine hirsuta	+	
Centaurea stoebe	+	
Cerastium fontanum	+	
Chenopodium album		2
Cirsium arvense	+	+
Crataegus monogyna	1	
Dactylis glomerata		+
Echium vulgare	1	
Elymus repens	1	
Erigeron canadensis	+	1
Erodium cicutarium	1	
Euphorbia cyparissias	1	
Festuca rubra	1	1
Galium aparine	+	+
Holcus lanatus	2	
Hypericum perforatum	1	
Lamium purpureum	+	
Lolium perenne	1	1
Matricaria recutita	+	+
Myosotis arvensis	+	
Oenothera biennis	1	+
Plantago lanceolata	+	
Poa pratensis	+	
Polygonum aviculare		+
Rubus sp	1	
Saxifraga tridactylites	+	
Senecio vernalis	+	+
Solidago canadensis	2	
Sonchus oleraceus	+	+
Tanacetum vulgare	1	
Taraxacum officinale	+	
Trifolium repens	+	
Verbascum thapsus	1	
Veronica hederifolia	+	
Veronica officinalis	+	+
Vicia craca	+	
Species Richness (S)	**35**	**15**
Shannon-Weaver Diversity (H')	**2.98**	**1.32**
Pielou Equitability (J)	**0.58**	**0.33**

Table 5.2. Phytosociological table containing species occurrence (as Braun-Blanquet indexes) and ecological indexes.

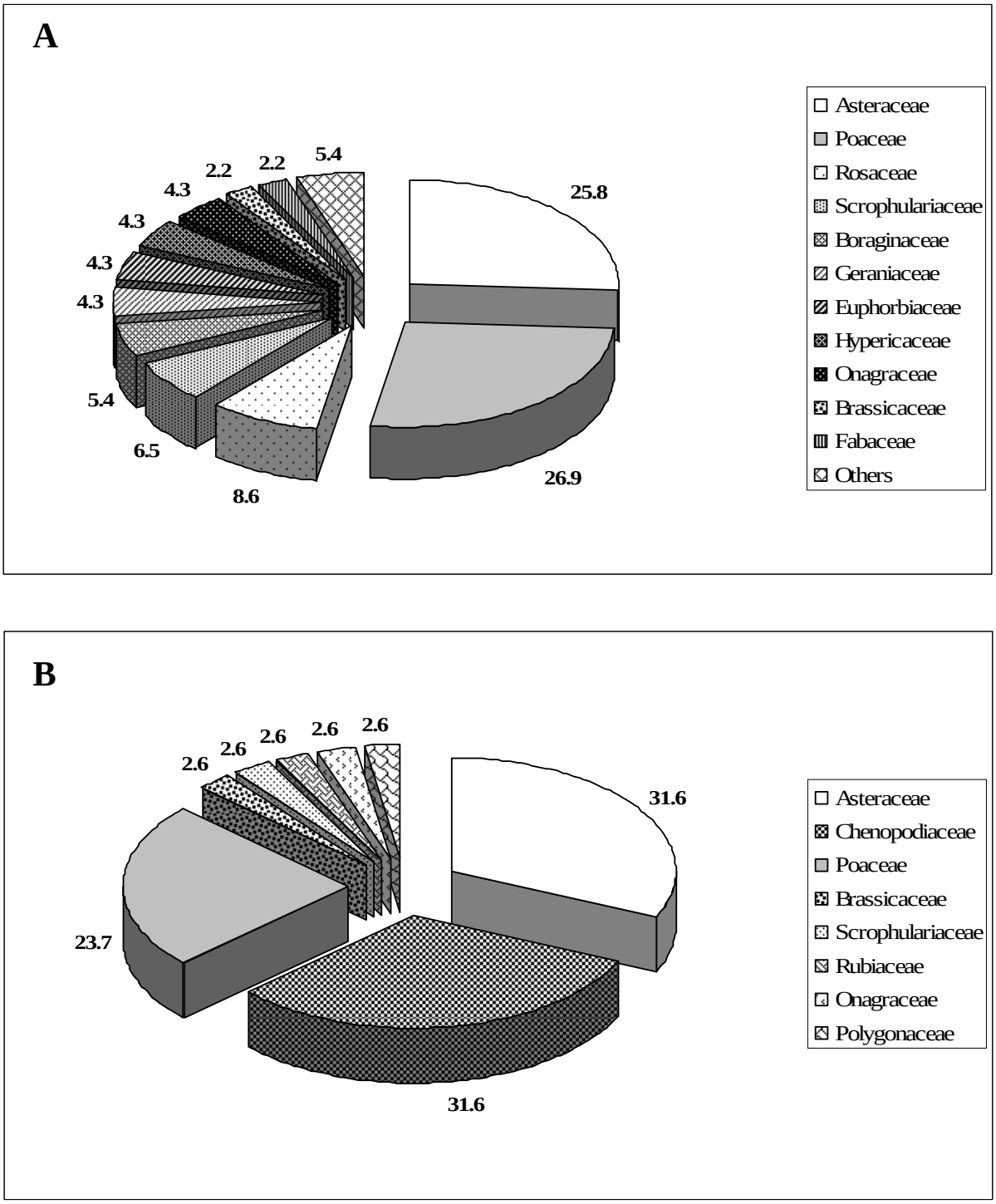


Figure 5.1. Proportions (in %) of each plant family in the communities described in the control (A) and polluted (B) areas. For the control area, "other" families were *Caryoplyllaceae*, *Lamiaceae*, *Plantaginaceae*, *Rubiaceae* and *Saxifragaceae*, all representing 1.08% of the community individuals.

Three species were then selected for the study of plant biological responses to pollutants: *E. canadensis* which presented a higher abundance in the polluted area than in the control area, *O. biennis* which presented an inverse distribution (lower abundance in the polluted area than in the control area) and *M. recutita* for which no difference on abundance was noticed.

Plant biological responses to pollution are presented in Fig.5.2. No effect on height was detected for *E. canadensis* even if a significant decrease in biomass (82% from control) was observed. Significant decreases were noticed in *O. biennis* for both height and biomass (63 and 59% from control, respectively). On the contrary, *M. recutita* exhibited increases for both parameters, with values equalling 154% and 120% of control values for height and biomass respectively.

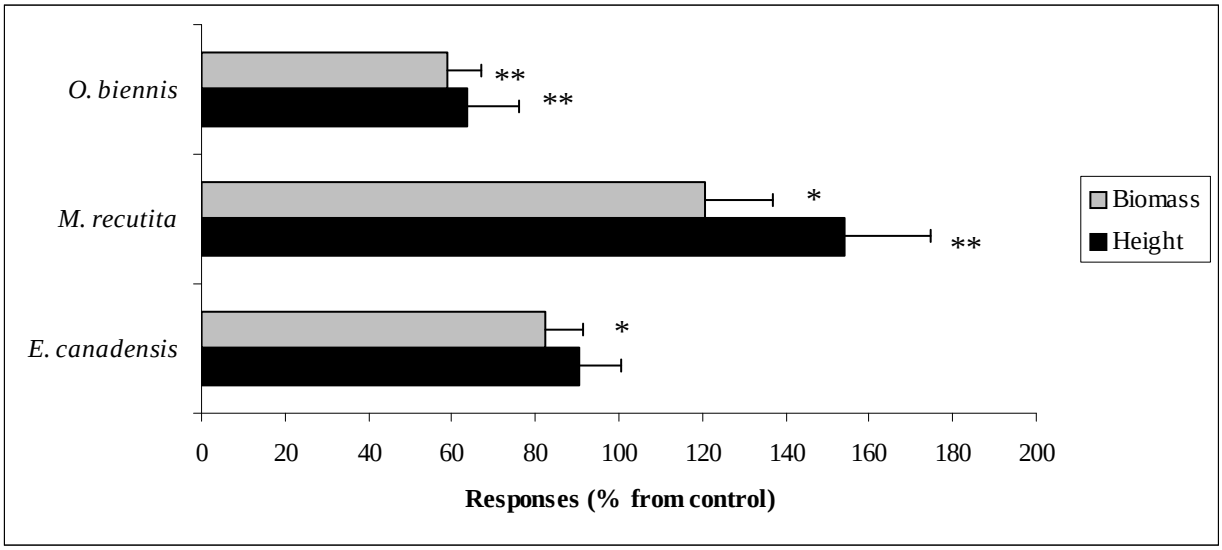


Figure 5.2. Biological responses of the three selected species. Asterisks indicate significant effects compared to control area (Dunnett's test; n = 7; * $p<0.05$; ** $p<0.01$). Mean control values were always 100% with standard deviations below 7%.

Moreover, differences on antioxidant enzymes and lipid peroxidation were also noticed for plant sampled from the polluted and control area (Fig.5.3). For *E. Canadensis* all the anti-oxidative enzymes investigated and MDA level were the highest in individuals issued from the polluted area and reached at least 140% of the control values. When experiencing the polluted soil, *M. recutita* exhibited increases for all parameters excepting CAT and MDA. These increases did not exceed 140% of the control values. Finally, *O. biennis* presented

increases in MDA but also in CAT and SOD activities (213%, 242% and 234% of control, respectively). Significant decreases in APX, GPX and GRD activities (35, 86 and 76% of control, respectively) were also noticed.

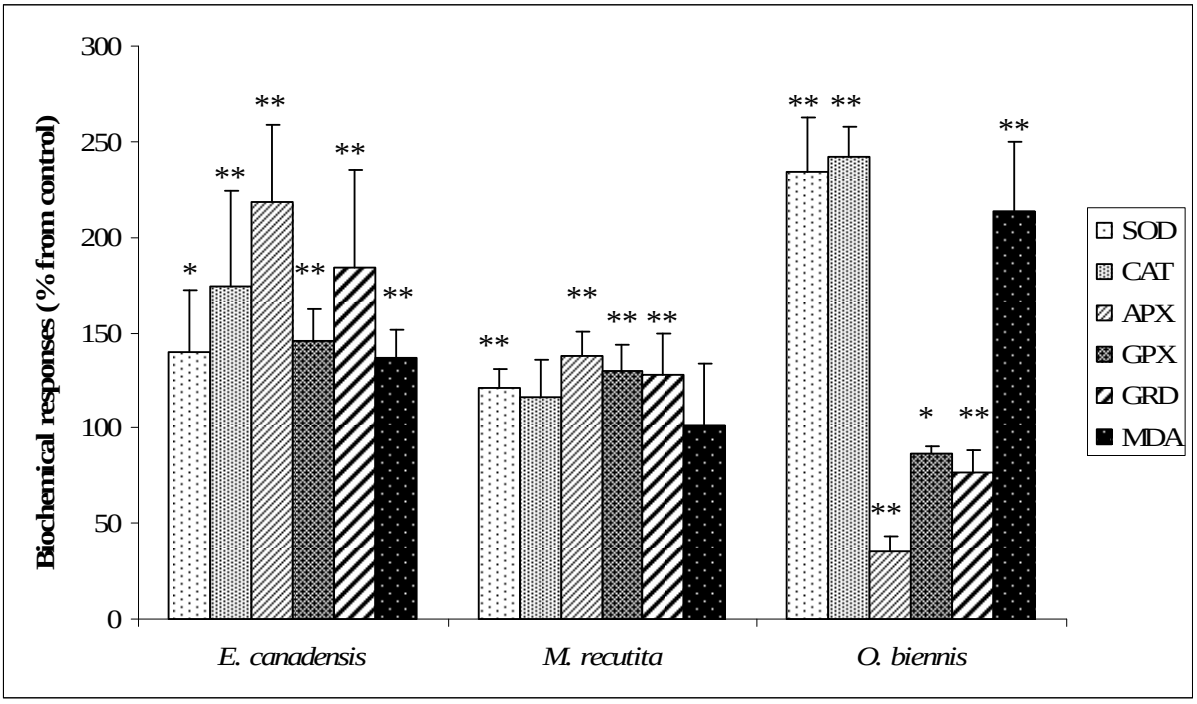


Figure 5.3. Biochemical responses of the plants taken in the contaminated area. Asterisks indicate significant effects of the pollutants testified by Dunnett's test (n = 7; * $p<0.05$; ** $p<0.01$). Mean control values were always 100% ± sd.

IV-) Discussion

Details of the species compositions of the polluted-area plant-community showed similarities with species-compositions described in previous studies. Indeed, *L. perenne*, *C. album*, *G. aparine* or *P. aviculare* were already found in a disturbed perennial-grassland (Luzuriaga et al., 2005) while *A. vulgaris*, *E. canadensis* and *F. rubra* were observed in ancient gaswork soils (Henner et al., 1999). *S. oleraceus* and *C. arvense* were noticed in both studies. Moreover, Bazzaz (1996) noticed that annuals dominated during the first year of succession and considered *Asteraceae* as one of the most representative family of the first succession steps. In our study, this family represented 25.8 and 31.5% of the individuals found in the control and the polluted areas, respectively. In the same way, *Poaceae* and

Chenopodiacea were two of the most abundant families in the polluted area, while the shrubs *Rosaceae* family-members *Rubus sp*. and *C. monogyna* represented a significant proportion of the control-area plant community.

The presence of shrubs in the control community only 14 months after the beginning of the experiment was quite surprising as such plants usually appear only after several years of succession (Bazzaz, 1996; Zhang, 2005). Indeed, the colonization process often follows a typical pattern of continuing species replacement. Early-colonizing species are typically annual plants and these are eventually replaced by later-colonizing perennial dominated communities (Bazzaz, 1996). De facto, this observation exhibited differences in colonization efficiency between both areas, proving a higher degree of complexity of the control community and a possible impact of heavy metal pollution.

Ecological indexes also showed that the plant community found in the control area was more complex and structured than the one in the polluted-area with higher values for species richness, Shannon-Weaver diversity and Pielou equitability. The species richness found in the polluted area (S=15) was closed to the 18 species found by Luzuriaga *et al.* (2005) in a disturbed perennial-grassland and the 16-17 species described by Conesa et al. (2007) on Spanish mine tailings, but much lower than the 28 species found by Remon *et al.* (2005) in a former metallurgical landfill and the 32 species described on ancient gaswork soils by Henner *et al.* (1999). However, no information about the age of the community was given in these papers leading these results difficult to compare.

Concerning diversity indexes, our results were close to the values given by Conesa et al. (2007) who found H' values of 1.5-2 and 2.5-3 for plant communities growing in two sites contaminated by heavy metals. However, in the present study, differences in species richness and diversity were partly explained by the acidity of the soils, stable plant communities being unable to establish on acid soils.

Nevertheless, the decreases in species richness and diversity observed here were supposedly linked to the high contamination of the soils which could exhibit phytotoxic effects on plant species and colonization process. To study the possible relationships between soil pollution and plant community structure, we selected three species according to their differences of abundance on the control and polluted areas.

First, *E. canadensis*, which abundance was higher on the polluted soil, also exhibited a moderate decrease in biomass and no significant effect at all on growth when grown on this soil. Lipid peroxidation level (136% of control) and all antioxidant enzyme activities were

also increased, indicating that the plants suffered from an oxidative stress leading to cellular damages.

Then, *O. biennis*, which abundance was lower in the polluted area, exhibited in this soil significant decrease for both growth and biomass. That species also exhibited the highest increase in SOD (234% of control) and CAT (242% of control) activities but also in MDA level (213% of control) indicating a high degree of oxidative stress and cellular damages. This cytotoxicity was also suggested by the decreases in APX, GPX and GRD activities (35%, 86% and 76% of control, respectively) which indicated an inhibition of the ascorbate-glutathione cycle, considered by Foyer et al. (1994) and Prasad (1998) as the major detoxifying system of the plant cells. Such results tend to prove that *O. biennis* was more sensitive to pollution that *E. canadensis*.

Finally, *M. recutita*, for which no changes on abundance were noticed through the two conditions, exhibited increases for both growth and biomass when grown on the polluted area. Significant increases in antioxidant enzymes (SOD, APX, GPX and GRD) indicated a potential generation of ROS induced by the soil pollutants but the stability of MDA level (compared to control) suggested that cellular defence systems were able to cope with these compounds and protected efficiently the cells.

Globally, antioxidant defence systems seemed to prevent plant cells from damages like lipid peroxidation and to confer on organisms their tolerance to pollutants. When such systems are overloaded, plants exhibited phytototoxicity symptoms like decreases in growth and biomass. On the opposite, plant species which exhibited efficient defence systems could cope with the pollution and develop themselves on contaminated soils. In conclusion, cellular defence systems seemed to play two major roles in plant wasteland-colonization giving plants their tolerance/sensitivity to pollutants but also giving them competitive skills.

However, in this study, only 3 species were studied and it would be necessary to use other biological models to consolidate our conclusions. Moreover, it would be interesting to see if the species unable to grow on such polluted sites possessed or not efficient defence systems. In this way, laboratory experiments would be required. Furthermore, other physiological mechanisms, like root absorption, heavy-metal translocation or ligand production, could be partly responsible of the plant tolerance to heavy metals.

From an applied point of view, that study has permitted to determine several plant species able to establish on highly contaminated sites and thus, presenting potential use in phytostabilization technologies. Among these species were *A. vulgaris*, *C. arvense*, *E.*

canadensis, M. recutita, S. oleraceus, F. rubra and *L. perenne*. If the two last species have already been described as plant with potential to clean-up toxic metals (Prasad and Freitas, 2003), the other species were not soon considered for such purposes.

V-) Conclusion

This study presented for the first time possible relationships between soil pollution, plant cellular defence systems and vegetation community structure and composition in early succession steps. Accumulated metals were not determined since it was not under the scope of the present work to describe soil-plant metal transfers. Also, it is not expected that accumulated metals would necessarily explain plant biochemical responses since i) not only metals may be present but also organics, either identified (PAHs) or not, and ii) accumulated contents in tissues do not reflect concentrations in the vicinity of cellular targets. Whether, we focused on establishing relationships between plant responses measured at different biological scales, from cells to communities. Our results showed that only several plant species were able to colonize a highly polluted soil. The floristic composition observed in the first-steps of the colonization process was closed to plant communities described in the first years of grassland successions. Ecological index values determined for both communities (polluted and control plots) presented low values which is typical of the early stages of a succession. Besides, ecological indexes proved that the polluted-soil vegetation presented lower species richness and biodiversity than the control soil. Such discrepancies could be partly explained by pollutant phytotoxicity. Indeed, we observed phytotoxic effects on plant growth and biomass but also at the cellular level with changes in antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation level. Such physiological changes seemed to play a significant role on plant sensitivity/tolerance to pollutants and thus to render them more or less competitive for colonization of such disturbed areas.

VI-) Acknowledgements

This study has been realized within the framework of a transversal interdisciplinary project (GISFI) contributing to the resolution of pollution-related issues and designed to promote clean technologies for decontamination and treatment of industrial wastelands. This

work was granted by Region Lorraine and Marc Dazy's PhD thesis was supported by the French Ministry of Education and Research.

VII-) References

Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Ann. Rev. Plant Biol. 55, 373-399.

Aravind, P., Prasad, M.N.V., 2003. Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: a free floating freshwater macrophyte. Plant Physiol. Bioch. 41, 391-397.

Aravind, P., Prasad, M.N.V., 2005. Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism. Plant Physiol. Bioch. 43, 107-116.

Arienzo, M., Adamo, P., Cozzolino, V., 2004. The potential of *Lolium perenne* for revegetation of contaminated soil from a metallurgical site. Sci. Total Environ. 319, 13-25.

Bazzaz, F.A., 1996. Plants in changing environments. Cambridge University Press, Cambridge.

Bleeker, P.M., Assuncao, A.G.L., Teiga, P.M., de Koe, T., Verkleij, J.A.C., 2002. Revegetation of the acidic, As contaminated Jales mine spoil tips using a combination of spoil amendments and tolerant grasses. Sci. Total Environ. 200, 1-13.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Braun-Blanquet, J., 1932. Plant Sociology. McGraw-Hill, New-York.

BRGM, 2001. Guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués. BRGM (Ed.), Orléans.

Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M.H., El Ferjani, E., 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Sci. 127, 139-147.

Conesa, H.M., Garcia, G., Faz, A., Arnaldos, R., 2007. Dynamics of metal tolerant plant communities' development in mine tailings from the Cartagena-La Union Mining District (SE Spain) and their interest for further revegetation purposes. Chemosphere 68, 1180-1185.

Dudka, S., Adriano, D., 1997. Environmental impacts of ore mining and processing: a review. J. Environ. Qual. 26, 590-602.

Dudka, S., Piotrowska, M., Terelak, H., 1996. Transfer of cadmium, lead, and zinc from industrially contaminated soil to crop plants: a field study. Environ. Pollut. 94, 181-188.

Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunert, K.H., 1994. Photooxidative stress in plants. Physiol. Plantarum 92, 696-717.

Garcia-Limones, C., Hervas, A., Navas-Cortes, J.A., Jimenez-Diaz, R.M., Tena, M., 2002. Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris*. Physiol. Mol. Plant P. 61, 325-337.

Ginocchio, R., 2000. Effects of a copper smelter on a grassland community in the Puchuncavi Valley, Chile. Chemosphere 41, 15-23.

Gunn, JM., 1995. Restoration and Recovery of an Industrial Region: Progress in Restoring the Smelter-Damaged Landscape near Sudbury. Springer-Verlag, New York.

Henner, P., Schiavon, M., Druelle, V., Lichtfouse, E., 1999. Phytotoxicity of ancient gaswork soils. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on plant germination. Org. Geochem. 30, 963-969.

Kimbrough, D.E., Cohen, Y., Winer, A.M., Creelman, L., Mabuni, C., 1999. A critical assessment of chromium in the environment. Crit. Rev. Env. Sci. Tec. 29, 1-46.

Kramer, P.A., Zabowski, D., Scherer, G., Everett, R.L., 2000. Native plant restoration of copper mine tailings: I. Substrate effect on growth and nutritional status in a greenhouse study. J. Environ. Qual. 29, 1762-1769.

Luzuriaga, A.L., Escudero, A., Olano, J.M., Loidi, J., 2005. Regenerative role of seed banks following an intense soil disturbance. Acta Oecol. 27, 57-66.

Norland, M.R., Veith, D.L., 1995. Revegetation of coarse taconite iron ore tailing using municipal solid waste compost. J. Hazard. Mater. 41, 123-134.

Notten, M.J.M., Oosthoek, A.J.P., Rozema, J., Aerts, R., 2005. Heavy metal concentrations in soil-plant-snail food chain along a terrestrial soil pollution gradient. Environ. Pollut. 138, 178-190.

Pielou, E.C., 1966. Shannon's formula as a measure of species diversity: its use and misuse.

Am. Nat. 100, 463-465.

Prasad, M.N.V., 1998. Metal-biomolecule complexes in plants: occurrence, functions and applications. Analysis 26, 25-28.

Prasad, M.N.V., 1999. Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.

Prasad, M.N.V., Freitas, H.M.O., 2003. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. Electr. J. Biotech. 6, 285-321.

Qiu-Fang, Z., Yuan-Yuan, L., Cai-Hong, P., Cong-Ming, L., Bao-Shan, W., 2005. NaCl enhances thylakoid-bound SOD activity in leaves of C3 halophyte *Suaeda salsa* L. Plant Sci. 168, 423-430.

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

Roy, S., Sen, C.K., Hänninen, O., 1996. Monitoring polycyclic aromatic hydrocarbons using 'moss bags': bioaccumulation and responses of antioxidant enzymes in *Fontinalis antipyretica* Hedw. Chemosphere 32, 2305-2315.

Scheifler, R., Gomot-de-Vauflery, A., Toussaint, M.L., 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.

Shannon, C.E., Weaver, W., 1963. The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana.

Smirnoff, N., 1998. Plant resistance to environmental stress. Curr. Opin. Biotechnol. 9, 214-219.

Tordoff, G.M., Baker, A.J.M., Willis, A.J., 2000. Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. Chemosphere 41, 219-228.

Unyayar, S., Celik, A., Cekic, F.O., Gozel, A., 2006. Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. Mutagenesis 21, 77-81.

Vangronsveld, J., Colpaer, J.V., Van Tichelen, K.K., 1996. Reclamation of bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: physiochemical and biological evaluation of the durability of soil treatment and revegetation. Environ. Pollut. 94, 131-140.

Vangronsveld, J., Van Assche, F., Clijsters, H., 1995. Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: *in situ* metal immobilization and revegetation. Environ. Pollut. 87, 51-59.

Vazquez, M.D., Poschenrieder, C., Barcelo, J., 1987. Chromium VI induced structural and ultrastructural changes in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). Ann. Bot. 59, 427-438.

Venditti, D., Durécu, S., Berthelin, J., 2000. A multidisciplinary approach to assess history, environmental risks and remediation feasability of soils contaminated by metallurgical activities. Part A: chemical and physical properties of metals and leaching ability. Arch. Environ. Con. Tox. 38, 411-420.

Wong, M.H., 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. Chemosphere 50, 775-780.

Zhang, J.T., 2005. Succession analysis of plant communities in abandoned croplands in the eastern Loess Plateau of China. J. Arid Environ. 63, 458-474.

Zheng, N., Wang, Q., Zheng, D., 2007. Health risk of Hg, Pb, Cd, Zn and Cu to the inhabitants around Huludao Zinc Plant in China via the consumption of vegetables. Sci. Total Environ. 383, 81-89.

CHAPITRE 6.

TROISIEME APPROCHE : 2- SUCCESSION VEGETALE SUR SOL POLLUE : ROLE DES SYSTEMES ANTIOXYDANTS

Possible implication of cellular defences on the revegetation of a coke-factory soil: analysis of a two-year old plant community

Marc Dazy*, Vincent Jung, Jean-François Férard and Jean-François Masfaraud

Article soumis à la revue Chemosphere

Abstract

The present paper investigated the colonization by plants of a highly degraded soil after two years of succession. The objectives were to identify, through phytosociological analysis, the plant species able to grow on such polluted areas and to characterize pollutant effects at different biological levels through analyses of plant oxidative status, plant growth and community richness and biodiversity. Our results showed that the polluted-soil vegetation presented a lower degree of species richness and biodiversity than the nearby control area, which could be partly explained by pollutant phytotoxicity. Indeed, for several species including *Erigeron canadensis* and *Oenothera biennis*, toxic effects of the polluted soil on plant height and biomass were observed. Moreover, some significant effects on leaf cells antioxidant enzyme activities (SOD, CAT, APX, GPX, GRD) and lipid peroxidation level (MDA) were observed. Such biochemical changes seemed to play an important role on plant sensitivity/tolerance to pollutants and thus to render them more or less competitive for colonization of such disturbed areas. Plant communities and biological responses were also compared to the results of previous study realized during the first succession year.

Keywords: biodiversity, soil pollution, colonization, antioxidant enzymes, lipid peroxidation, oxidative stress

I-) Introduction

Mining activities, coke-factories or metal industries can exert extensive damages to local vegetation and important changes in soil characteristics (Gunn, 1995; Dudka and Adriano, 1997). These areas are generally characterised by bare and sparsely vegetated lands, dominated by pollution resistant plant species and by severely polluted soils with high levels of heavy metals and hydrocarbons (Gunn, 1995). Today, most of industrial wastelands are abandoned without particular safety measures even if the risk of lateral dispersion of contaminated particles and leaching of contaminants into nearby watercourses or ground water is a realistic and significant hazard (Vangronsveld et al., 1996; Venditti et al., 2000; Bleeker et al., 2002).

A range of reclamation techniques is available for contaminated soils but only revegetation can complete their long-term rehabilitation (Bleeker et al., 2002). Plant cover restoration can be effective in providing the necessary surface stability to prevent wind-blow of contaminated particles, and in reducing water pollution by interception of a substantial proportion of incident precipitation (Vangronsveld et al., 1995; Wong, 2003). Vegetative stabilization also improves the chemical and biological characteristics of the contaminated soil by increasing the organic matter content, nutrient levels, cation exchange capacity and biological activity (Arienzo et al., 2004). These chemical, biological and physical improvements accelerate the development of a viable nutrient cycle and self-sustaining vegetative cover and restore the affected area to some acceptable steady-state condition for secondary land use (Norland and Veith, 1995).

However, industrial wastelands are very unfavourable environments for plants because of the presence of many growth-limiting factors including high heavy metal concentrations which have been usually cited as one of the primary factors influencing vegetation establishment and growth in industrial wastelands (Gunn, 1995; Tordoff et al., 2000). *De facto*, studies were performed in order to elucidate and overcome limitations to vegetation establishment in a number of potentially hazardous sites including a former metallurgical landfill (Remon et al., 2005), a copper-smelter grassland (Ginocchio, 2000) or ancient gasworks and coke-factories (Henner et al., 1999) with descriptions of plant communities and measurements of heavy metal accumulation or pollutant effects on growth and germination. However, in none of these studies effects at the cellular level were taken into account, and no

explanations of plant tolerance/sensitivity mechanisms to high pollutant concentrations were highlighted.

Heavy metals are common contaminants in industrial-wasteland soils and have been demonstrated to exert severe damages to vegetation and even lead to the death of sensitive individuals (Kapustka et al., 1995). Indeed, even if some heavy metals are essential micronutrients for plants as part of electron transport enzymes or by catalyzing redox reactions in mitochondria and chloroplasts, all exert toxic effects at high concentrations including alterations in photosynthetic and respiration processes or inhibition of plant growth (Vazquez et al., 1987; Kimbrough et al., 1999; Aravind and Prasad, 2005). Most of them also stimulate the formation of reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide ($O_2^{\bullet -}$) and hydroxyl ($OH^{\bullet}$) radicals, which are amongst the most reactive compounds produced during heavy metal stress (Prasad, 1999). When in excess, ROS lead to a variety of autooxidative reactions on membrane unsaturated fatty acids, producing lipid hydroperoxides and thereby cascades of reactions ultimately leading to the destruction of macromolecules and organelles (Foyer et al., 1994; Unyayar et al., 2006). However, plants possess many cellular antioxidants and antioxidant enzymes, in order to scavenge ROS and avoid oxidative damages (Smirnoff, 1998; Apel and Hirt, 2004). Ascorbate, carotenoids and thiols act as free radicals scavengers while antioxidant enzymes, like catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and peroxidases play an important role in ROS scavenging and cell injury protection (Harris, 1992).

In the present paper, we investigated the structure of a two-year old plant community which established on a bare industrial soil. Our objectives were i) to characterize, through a phytosociological analysis, the plant species able to grow on such contaminated soils ii) to assess soil phytotoxicity at different organizational levels through ecological indexes and analyses of plant growth and oxidative status of several species.

II-) Material and methods

II-1-) Site description and physico-chemical properties

This work was performed in the industrial wasteland of a former coke-factory at the Homécourt experimental site (Lorraine, North-East of France: latitude 49°23′33”, longitude 5°98′33”). The mean annual rainfall of the area is 720 mm and the mean annual temperature

11°C. In this site, four 6 m² plots were filled in Spring 2005 with a contaminated soil sampled at a former coke-factory located at Neuves-Maisons (Lorraine, France) in order to study its colonization by plants. Four control plots of the same size were delimited in an adjacent area where a non contaminated soil was spread out, and which exhibited similar physico-chemical properties. No aboveground vegetation was detected in the control area at the beginning of the experiment.

For both control and contaminated areas, soil physico-chemical properties and pollutant concentrations were analysed (Table 6.1). The granulometric distributions of the two soil samples were comparable. Some discrepancies were observed for C/N or pH as their values were higher in the control samples. On the contrary, all heavy metal concentrations were higher in the contaminated soil, especially Cr, Cu, Zn and Pb. The same tendency was found for PAHs with a total concentration comprised between 8 and 152 mg/kg for the control area against 1528 and 1606 mg/kg for the polluted area with pyrene and fluoranthene as the two major compounds. Moreover, control soil presented pollutant concentrations below French soil concentration values above which a soil is considered as a pollution source (VDSS), excepted for As and Pb which were just above the limits (19 and 200 mg/kg dw, respectively),. On the contrary, in the contaminated soil, concentrations of Cr, Cu, Hg, Ni and Pb but also benzo[a]anthracene, indeno[1,2,3-cd]pyrene and benzo[a]pyrene were all above VDSS values (BRGM, 2001).

II-2-) Ecological analyses

In July 2007 (i.e. two years after the control and contaminated soils were spread out on the field), the following data were recorded for both polluted and reference areas: (i) plant species inventory, (ii) plant coverage for each species, estimated from the abundance-dominance (Ci) scale of Braun-Blanquet (1932). Some plants could only be identified at the genus level since at the time of sampling they were not flowered. Species richness (S) was then estimated, indexes of Shannon-Weaver's diversity (H') and Pielou's equitability (J) were calculated according to Shannon and Weaver (1963) and Pielou (1966) respectively. As the sampling method used for vegetation was the nonlinear cover scale of Braun-Blanquet (1932), it was necessary to convert it into cover percentages for the statistical analysis using the median value of cover. We used: 0.05 for the class (1) cover < 5%; 0.15 for the class (2) 5% < cover < 25%; 0.375 for the class (3) 25% < cover < 50%; 0.625 for the class (4) 50% < cover

< 75%; 0.875 for the class (5) cover > 75%. Finally, for the class "+", we used the frequency 0.0125.

	Control	**Polluted**
Soil characteristics		
Clay (< 2 µm) in g/kg	93 - 159	101 - 150
Silts (2/20 µm) in g/kg	107 - 134	105 - 158
Silts (20/50 µm) in g/kg	104 - 120	59 - 93
Sands (50/200 µm) in g/kg	208 - 291	61 - 104
Sands (200/2000 µm) in g/kg	372 - 487	508 - 644
C/N	27 - 55	21 - 24
pH	8.1 - 8.5	6.8 - 7.3
Pollutant Concentrations in mg/kg soil dw.		
Cr	43 - 70	562 - 679
As	34 - 54	nd
Cu	22 - 29	128 - 133
Ni	24 - 34	94 - 99
Zn	301 - 563	1870 - 2350
Cd	0.4 - 0.5	2 - 3
Pb	113 - 437	421 - 543
Hg	0.1 - 0.8	4 - 24
Naphthalene	0.5 - 3.5	35 - 39
Acenaphtylene	0.8 - 4	45 - 51
Acenaphtene	0.1 - 0.5	53 - 64
Fluorene	0 - 1.8	50 - 63
Phenanthrene	0.3 - 11	135 - 139
Anthracene	1.1 - 10	69 - 86
Fluoranthene	0.7 - 27	250 - 259
Pyrene	0.2 - 21	176 - 180
Benzo[a]anthracene	0.9 - 16	128 - 137
Chrysene	0.2 - 12	63 - 77
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	0 - 15	114 - 120
Benzo[b]fluoranthene	0.9 - 10	146 - 152
Benzo[k]fluoranthene	0 - 4.6	49 - 51
Benzo[a]pyrene	1.6 - 11	111 - 114
Dibenzo[a,h]anthracene	0 - 3	23 - 24
Benzo[g,h,i]perylene	0.7 - 7	67 - 71
Σ 16 US-EPA PAHs	**8 - 152**	**1528 - 1606**

Table 6.1. Physico-chemical properties of the control and contaminated soils expressed as min-max of 4 values. nd: not determined.

II-3-) Physiological and biochemical analyses

Consecutively to phytosociological analyses, three species (*Erigeron canadensis*, *Matricaria recutita* and *Oenothera biennis*) were chosen according to their distribution in polluted and reference areas, which reflected hypothetically their degree of sensitivity/tolerance to pollution. For each species, biomass and height were measured on 7 individuals found in both areas at the flowering stage to ensure a comparison of data.

The same individuals were used for biochemical analyses. Samples were brought back to laboratory and stored at -80°C until analysis. Then, 100 mg of leaves were suspended in 125 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8) and crushed in a mortar placed on ice. The resulting suspension was centrifuged at 15,000 *g* for 10 min at 4°C and supernatant was used for biochemical analyses. Lipid peroxidation level and activities of superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), guaiacol peroxidase (GPX, EC 1.11.1.7), ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) and glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) were measured according to Dazy et al. (2008) and reported to protein contents which were determined according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard.

II-4-) Data analyses

Significant differences ($p<0.05$) from control were highlighted by using Mann-Whitney U test, performed with Statistica 6.0 Software (©Statsoft).

III-) Results

After 24 months of colonization, several species appeared in both control and contaminated plots. Most of these species were opportunistic and ruderal species often founds during the first-steps of ecological successions (Bazzaz, 1996).

The average abundance of each species was evaluated in both control and contaminated area (Table 6.2). In the control area, *Erigeron annuus* and *Melilotus alba* were the most abundant species while *Festuca rubra*, *Lolium perenne* and *Solidago canadensis* dominated in the polluted area. Also, 24 species were common to both lists, 17 species were

only found in the polluted area and 24 species were observed in the control soil only. For the above mentioned 17 species, one may hypothesize that soil contamination was not the environmental factor that governed first their distribution. For the 24 species not observed in the polluted area, the hypothesis of a particular sensitivity of seeds or seedlings to soil contaminants can be evoked. At last, seed rains and differences in the seed-bank compositions of the two soils may explain the discrepancies in species distribution.

Family	**Species**	**Control area**	**Polluted area**
Aceraceae	*Acer pseudoplatanus* L.		+
Apiaceae	*Pastinaca sativa* L.		+
Asteraceae	*Anthemis arvensis* L.	+	
	Artemisia vulgaris L.	1	
	Centaurea jacea L.	+	
	Centaurea stoebe L.	+	1
	Cirsium arvense L.	+	+
	Cirsium lanceolata L.		+
	Erigeron annuus (L.) Persoon	2	1
	Erigeron canadensis L.	1	+
	Hieracium sp.	+	+
	Lactua serriola L.	+	+
	Leontodon sp.	+	
	Matricaria recutita (L.) Rauschert	+	1
	Senecio Jacobaea L.	+	
	Senecio vernalis Waldst.& Kitaibel		+
	Solidago canadensis L.	1	2
	Sonchus oleraceus L.	+	1
	Tanacetum vulgare L.	1	+
	Taraxacum officinale Weber ex F.H. Wigg	+	+
	Tragopogon pratensis L.	+	
Boraginaceae	*Echium vulgare* L.	+	
	Myosotis arvensis (L.) Hill	+	+
Brassicaceae	*Sinapsis arvensis* L.	+	
Caryophyllaceae	*Cerastium brachypetalum* Desp. Ex Pers.		+
	Cerastium fontanum Baumg.		+
	Petrorhagia prolifera L.	+	
	Saponaria officinalis L.	+	
	Silene dioica L.	+	

Table 6.2. Phytosociological table containing average species occurrences (as Braun-Blanquet indexes) in control and polluted area

Family	Species	Control area	Polluted area
Chenopodiaceae	*Chenopodium album* L.		+
Convolvulaceae	*Convolvulus arvensis* L.		+
Euphorbiaceae	*Euphorbia cyparissias* L.	+	
Fabaceae	*Lathyrus* sp.		+
	Lotus corniculatus L.	+	
	Medicago lupulina L.	1	+
	Melilotus alba Medik.	2	+
	Trifolium repens L.	1	+
	Vicia hirsuta (L.) S.F. Gray		+
Geraniaceae	*Erodium cicutarium* (L.) L'Hér.	+	+
	Geranium pyrenaicum Burm. f.	+	+
Hypericaceae	*Hypericum perforatum* L.	+	+
Onagraceae	*Oenothera biennis* L.	+	+
Papaveraceae	*Papaver rhoeas* L.	+	
Plantaginaceae	*Plantago lanceolata* L.	+	
	Plantago major L.		+
Poaceae	*Agrostis capillaris* L.		+
	Agrostis stolonifera L.	+	
	Bromus hordeaceus L.		+
	Bromus sterilis L.	+	
	Bromus tectorum L.	+	+
	Dactylis glomerata L.	+	
	Elymus repens (L.) Gould.	+	
	Festuca rubra L.	+	3
	Holcus lanatus L.	+	+
	Lolium perenne L.		2
	Phleum pratense L.	+	
	Poa trivialis L.	+	+
Polygonaceae	*Polygonum aviculare* L.		+
	Rumex crispus L.	+	
Primulaceae	*Primula* sp.		+
Resedaceae	*Reseda lutea* L.	+	
Rosaceae	*Potentilla reptans* L.	+	+
	Rubus sp	+	
Rubiaceae	*Galium aparine* L.		+
Scrophulariaceae	*Linaria vulgaris* L.	+	
	Verbascum thapsus L.	+	

Table 6.2. (end)

Ecological indexes highlighted structural differences between both communities (Table 6.3). Indeed, an average of 24.25 species was observed in the control area while only 16.50 were able to grow in the polluted area. The two areas also differed in term of species

diversity (with H' values of 3.53 and 3.06 for the control and polluted areas, respectively) but not in term of equitability (with J values of 0.77 and 0.76, respectively).

	Control area	**Polluted area**
Species richness (S)	24.25 ± 1.50	16.50 ± 1.73*
Shannon-Weaver Diversity (H')	3.53 ± 0.17	3.06 ± 0.20*
Pielou Equitability (J)	0.77 ± 0.03	0.76 ± 0.04

Table 6.3. Ecological indexes determined for the control and polluted areas. Asterisks indicate significant differences between the two areas (Mann-Whitney U test, n=4, $p<0.05$)

When considering the family level, 16 and 17 families were observed in the control and polluted areas, respectively. In the control area (Fig.6.1A), *Asteraceae* represented 44.9% of the individuals and were followed by *Fabaceae* (23.6%) and *Poaceae* (10.1%). At the opposite, the polluted area (Fig.6.1B) was dominated by *Poaceae* (45.2%), followed by *Asteraceae* (34.6%) while *Fabaceae* were only representing 4.8% of the species.

Three species were then selected for the study of plant biological responses to pollutants: *E. canadensis* which presented a lower abundance in the polluted area than in the control area, *M. recutita* which presented an inverse distribution (higher abundance in the polluted area than in the control area) and *O. biennis* for which no difference on abundance was noticed.

Plant biological responses to pollution are presented in Fig.6.2. Significant decreases in height and biomass were observed in *E. Canadensis* (85% of control values for both parameters) and *O. biennis* (88 and 71% of control values, respectively). On the contrary, *M. recutita* exhibited increased height in the polluted area (with a value equalling 116% of control) while no effect on biomass was noticed.

Moreover, differences on plant antioxidant enzymes and lipid peroxidation were also noticed when comparing polluted and control areas (Fig.6.3). For *E. Canadensis*, APX, GPX and GRD activities were higher in individuals issued from the polluted area and reached at least 146% of the control values. However, this was not paralleled by any significant increase in MDA level. When experiencing the polluted soil, *M. recutita* only exhibited an increase in SOD activity which did not exceed 122% of the control value. Finally, *O. biennis* presented increases in MDA levels, SOD, CAT and GPX activities (213%, 187%, 185% and 140% of

controls respectively) but significant decreases in APX and GRD activities (67 and 79% of controls respectively).

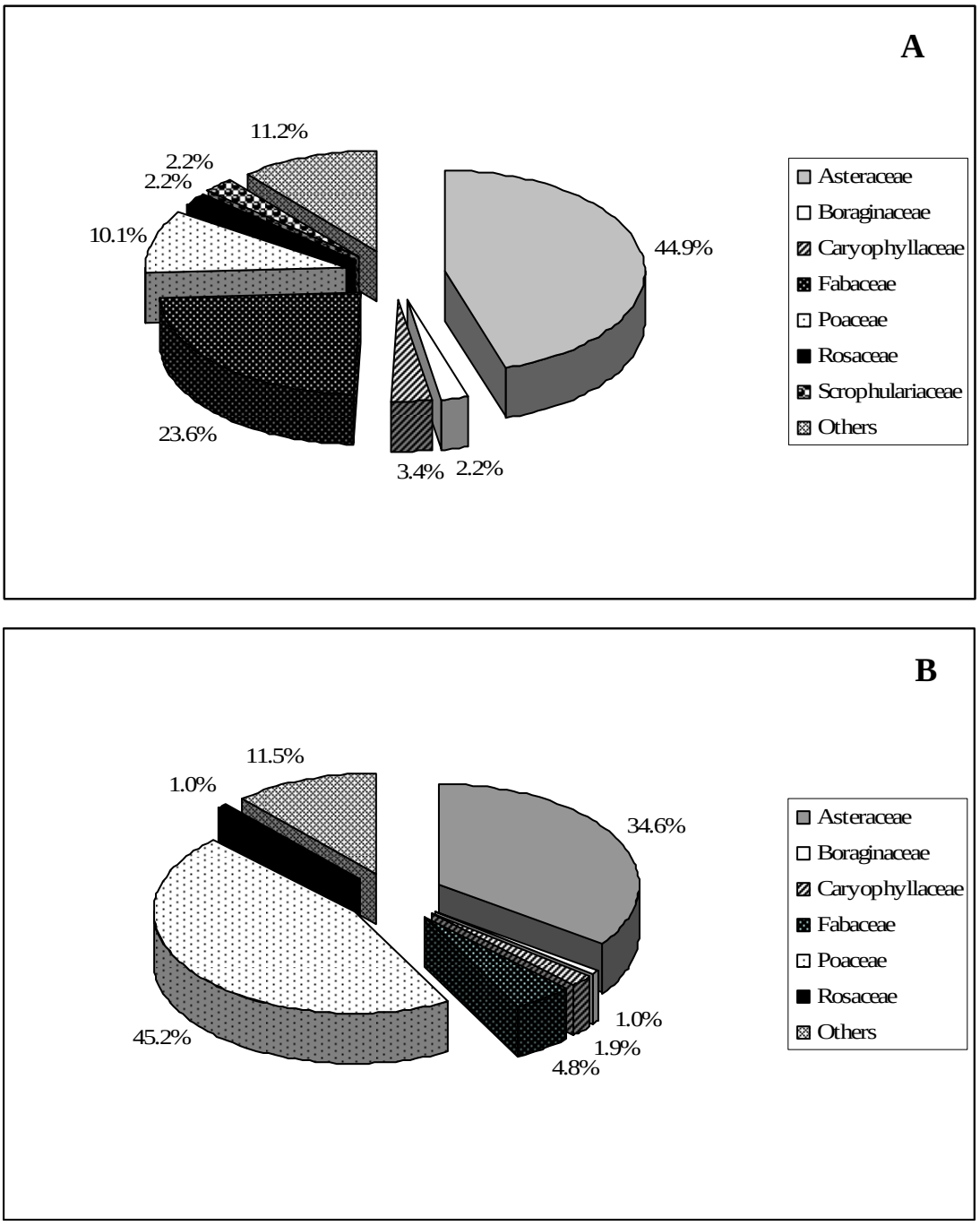


Figure 6.1. Average proportions (in %) of each plant family in the communities described in the control (A) and polluted (B) areas in June 2007.

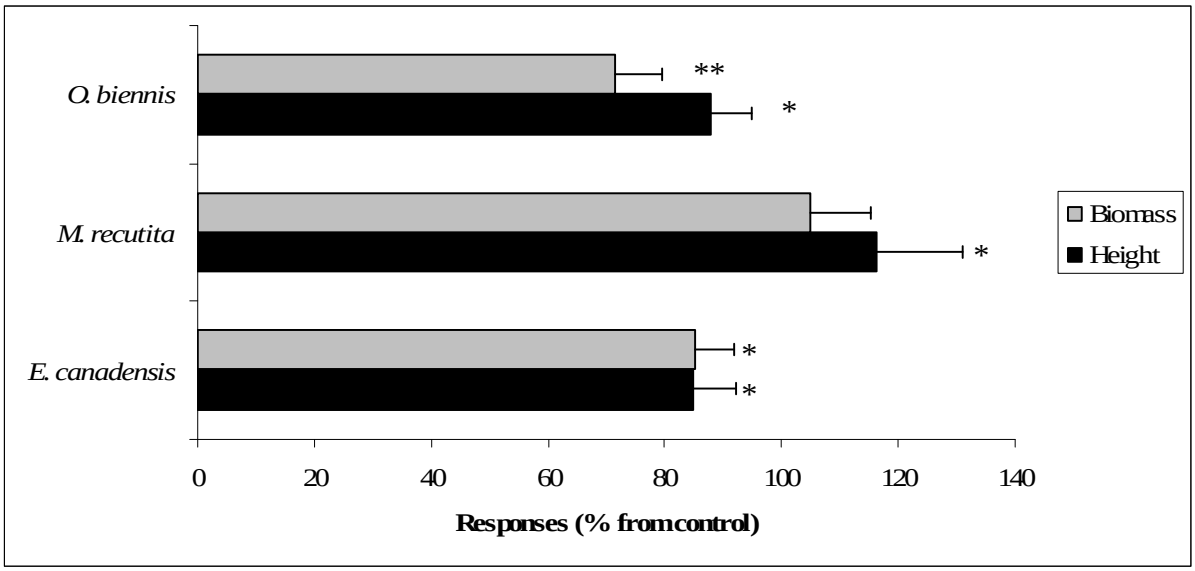


Figure 6.2. Biological responses of the three selected species. Asterisks indicate significant effects compared to control area (Mann-Whitney U test; n = 7; * $p<0.05$; ** $p<0.01$). Mean control values were always 100% with standard deviations below 7%.

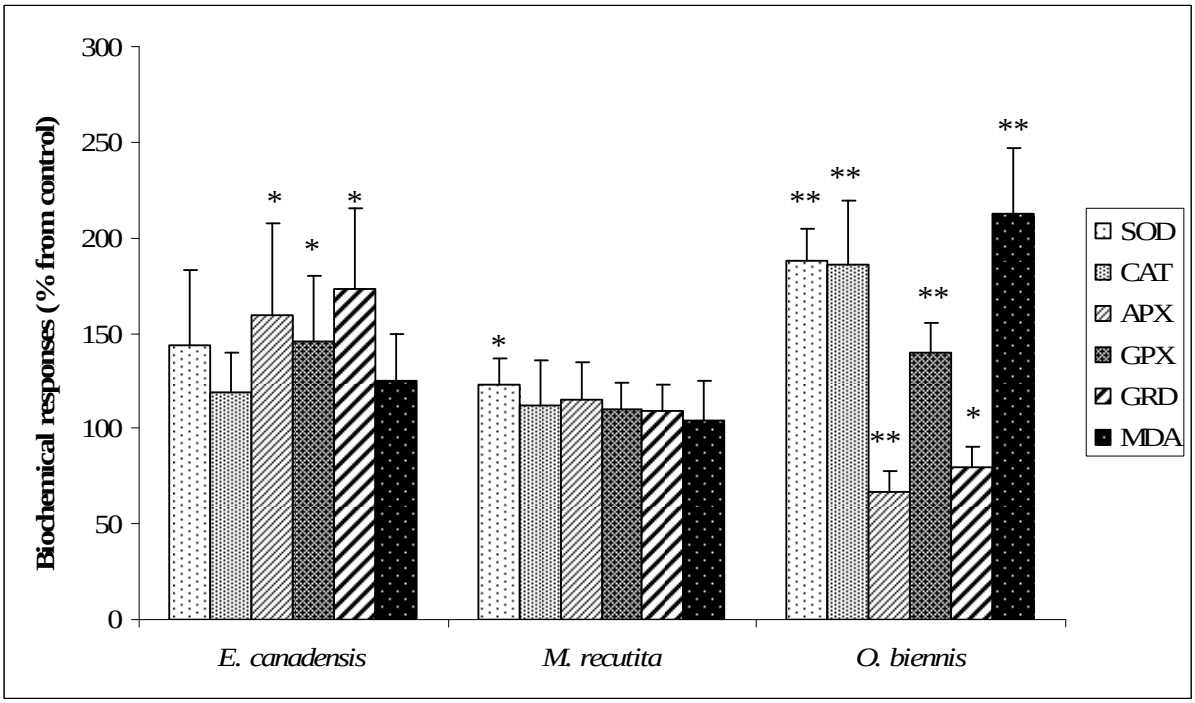


Figure 6.3. Biochemical responses of the plants taken in the contaminated area. Asterisks indicate significant effects of the pollutants testified by Mann-Whitney's U test (n = 7; * $p<0.05$; ** $p<0.01$). Mean control values were always 100% ± sd.

IV-) Discussion

The species composition of the polluted-area plant community showed similarities with those described in previous studies. Indeed, *L. perenne*, *M. lupulina*, *P. trivialis*, *P. reptans*, *S. arvensis*, *T. officinale* or *T. repens* were already found in a disturbed perennial-grassland (Luzuriaga et al., 2005) while *E. Canadensis*, *F. rubra*, *H. perforatum* and *T. vulgare* were observed in ancient gaswork soils (Henner et al., 1999). *S. oleraceus* and *C. arvense* were noticed in both studies.

The colonization process often follows a typical pattern of continuing species replacement. Early-colonizing species are typically annual plants and these are eventually replaced by later-colonizing perennials. Bazzaz (1996) noticed that annuals and short-lived perennials, like *E. canadensis* and *E. annuus*, dominated during the second year of succession before the establishment of clonal herbs such as *S. canadensis*. Interestingly, these species were found, in our study, in both control and polluted areas, suggesting a transition between the two succession steps described by Bazzaz (1996).

In parallel, the *Asteraceae* family, considered by Bazzaz (1996) as one of the most representative family of the first succession steps, represented 44.9% of the individuals of the control area and 34.6% of the polluted areas which is dominated by *Poacea* (45.2%). This family only represented 10.1% of the individuals of the control area. The opposite trend was observed for *Fabaceae* which represented 23.6 and 4.8% individuals of the control and polluted area, respectively.

Ecological indexes showed that the plant community observed in the control area was more complex and structured than the one in the polluted-area with higher values for species richness and Shannon-Weaver diversity. The average species richness found in the polluted area (S=16.50) was closed to the 18 species found by Luzuriaga *et al.* (2005) in a disturbed perennial-grassland and the 16-17 species described by Conesa et al. (2007) on Spanish mine tailings, but much lower than the 28 species found by Remon *et al.* (2005) in a former metallurgical landfill and the 32 species described on ancient gaswork soils by Henner *et al.* (1999). However, no information about the age of the community was given in these papers leading these results difficult to compare.

In a previous work (Dazy et al., 2008), we described the pioneer species observed in the same site after only one year of colonization. At that time, the most abundant families

were *Chenopodiaceae*, *Poacea* and *Asteraceae* in the polluted area while only the two last ones were dominating the control area. Comparing the results of the present study to these observations, we can notice that, in the control area, the proportion of *Asteraceae* increased from 25.8 to 44.9% while *Poaceae* decreased from 26.9% to 10.1%. Moreover, *Rosaceae* and *Scrophulariaceae* represented about 15% of the community in the first year but only 4.5% in the second year. In the polluted area, the proportion of *Asteracea* did not change between the two first years in contrast with *Poacea* which increased from 23.7 to 45.2%. The *Chenopodiaceae* family which dominated the first succession year with 31.6%, represented only 1% of the individuals observed in the second year. Moreover, the species richness observed in the polluted area (S = 17) was comparable to the 15 species noticed during the first succession year.

Concerning diversity indexes, the results of present study were higher compared to the ones found during the first succession year in which H' values of 2.98 and 1.32 were observed for the control and polluted area, respectively (Dazy et al., 2008). Such increases suggested a rise of the community complexity with succession time. On other way, our results were close to the values given by Conesa et al. (2007) who found diversities of 2.5-3 for plant communities growing in sites contaminated by heavy metals. However, in that study, differences in species richness and diversity were partly explained by the acidity of the soils, stable plant communities being unable to establish on acidic soils.

Nevertheless, the decreases in species richness and diversity observed here between control and polluted areas were supposedly linked to the high contamination of the soils which could exert phytotoxic effects toward some particular species. To study the possible relationships between soil pollution and plant community structure, we selected three species according to their differences of abundance on the control and polluted areas.

First, *E. canadensis*, which abundance was lower on the polluted soil, also exhibited moderate decreases in height and biomass when grown on this soil. Several antioxidant enzyme activities (APX, GPX, GRD) were increased but no significant changes in MDA level were noticed. These results suggested that pollutants induced cellular ROS production and , hopefully, that cells were able to cope with these compounds by activating the ascorbate-glutathione cycle (as indicated by APX and GRD increases), considered by Foyer et al. (1994) and Prasad (1998) as the major detoxifying system in plant cells. In the case of *E. canadensis*, antioxidant defences were sufficiently efficient to limit MDA production to control values.

Then, *O. biennis*, for which no changes on abundance were noticed through the two conditions, exhibited the highest increase in SOD (188% of control), CAT (186% of control) and GPX (140% of control) activities but also in MDA level (213% of control) indicating a high degree of oxidative stress and cellular damages. This cytotoxicity was also suggested by the decreases in APX and GRD activities (67% and 79% of control, respectively) which indicated an inhibition of the ascorbate-glutathione cycle and potential damages in chloroplasts and mitochondrias. These stress conditions and cytotoxicity symptoms may explain, at least in part, the decreases in height and biomass observed at the individual level. Another explanation would be a higher energy allocation to defence systems at the expense of plant growth.

Finally, for the species *M. recutita*, the abundance was higher in the polluted area than in the control area. In parallel, individuals from the polluted area exhibited a moderate increase in height while no change on biomass was noticed. That species also exhibited no changes in MDA level and antioxidant activities, excepted for SOD which was increased in plants taken from the polluted area (123% of controls). These results indicated that only a small amount of pollutants were able to exert phytotoxic effects at the leaf level, suggesting a possible involvement of metallothioneins, phytochelatins, or other chelators like organic acids in the defence strategy of that species.

Globally, for two of the three species studied, antioxidant defence systems seemed to prevent plant cells from damages like lipid peroxidation and to confer to organisms their tolerance to soil pollutants. When such systems were overloaded, plants exhibited toxicity symptoms at the cell (increased MDA concentrations) and/or organismic levels (decreased growth and biomass) but such species were still able to develop themselves on contaminated soils. For the third species, antioxidant systems did not seem involved in pollution tolerance and suggest a potential role of other defence systems. Analysis of pollutants accumulation and speciation within the plants would be useful to understand which resistance mechanisms are involved (*e.g.* reduced absorption, high sequestration…). Accumulated metals were not determined as the scope of this study was not to describe soil-plant metal transfers but establishing relationships between plant responses measured at different biological scales, from cells to communities. Also, it was not expected that accumulated metals would necessarily explain plant biochemical responses since i) not only metals may be present (but also organics), and ii) accumulated contents in tissues do not reflect concentrations in the vicinity of cellular targets.

Interestingly, if we compare the second-succession-year biological responses of the three species to the ones recorded during the first year (Dazy et al., 2008), the same trends could be highlighted. First, *O. biennis* and *E. Canadensis* were sensitive to pollution while *M. recutita* presented increases in height but also in biomass, which is not the case in this study (probably due to higher competition and less resources availability). Then, *O. biennis* already presented an inhibition of the ascorbate-glutathione cycle but that inhibition was stronger during the first succession year. However, in this study, only 3 species were studied and it would be necessary to use other species to consolidate our conclusions. Long term studies will tell us if these differences were due to variations of environmental factors or an acclimatation/adaptation of organisms.

From an applied point of view, that study has permitted to determine several plant species able to establish on highly contaminated sites and thus, presenting potential use in phytostabilization technologies (Kramer et al., 2000). Among these species were *Bromus hordeaceus*, *Convolvulus arvensis*, *Holcus lanatus*, *Hypericum perforatum* or *L. perenne* which have already been described as plant with potential to clean-up toxic metals (Prasad and Freitas, 2003). However, the other species observed on the polluted areas were not soon considered for such purposes.

V-) Conclusion

This study presented possible relationships between soil pollution, plant cellular defence systems and vegetation community structure and composition after 24 months of succession. The floristic compositions observed in this study were closed to plant communities described in the first years of grassland successions with *Asteraceae* and *Poaceae* as the dominant families. Ecological index values determined for both communities (polluted and control plots) proved that the polluted-soil vegetation presented lower species richness and biodiversity than the control soil, which could be partly explained by pollutant direct (toxicity) or non-direct (resource allocation) effects. Indeed, we observed for 2 species which were able to survive on the polluted area some effects on growth and biomass but also on cellular antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation level. In these cases, antioxidant systems seemed to play a significant role, allowing individuals to survive (even if growth was decreased) in the polluted area. Some other species, presenting less effective antioxidant systems, would not be expected to survive at all. In this sense, antioxidant defence

seemed to play a significant role on plant sensitivity/tolerance to pollutants and thus to render them more or less competitive for colonization of such disturbed areas. Nevertheless, as exemplified by *M. recutita* study, some other defences systems may also be involved.

VI-) Acknowledgements

This study has been realized within the framework of a transversal interdisciplinary project (GISFI) contributing to the resolution of pollution-related issues and designed to promote clean technologies for decontamination and treatment of industrial wastelands. This work was granted by Region Lorraine and Marc Dazy's PhD thesis was supported by the French Ministry of Education and Research.

VII-) References

Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Ann. Rev. Plant Biol. 55, 373-399.

Aravind, P., Prasad, M.N.V., 2003. Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: a free floating freshwater macrophyte. Plant Physiol. Bioch. 41, 391-397.

Aravind, P., Prasad, M.N.V., 2005. Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism. Plant Physiol. Bioch. 43, 107-116.

Arienzo, M., Adamo, P., Cozzolino, V., 2004. The potential of *Lolium perenne* for revegetation of contaminated soil from a metallurgical site. Sci. Total Environ. 319, 13-25.

Bazzaz, F.A., 1996. Plants in changing environments. Cambridge University Press, Cambridge.

Bleeker, P.M., Assuncao, A.G.L., Teiga, P.M., de Koe, T., Verkleij, J.A.C., 2002. Revegetation of the acidic, As contaminated Jales mine spoil tips using a combination of spoil amendments and tolerant grasses. Sci. Total Environ. 200, 1-13.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Braun-Blanquet, J., 1932. Plant Sociology. McGraw-Hill, New-York.

BRGM, 2001. Guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués. BRGM (Ed.), Orléans.

Conesa, H.M., Garcia, G., Faz, A., Arnaldos, R., 2007. Dynamics of metal tolerant plant communities' development in mine tailings from the Cartagena-La Union Mining District (SE Spain) and their interest for further revegetation purposes. Chemosphere 68, 1180-1185.

Dazy, M., Jung, V., Férard, J.F., Masfaraud, J.F., 2008. Ecological recovery of vegetation on a coke-factory soil: role of plant antioxidant enzymes and possible implications in site restoration. Chemosphere. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.09.014

Dudka, S., Adriano, D., 1997. Environmental impacts of ore mining and processing: a review. J. Environ. Qual. 26, 590-602.

Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunert, K.H., 1994. Photooxidative stress in plants. Physiol. Plantarum 92, 696-717.

Gunn, JM., 1995. Restoration and Recovery of an Industrial Region: Progress in Restoring the Smelter-Damaged Landscape near Sudbury. Springer-Verlag, New York.

Harris, E.D., 1992. Regulation of antioxidant enzymes. FASEB J. 6, 2675-2683.

Henner, P., Schiavon, M., Druelle, V., Lichtfouse, E., 1999. Phytotoxicity of ancient gaswork soils. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on plant germination. Org. Geochem. 30, 963-969.

Kaputska, L.A., Lipton, J., Galbraith, H., Cacela, D., LeJeune, K., 1995. Metal and arsenic impacts to soils, vegetation communities and wildlife habitat in southwest montana uplands contaminated by smelter emissions. II. Laboratory phytotoxicity studies. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1905-1912.

Kimbrough, D.E., Cohen, Y., Winer, A.M., Creelman, L., Mabuni, C., 1999. A critical assessment of chromium in the environment. Crit. Rev. Env. Sci. Tec. 29, 1-46.

Kramer, P.A., Zabowski, D., Scherer, G., Everett, R.L., 2000. Native plant restoration of copper mine tailings: I. Substrate effect on growth and nutritional status in a greenhouse study. J. Environ. Qual. 29, 1762-1769.

Luzuriaga, A.L., Escudero, A., Olano, J.M., Loidi, J., 2005. Regenerative role of seed banks following an intense soil disturbance. Acta Oecol. 27, 57-66.

Norland, M.R., Veith, D.L., 1995. Revegetation of coarse taconite iron ore tailing using municipal solid waste compost. J. Hazard. Mater. 41, 123-134.

Pielou, E.C., 1966. Shannon's formula as a measure of species diversity: its use and misuse.

Am. Nat. 100, 463-465.

Prasad, M.N.V., 1998. Metal-biomolecule complexes in plants: occurrence, functions and applications. Analysis 26, 25-28.

Prasad, M.N.V., 1999. Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.

Prasad, M.N.V., Freitas, H.M.O., 2003. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. Electr. J. Biotech. 6, 285-321.

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

Shannon, C.E., Weaver, W., 1963. The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana.

Smirnoff, N., 1998. Plant resistance to environmental stress. Curr. Opin. Biotechnol. 9, 214-219.

Tordoff, G.M., Baker, A.J.M., Willis, A.J., 2000. Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. Chemosphere 41, 219-228.

Unyayar, S., Celik, A., Cekic, F.O., Gozel, A., 2006. Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. Mutagenesis 21, 77-81.

Vangronsveld, J., Colpaer, J.V., Van Tichelen, K.K., 1996. Reclamation of bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: physiochemical and biological evaluation of the durability of soil treatment and revegetation. Environ. Pollut. 94, 131-140.

Vangronsveld, J., Van Assche, F., Clijsters, H., 1995. Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: *in situ* metal immobilization and revegetation. Environ. Pollut. 87, 51-59.

Vazquez, M.D., Poschenrieder, C., Barcelo, J., 1987. Chromium VI induced structural and ultrastructural changes in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). Ann. Bot. 59, 427-438.

Venditti, D., Durécu, S., Berthelin, J., 2000. A multidisciplinary approach to assess history, environmental risks and remediation feasability of soils contaminated by metallurgical activities. Part A: chemical and physical properties of metals and leaching ability. Arch. Environ. Con. Tox. 38, 411-420.

Wong, M.H., 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. Chemosphere 50, 775-780.

CHAPITRE 7.

TROISIEME APPROCHE : 3- EFFETS DE LA POLLUTION D'UN SOL SUR LES PROCESSUS POST-GERMINATIFS : CONSEQUENCES SUR LE RECRUTEMENT DES COMMUNAUTES

Effects of soil pollution on plant post-germination processes: possible consequences for population dynamics and community recruitment

Marc Dazy*, Jean-François Férard and Jean-François Masfaraud

Article soumis à la revue Plant Ecology

Abstract

The present study was designed in order to determine the influences of both seed origin and exposure soil on recruitment dynamics of four plant species. Our results showed that most of *E. canadensis*, *M. alba* and *O. biennis* post-germination processes, including the production of viable seedlings, were significantly affected by seeds origin and exposure soils while no clear effects were noticed in *A. capillaris*. The sensitive species were particularly affected when growing on a non-treated industrial soil. Moreover, seeds collected from plants growing on polluted areas presented lower germinating capacities compared to control seeds but the resulting seedlings were more tolerant to pollution. The potential influence of seeds origin on seed rain efficiency during a colonization process is discussed in this article.

Keywords: polluted soil, seeds viability, seeds origin, germination, biomass

I-) Introduction

The completion of a plant's life cycle and the regeneration and establishment of plant populations and communities are closely linked to the process of recruitment, a multi-phase sequential phenomenon depending on pre- and post-germination processes (Garrido et al. 2005). Pre-germination processes include seed production, pre and post-dispersal seed predation with the end product being the number of seeds reaching the ground (Vander Wall and Longland 2004), while post-germination processes include seedling emergence, seedling survival and final establishment of new individuals (Lortie and Turkington 2002).

Emergence success can be considered as the proportion of seeds in the soil-seed-bank that emerges as seedlings over a given period (i.e. the mean number of seedlings per viable seed). Moreover, the rate of establishment success can be assessed by the proportion of seedlings that survives by the end of the growing season (i.e. the mean number of recruited plants per emerged seedling). De facto, the success of overall recruitment process would link both emergence and establishment successes. Finally, Li et al. (2005) evaluated the probability of recruitment success using the product of the emergence rate and the survival rate.

In recent years, several studies considering concomitantly pre- and post-germination processes have suggested that different phenomena involved in recruitment dynamics were affected by a variety of abiotic and biotic factors, thus underlining the complex mechanisms of recruitment in plant populations or communities (Dalling et al. 1998; Harms et al. 2000; Kitajima and Fenner 2000; Rey and Alcantara 2000; Wenny 2000). As an example, Garrido et al. (2005) noticed that post-germination processes, such as seedling emergence and establishment, were more vulnerable to abiotic stress than pre-germination processes. In that way, seed germination and seedling emergence were affected by microclimatic conditions, pollination, or seed predation (Agren 1996; Cunningham 2000; Schelin et al. 2004).

Nevertheless, if the effects of human disturbances on recruitment dynamics, like habitat fragmentation, are well-documented, no study has taken into account the impact of environmental pollutants such as heavy metals or polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). If the phytotoxicity of PAHs is still a matter of debate (Lin et al. 2007; Smith et al. 2006; Sverdrup et al. 2003), heavy metal effects on plants have been widely described. These phytotoxic effects include water imbalance, disruption of mineral nutrition and photosynthesis processes, growth inhibition, or chlorosis (Toppi and Gabbrielli 1999).

Thus, the present study was designed in order to determine how a chemical pollution can lead to plant recruitment disruptions, considering especially potential effects on seeds emergence and seedlings survival. In this way, we assessed i) the capacity of control seeds to produce viable plants able to colonize polluted or remediated soils and ii) the germination potential of seeds collected from plants growing on polluted soils. The experiment was conducted at a former coke-factory site located in Homécourt (France) which was exposed to active coke production activities from 1922 to 1980.

II-) Materials and methods

II-1-) Seed collection

Four plant species were used in this study: the colonial bentgrass (*Agrostis capillaris*), the canadian horseweed (*Erigeron canadensis*), the white sweet clover (*Melilotus alba*), and the evening primrose (*Oenothera biennis*). These species were chosen according to i) their occurrence and abundance in the sampling areas, ii) their important seed production and iii) seed harvesting easiness. Seeds were collected from plants growing in two areas at a former coke-factory site located in Homécourt (Lorraine, North-East of France: latitude 49°23′33", longitude 5°98′33"). The first area was considered as the control (CT), while the second area (NM-100%) was contaminated by heavy metals and PAHs (Table 7.1). Once in the laboratory, seeds were dried at 28°C for 48 h and then stored at 4°C for 4 weeks.

II-2-) Soil sampling and physico-chemical analyses

CT and NM-100% soils were sampled in the field while a third soil corresponded to NM-100% soil treated by thermal desorption (NM-TD) at 500°C for 1h. Dry soils were stored at 4°C until the beginning of the experiments. Soil physico-chemical properties are reported in Table 7.1. Control soil presented pollutant concentrations below French soil concentration values above which soil is considered as a pollution source (VDSS values), excepted for As and Pb which were just above the limits (19 and 200 mg/kg dw, respectively), proving its low contamination. On the contrary, NM-100% soil was contaminated by heavy metals, especially Cr, Pb and Zn, and exhibited PAHs concentration of about 1500 mg/kg soil dw, while in NM-TD soil, PAH concentration dropped to 100 mg/kg dw. Phytotoxicity of soils containing such

high concentrations in metals and PAHs have already been demonstrated by several authors (Sverdrup et al., 2003; An, 2004; Da Rosa Correa et al., 2006).

	CT	NM-100%	NM-TD
Soil characteristics			
Clay (< 2 µm) in g/kg	93 - 159	101 - 150	97 - 109
Silts (2/20 µm) in g/kg	107 - 134	105 - 158	92 – 111
Silts (20/50 µm) in g/kg	104 - 120	59 - 93	94 - 101
Sands (50/200 µm) in g/kg	208 - 291	61 - 104	130 - 150
Sands (200/2000 µm) in g/kg	372 - 487	508 - 644	554 - 580
C/N	27 - 55	21 - 24	61 – 63
pH	8.1 - 8.5	6.8 - 7.3	7.9 - 8.0
Pollutant concentrations in mg/kg soil dw.			
Cr	43 - 70	562 - 679	379 – 428
Cu	22 - 29	128 - 133	107 – 111
Ni	24 - 34	94 - 99	100 - 104
Zn	301 - 563	1870 - 2350	2720 – 2780
Cd	0.4 - 0.5	2 - 3	2.0 – 2.2
Pb	113 - 437	421 - 543	651 – 704
Hg	0.1 - 0.8	4 - 24	1.4 - 1.9
Naphthalene	0.5 - 3.5	35 - 39	2.5 - 3.3
Acenaphtylene	0.8 - 4	45 - 51	2.8 – 3
Acenaphtene	0.1 - 0.5	53 - 64	0.8 - 0.9
Fluorene	0 - 1.8	50 - 63	2.5 - 2.7
Phenanthrene	0.3 - 11	135 - 139	9.0 – 9.7
Anthracene	1.1 - 10	69 - 86	6.1 – 6.5
Fluoranthene	0.7 - 27	250 - 259	15.2 – 16.1
Pyrene	0.2 - 21	176 - 180	10.1 – 10.9
Benzo[a]anthracene	0.9 - 16	128 - 137	7.8 – 8.5
Chrysene	0.2 - 12	63 - 77	4.9 – 5.9
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	0 - 15	114 - 120	10.3 – 11.3
Benzo[b]fluoranthene	0.9 - 10	146 - 152	8.5 – 9.5
Benzo[k]fluoranthene	0 - 4.6	49 - 51	2.8 - 4.4
Benzo[a]pyrene	1.6 - 11	111 - 114	7.7 – 8.8
Dibenzo[a,h]anthracene	0 - 3	23 - 24	4.8 – 5.0
Benzo[g,h,i]perylene	0.7 - 7	67 - 71	4.6 – 5.2
Σ 16 US-EPA PAHs	**8 - 152**	**1528 - 1606**	**100 – 111**

Table 7.1. Physico-chemical properties of the control (CT), treated (NM-TD) and untreated (NM-100%) soils expressed as min-max of 4 values.

II-3-) Experimental design

The experimental design comprised 3 factors: plant species (n=4), seed origin (n=2, collected either on plants issued from the control or polluted area), and exposure soil (n=3: CT, NM-100% and NM-TD soils). For each condition, 5 replicates were realized according to the procedure of Sinha et al. (2007) with minor modifications as described below.

All dry soils were finely grounded and passed through a 2 mm sieve, before 5 kg were poured in plastic pot (35 cm diameters). Filter paper discs were placed at the bottom of each pot to prevent the dry soil to escape through the drainage holes and pots were placed on saucers. To each pot, 20 seeds from one species were added and spread evenly across the soil surface. Pots were put in phytotrons (16:8h light/dark cycle at 22 ± 2°C, 1920 ± 86 lux) and watered well from the top using deionised water to 80% of the water holding capacity (WHC). Water content was checked daily and adjusted to 80% of the WHC throughout the duration of the trial.

II-4-) Measurements

Germination was monitored carefully over the first 2 weeks of the trials. The number of germinated seeds in each pot was recorded and expressed as a percentage of the number of seeds initially added. Twenty weeks after sowing, the number of surviving plants was determined and aerial parts were cut close to the soil surface. Aerial parts were dried at 80°C for 48 h and then weighed. Dry weight values were used for biomass production assessment.

II-5-) Calculations and statistical analysis

Emergence success was calculated as the number of seedlings obtained from the seeds spread on soil surface. Establishment success was derived from the mean number of seedlings that survived by the end of the trial per emerged seedling. Recruitment success was defined as the product of emergence success by and establishment success.

All results were arcsine ($\sqrt{p}$) transformed before statistical analysis to ensure normality and homogeneity of variances (Badger and Ungar 1989). Data were submitted to a two-way analysis of variance (ANOVA) using seeds origin and exposure soil as the two explanatory

factors. Student's *t*-test was used to estimate significant differences between group means ($p<0.05$). Statistical analyses were conducted using Statistica 6.0 Software (©Statsoft).

III-) Results

Globally, with the exception of *A capillaris*, most of *E. canadensis*, *M. alba* and *O. biennis* post-germination processes were significantly affected by seeds origin and exposure soils and their interactions (Table 7.2). When looking in details to the results, emergence, establishment, recruitment success and biomass production in *A. capillaris* were remarkably stable whatever were the experimental conditions (Fig.7.1.).

		Emergence success	**Establishment success**	**Recruitment success**	**Biomass production**
A. capillaris	O	F = 0.96; p = 0.33	F = 1.73; p = 0.2	F = 1.73; p = 0.2	F = 0.12; p = 0.73
	D	F = 3.96; p = 0.03	F = 3.76; p = 0.04	F = 3.76; p = 0.04	F = 1.58; p = 0.22
	O x D	F = 0.5; p = 0.61	F = 0.35; p = 0.71	F = 0.35; p = 0.71	F = 0.52; p = 0.6
E. canadensis	O	F = 2.19; p = 0.15	F = 7.15; p < 0.01	F = 7.15; p < 0.01	F = 3.44; p < 0.08
	D	F = 27.66; p < 0.01	F = 52.42; p < 0.01	F = 52.42; p < 0.01	F = 49.41; p < 0.01
	O x D	F = 3.85; p = 0.04	F = 8.09; p < 0.01	F = 8.09; p < 0.01	F = 0.17; p = 0.33
M. alba	O	F = 54.95; p < 0.01	F = 211.56; p < 0.01	F = 211.56; p < 0.01	F = 175.68; p < 0.01
	D	F = 163.54; p < 0.01	F = 221.59; p < 0.01	F = 221.59; p < 0.01	F = 186.13; p < 0.01
	O x D	F = 39.85; p < 0.01	F = 109.46; p < 0.01	F = 109.46; p < 0.01	F = 89.03; p < 0.01
O. biennis	O	F = 29.12; p < 0.01	F = 34.91; p < 0.01	F = 34.91; p < 0.01	F = 101.25; p < 0.01
	D	F = 190.57; p < 0.01	F = 65.15; p < 0.01	F = 65.15; p < 0.01	F = 122.8 ; p < 0.01
	O x D	F = 1.12; p = 0.34	F = 23.45; p < 0.01	F = 23.95; p < 0.01	F = 67.59 ; p < 0.01

Table 7.2. A two-way ANOVA of the effects of seeds origin (O) and exposure soils (D) and their interactions on post-germination processes of the four studied species. Data represent *F* values with their respective probabilities.

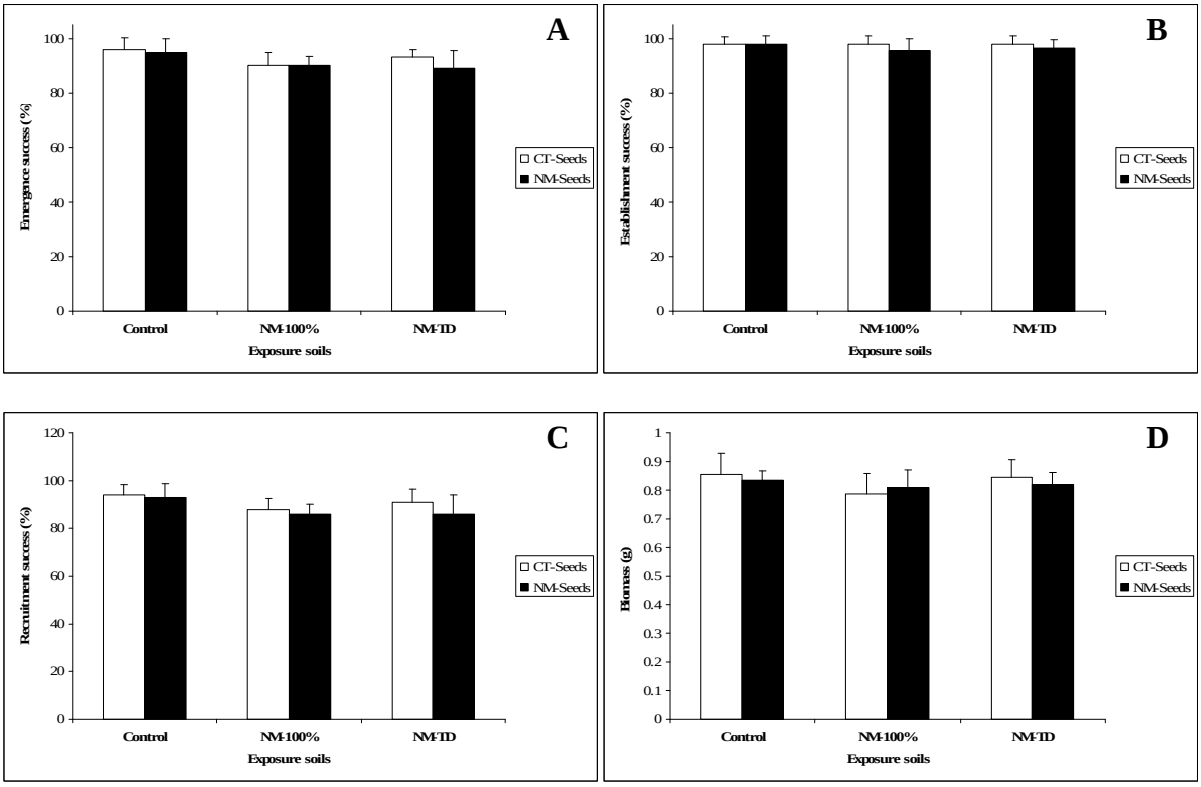


Figure 7.1. Effects of seeds origin (#) and exposure soils (*) on emergence (A), establishment success (B), recruitment (C) and biomass (D) in *A. capillaris* assessed by Student's *t*-test ($p<0.05$). Differences between destination soils were only assessed through comparisons to control values.

Concerning *E. canadensis*, decreases in emergence success (Fig.7.2A), recruitment success (Fig.7.2C) and biomass (Fig.7.2D) were observed in plants growing on NM-100% whatever was their origin. Interestingly, emergence success recovered somewhat when seeds were exposed to NM-TD soil. Establishment success (Fig.7.2B) was altered for plants descending from control seeds and grown on NM-100% soil. The effects of the two factors on emergence and establishment success were reflected on recruitment results (Fig.7.2C). Concerning biomass production, decreases were observed in NM-100% for both CT and NM-100% seeds even if NM-100% seeds seemed less affected (Fig.7.2D).

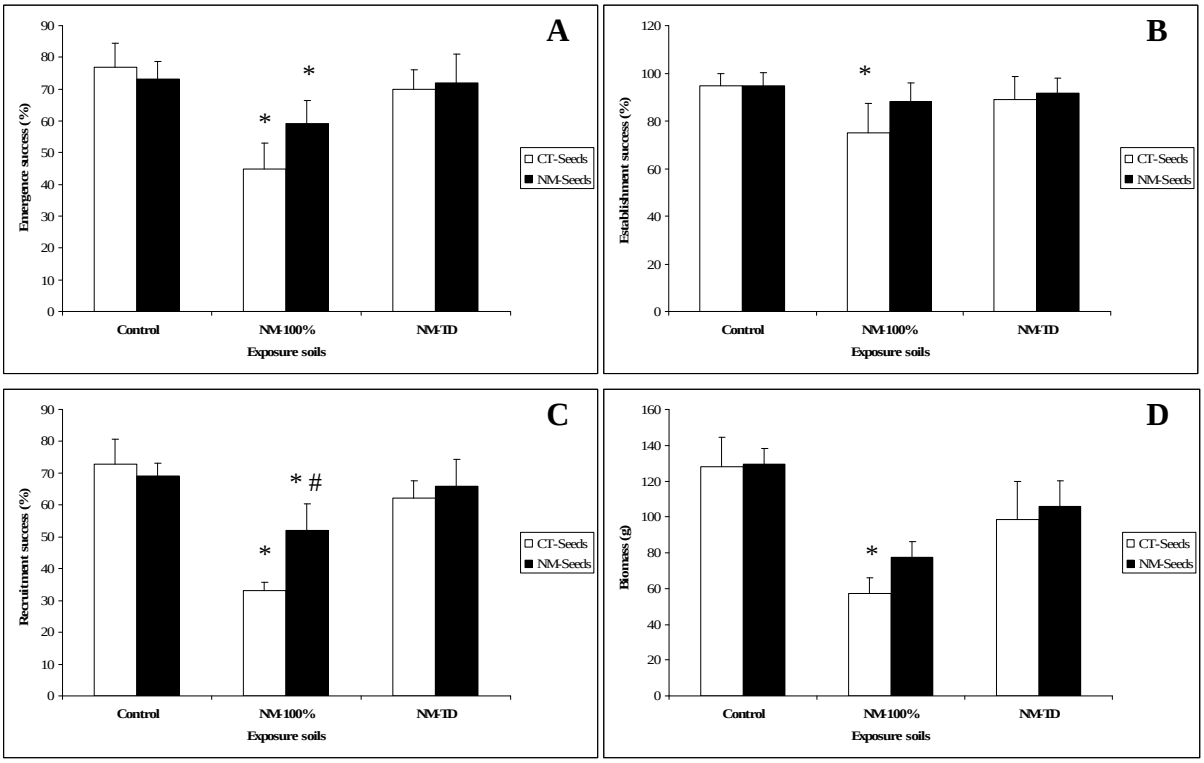


Figure 7.2. Effects of seeds origin (#) and exposure soils (*) on emergence (A), establishment success (B), recruitment (C) and biomass (D) in *E. canadensis* assessed by Student's *t*-test ($p<0.05$). Differences between destination soils were only assessed through comparisons to control values.

The differences observed for most post-germination processes in *M. alba* plants grown on control soil suggested that the viability of seeds and seedlings originating from NM-100% was lower compared to control ones (Fig.7.3).When taking into account control seeds, all post-germination processes decreased in plants grown on NM-100% and NM-TD soils. In the same way, plants originating from NM-100% seeds and grown in these two soils presented decreases in emergence success (Fig.7.3A), recruitment success (Fig.7.3C) and biomass (Fig.7.3D) but no effect on establishment success were noticed (Fig.7.3B). For both CT-seeds and NM-100% seeds, post-germination processes were improved in NM-TD soil comparatively to NM-100% soil.

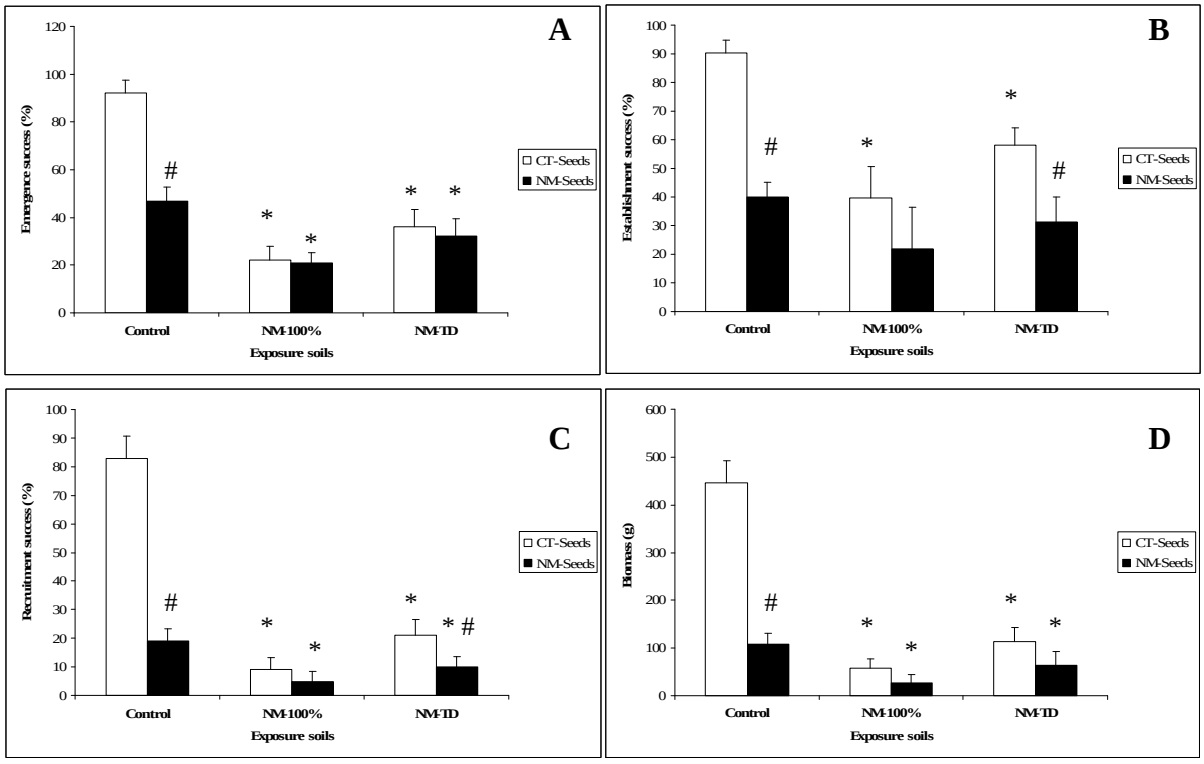


Figure 7.3. Effects of seeds origin (#) and exposure soils (*) on emergence (A), establishment success (B), recruitment (C) and biomass (D) in *M. alba* assessed by Student's *t*-test ($p<0.05$). Differences between destination soils were only assessed through comparisons to control values.

Finally, *O. biennis* plants originating from control seeds and grown on NM-100% or NM-TD soils presented decreases in emergence success (Fig.7.4A), recruitment success (Fig.7.4C) and biomass (Fig.7.4D) while only NM-100% affected their establishment success (Fig.7.4B). Plants originating from NM-100% seeds seemed more sensitive than control ones, especially when taking into account establishment success (Fig.7.4B). Moreover, NM-100% and NM-TD exerted a phytotoxicity leading to reduced emergence success (Fig.7.4A) and biomass productivity (Fig.7.4D).

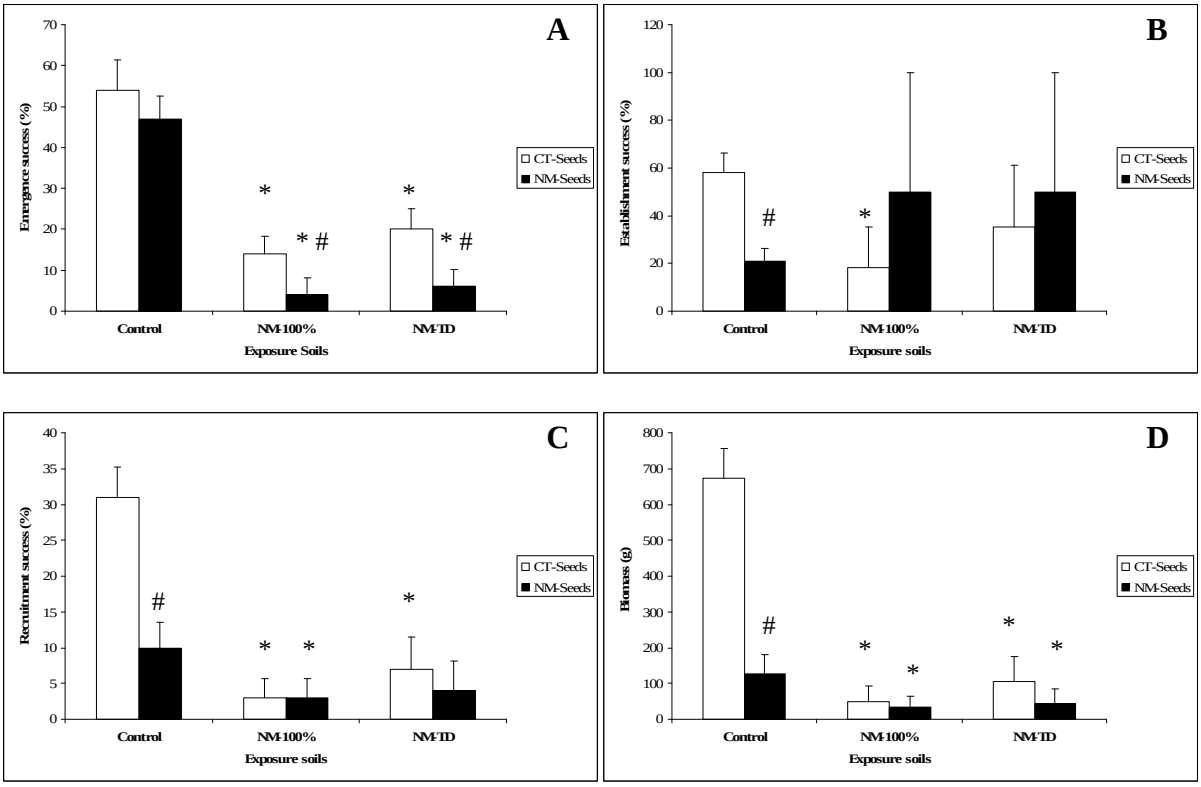


Figure 7.4. Effects of seeds origin (#) and destination soils (*) on emergence (A), establishment success (B), recruitment (C) and biomass (D) in *O. biennis* assessed by Student's *t*-test (p<0.05). Differences between destination soils were only assessed through comparisons to control values.

IV-) Discussion

The present study showed that an industrial soil, treated or not by thermal desorption, was able to exert a phytotoxic impact on the post-germination processes of several open-land plant species, by decreasing their emergence success, establishment success, recruitment success and biomasses.

Physico-chemical analyses have highlighted the presence of heavy metals (Cu, Cr, Pb, Zn) and PAHs at relatively high concentrations in both NM-100% and NM-TD soils even if thermal desorption reduced PAH concentrations. Heavy metal concentrations of the same range of values have already proven to induce phytotoxic effects. As an example, An (2006) recorded 50% shoot inhibitions in *Sorghum bicolor*, *Cucumis sativus* and *Triticum aestivum*

exposed to 48, 77 and 94 mg/kg Cu for 5 days, respectively. The same author also noticed effects on shoot growth since 80, 160 and 320 mg/kg Pb for *T. aestivum*, *C. sativus* and *S. bicolor*, respectively. Moreover, *S. bicolor* was the only species which presented decreases in germination rate when exposed to 80 mg/kg Pb.

On other way, Smith et al. (2006) observed biomass decreases in *Festuca arundinacea*, *Festuca rubra*, *Locus corniculatus*, *Trifolium pratense* and *Trifolium repens* exposed to soils contaminated with 1000 mg/kg PAHs. Several PAHs, such as phenanthrene, pyrene or fluoranthene, have already demonstrated a potential phytotoxicity on plant growth in *Sinapsis alba*, *Trifolium repens* or *Lolium perenne* since 37 mg/kg (Sverdrup et al. 2003). These experimental data suggest that pollutions, as important as the ones of the studied soils, can explain the decreases of post-germination processes observed in the present study.

From our results, seeds collected in NM-100% soil presented a lower germinating capacity than seeds collected in CT soil. Also, seedlings issued from NM-100% seeds exhibited a higher tolerance to soil pollution.

Indeed, plants of *E. canadensis* originated from NM-100% seeds exhibited 25 and 40% decreases in recruitment success and biomasses respectively when grown on NM-100% soil while plants originating from control seeds exhibited 55% decreases for both processes.

The same trends were observed for *M. alba* and *O. biennis* with recruitment decreases of 74% and 70% respectively for NM-100% seed plants against 89% and 90% for control-seed plants but also with biomass decreases 75 and 73% for NM-100% seeds and 87 and 93% for control seeds.

High levels of heavy-metal tolerance were already described in populations of *Silene paradoxa* from a copper mine tailing (Arnetoli et al. 2008) or *Arabidopsis arenosa* from a lead-zinc waste heap (Przedpelska and Wierzbicka 2007). It was argued that such tolerances have evolved *in situ* under the selective pressure of high levels of metal toxicity, generating adaptations of the exposed populations (Schat et al. 1993). Differences of heavy-metal tolerance between populations have been demonstrated to be controlled by two primary tolerance genes (major genes) and some hypostatic modifiers (Macnair 1983; Schat et al. 1996; Schat and Ten Bookun 1992; Smith and Macnair 1998). De facto, such genetic adaptations, conserved through generations, could explain the influence of seeds origin on the capacity of plants to grow on polluted soils. However, not all plant species presented such differences of sensitivity, as observed with *A. capillaris* in this study.

Such results suggest that, during vegetation succession, the efficiency of the recovery resulting from seed rains (i.e. seeds brought to a community through winds or insects) would partly depend on the origin of the seeds they carried. If most of the seeds were brought from unpolluted areas, they may present high germinating capacities but resulting seedlings may express a low degree of pollution tolerance. On the contrary, if the seeds would come from polluted areas, they may present low germinating capacities but resulting seedlings may exhibit higher pollution tolerance.

From an applied point of view, that study presented new advances which could be used to improve phytostabilization technologies. Indeed, our results suggested that seeds collected from plants growing on polluted areas have a higher probability to produce viable plants able to establish on a nude polluted soil. Thus, the use of such seeds is recommended in the first years of revegetation programs.

V-) Conclusion

The present study showed that most of *E. canadensis*, *M. alba* and *O. biennis* post-germination processes were significantly affected by seeds origin and exposure soils while no clear effects were noticed in *A. capillaris*. The first species were particularly affected when grown on a polluted soil, producing only a few viable individuals. Moreover, seeds collected from plants growing on polluted areas presented not only lower germinating capacities compared to control seeds but also they gave seedlings showing a higher tolerance degree to pollution, suggesting influence of seeds origin on seed rain efficiency during a colonization process.

VI-) Acknowledgements

This study has been realized within the framework of a transversal interdisciplinary project (GISFI) contributing to the resolution of pollution-related issues and designed to promote clean technologies for decontamination and treatment of industrial wastelands. This work was granted by Region Lorraine and Marc Dazy's PhD thesis was supported by the French Ministry of Education and Research.

VII-) References

Agren J (1996) Population size, pollinator limitation, and seed set in the self-incompatible herb *Lythrum salicaria*. Ecology 77:1779-1790

An YJ (2006) Assessment of comparative toxicities of lead and copper using plant assay. Chemosphere 62:1359-1365

Arnetoli M, Vooijs R, Gonnelli C, Gabbrielli R, Verkleij JAC, Schat H (2008) High-level Zn and Cd tolerance in *Silene paradoxa* L. from a moderately Cd- and Zn-contaminated copper mine tailing. Environ Pollut. doi:10.1016/j.envpol.2008.01.044

Badger KS, Ungar IA (1989) The effects of salinity and temperature on the germination of the inland halophyte *Hordeum jubatum*. Can J Bot 67:1420-1425

Cunningham SA (2000) Effects of habitat fragmentation on the reproductive ecology of four plant species in Mallee Woodland. Conserv Biol 14:758-768

Dalling JW, Hubell SP, Silvera K (1998) Seed dispersal, seedling establishment and gap partitioning among tropical pioneer trees. J Ecol 86:674-689

Garrido JL, Rey PJ, Herrera CM (2005) Pre- and post-germination determinants of spatial variation in recruitment in the perennial herb *Helleborus foetidus* L. (*Ranunculaceae*). J Ecol 93:60-66.

Harms KE, Wright SJ, Calderon O, Hernandez A, Herre EA (2000) Pervasive density-dependent recruitment enhances seedling diversity in a tropical forest. Nature 404:493-495

Kitajima K, Fenner M (2000) Ecology of seedling regeneration. In: Fenner MJ (ed) Seeds. CABI Publishing, Wallingford, pp 331-359

Li FR, Wang T, Zhang AS et al (2005) Wind-dispersed seed deposition patterns and seedling recruitment of *Artemisia halodendron* in a moving sandy land. Ann Bot 96:69-80

Lin H, Tao S, Zuo Q, Coveney RM (2007) Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by maize plants. Environ Pollut 148:614-619

Lortie CJ, Turkington R (2002) The effect of initial seed density on the structure of a desert annual plant community. J Ecol 90:435-445

Macnair MR (1983) The genetic control of copper tolerance in the yellow monkey flower *Mimulus guttatus*. Heredity 50:283-293

Przedpelska E, Wierzbicka M (2007) *Arabidopsis arenosa* (*Brassicaceae*) from a lead-zinc waste heap in southern Poland – a plant with high tolerance to heavy metals. Plant Soil 299:43-53

Rey PJ, Alcantara JM (2000) Recruitment dynamics of a fleshy-fruited plant (*Olea europaea*): connecting patterns of seed dispersal to seedling establishment. J Ecol 88:622-633

Schat H, Kuiper E, Ten Bookum WM, Vooijs R (1993) A general model for the genetic control of copper tolerance in *Silene vulgaris*: evidence from crosses between plants from different tolerant populations. Heredity 70:142-147

Schat H, Ten Bookum WM (1992) Genetic control of copper tolerance in *Silene vulgaris*. Heredity 68:219-229

Schat H, Vooijs R, Kuiper E (1996) Identical major gene loci for heavy metal tolerances that have evolved in different local populations and subspecies of *Silene vulgaris*. Evolution 50:1888-1895

Schelin M, Tigabu M, Eriksson I et al (2004) Predispersal seed predation in *Acacia macrostachya*, its impact on seed viability, and germination responses to scarification and dry heat treatments. New Forest 27:251-267

Sinha S, Mallick S, Misra RK et al (2007) Uptake and translocation of metals in *Spinacia oleracea* L. grown on tannery sludge-amended and contaminated soils: effect on lipid peroxidation, morpho-anatomical changes and antioxidants. Chemosphere 67:176-187

Smith MJ, Flowers TH, Duncan HJ, Alder J (2006) Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues. Environ Pollut 141:519-525

Smith SE, Macnair MR (1998) Hypostatic modifiers cause variation in the degree of copper tolerance in *Mimulus guttatus*. Heredity 80:760-768

Sverdrup LE, Krogh PH, Nielsen T et al (2003) Toxicity of eight polycyclic aromatic compounds to red clover (*Trifolium pratense*), tyegrass (*Lolium perenne*), and mustard (*Sinapsis alba*). Chemosphere 53:993-1003

Toppi SDL, Gabbrielli R (1999) Response to cadmium in higher plants. Environ Exp Bot 41:105-130

Vander Wall SB, Longland WS (2004) Diplochory: are two seed dispersers better than one? Trends Ecol Evol 19:155-161

Wenny DG (2000) Seed dispersal, seed predation, and seedling recruitment of a neotropical montane tree. Ecol Monogr 70:331-351

3ème PARTIE :
APPLICATIONS ECOTOXICOLOGIQUES

CHAPITRE 8.

EVALUATION DE LA TOXICITE D'UN SOL A L'AIDE DE PLANTES SAUVAGES : APPROCHE PRELIMINAIRE

Ecotoxicity assessment of polluted soils using wasteland plant species: a preliminary approach

Marc Dazy*, Jean-François Férard and Jean-François Masfaraud

Article soumis à la revue Science of the Total Environment

Abstract

The traditional ecotoxicological characterization of polluted soils needs to choose plant crop or vegetables species in order to assess the potential impacts of theses sites on plant communities. However, wild herbaceous species are also potential targets. Thus, in this study was questioned the sensitivity of wild herbaceous plant species when exposed to contaminated soils. Snapdragon (*Antirrhinum majus*), mugwort (*Artemisia vulgaris*), St Johnswort (*Hypericum perforatum*), white clover (*Trifolium repens*) and wooly mullein (*Verbascum thapsus*) were exposed to i) seven soil samples taken from an industrial wasteland known to be contaminated by a mixture of heavy metals and PAHs and ii) one cadmium-spiked soil. For the five species, germination and shoot growth both correlated to pollutant concentrations in soils. Our results highlighted phytotoxic effects of heavy metals, especially Hg, Cd and Zn while PAHs had no effect. Mugwort was the most sensitive species for both endpoints while white clover and wooly mullein were the less affected species. Seeds of these five plants were also exposed to standard LUFA soil spiked with Cd at five different concentrations (0-2500 mg Cd/kg dry soil). Effects on seed germination and shoot elongation, expressed as IC_{50} (Cd concentration resulting in 50% inhibition) and LOEC (lowest observed effect concentration) values were determined. Cd had inhibitory effects on both germination and shoot elongation but at varying degrees for the five species. Finally, we concluded from this preliminary approach that several wild herbaceous species may be used for phytotoxicity tests. The comparison of our results with literature data emphasized the need of an experimental comparison between the species used in this work and the one classically recommended in standardized protocols.

Keywords: heavy metals, phytotoxicity, germination, growth, cadmium, plant

I-) Introduction

In France, thousands of industrial soils are polluted by organic and metallic compounds that can potentially affect terrestrial and aquatic communities (Das et al., 1997; Rama-Devi and Prasad, 1998). This pollution is mainly due to coal tar processing, metallurgical and industrial complexes, and mining activities which took place during the last century. Today, most of industrial wastelands are abandoned without particular safety measures and their potential environmental impacts have been poorly studied.

Environmental scientists commonly agree that environmental hazard assessment of contaminated soils is unsatisfactory if based only on chemical analyses, which do not allow an integration of the combined effects produced by the mixture of substances and do not take into account the bioavailability and, subsequently, the toxicity of pollutants. Ecotoxicological bioassays have the advantage to analyse biological responses of living organisms that result from all the contaminant present, their respective bioavailabilities and their possible interactions. Not surprisingly, they are recommended for estimating the risk associated with soil pollutants (Stephenson et al., 2002). As a result, there is an increasing need to incorporate ecotoxicity tests in risk assessment and hazard identification. In France, the official methodological guideline for the study of polluted soils addresses the use of ecotoxicity tests for soil characterization (BRGM, 2001). A number of standardized methods are already available for aquatic and terrestrial ecotoxicity assessment but they were first developed in order to meet substance regulations (Stephenson et al., 2002; Blaise and Férard, 2006). Thus, the ecotoxicity of substances on soil organisms can be assessed through the use of earthworm (ISO, 1993a; 1998), collembola (ISO, 1999) or plant bioassays (ISO, 1993b; 2005). Although it was not under their initial scope, these bioassays can be proposed for determining the ecotoxicity of solid wastes (Ferrari et al, 1999), composts (Kapanen and Itavaara, 2001) or polluted soils (Eom et al, 2007).

Concerning plant, the species used in international standardized protocols are crops like *Avena sativa*, *Hordeum vulgare*, and *Zea mays*, or vegetables, like *Lycopersicon esculentum* and *Phaseolus vulgaris*, widely consumed by human populations. If these species are relevant for human health purposes, they are not representative of the flora that can be found in open lands like meadows or pastures. Then, they look inappropriate for assessing environmental risk associated to polluted sites. Unfortunately, little information is available concerning the applicability of wild, ecologically relevant, plants for this purpose as only two

articles dealing with effects of Cd on *Matricaria recutita* (De Pasquale et al., 1988) and of PAHs on grass species (Smith et al., 2006) can be found in the literature.

The objective of the present study was to assess the usefulness of some ecologically-relevant plant species, for the assessment of soil ecotoxicity, especially in the case of heavy metal contaminations. We investigated the ecotoxicity of several soil sampled from an industrial wasteland towards five plant species growing naturally on meadows or pastures. These species were also exposed to a control soil spiked with Cd as a model pollutant often found in industrial wasteland soils.

II-) Materials and methods

II-1-) Biological material

Five plant species, usually found in wastelands, pastures and roadsides were used for these tests (see table 8.1). Seeds, which did not submit any physical or chemical treatment, were supplied from Graines Baumaux (Nancy, France) and kept at 4°C until experiments started.

Common names	Scientific names	Families
Snapdragon	*Antirrhinum majus*	Scrophulariaceae
Mugwort	*Artemisia vulgaris*	Asteraceae
St Johnswort	*Hypericum perforatum*	Hypericaceae
White clover	*Trifolium repens*	Fabaceae
Wooly mullein	*Verbascum thapsus*	Scrophulariaceae

Table 8.1. Plant species used for acute toxicity tests

II-2-) Soil-samples

Soil samples were collected in seven areas of the Homécourt industrial wasteland (France) known for being contaminated at varying degrees by heavy metals (Cd, Cu, Hg and Zn) and PAHs (Table 8.2). Soil samples, numbered from 1 to 7, were visually checked and any visible indigenous fauna or large debris was discarded. Samples were air dried, passed through a 2-mm mesh sieve and used for phytotoxicity tests in the conditions described below.

		Soil number						
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Heavy Metals (mg/kg soil dw)	Cadmium (Cd)	1	1	1	2	4	9	28
	Copper (Cu)	95	58	40	22	74	58	67
	Mercury (Hg)	27	10.8	26	4.6	68	197	560
	Zinc (Zn)	211	268	307	367	271	312	336
	Total (mg/kg)	**334**	**337.8**	**374**	**395.6**	**417**	**576**	**991**
PAHs (mg/kg soil dw)	Naphtalene	0.9	9	19.3	6.4	14.7	2.7	4.5
	Acenaphtylene	4.2	16.4	132.2	31.7	281.1	8.4	22.1
	Acenaphtene	0.6	0.1	2.2	0.9	4.7	0.6	0.5
	Fluorene	1.1	2.2	14.2	3.2	16.9	0.9	3.9
	Phenanthrene	11.2	41.9	308.1	61.5	422.8	16.9	63.5
	Anthracene	3.2	11.7	59.5	12.9	94.5	3.3	13.9
	Fluoranthene	18.7	80.2	490.5	122.5	854.9	29.4	95.9
	Pyrene	14.2	65.9	393.3	95.3	701.8	23	71.6
	Benzo(a)anthracene	8.1	37	190	43.4	345.6	11.5	36.1
	Chrysene	6.9	35.7	173.4	43.9	343.4	11.6	32.6
	Benzo(b+k)fluoranthene	13.8	75.7	367.3	102.8	721.3	23.6	63.8
	Benzo(a)pyrene	5.7	37.4	129.7	40.9	233.8	8.8	25.7
	Dibenzo(a,h)anthracene	1.3	11.1	60.4	13.9	123.5	1.3	8.2
	Indeno(1,2,3-cd)pyrene	4.9	28.3	126.1	34.5	258.4	7.2	20.2
	Benzo(g,h,i)perylene	4.7	31	117.7	37.1	234.2	7.6	20.8
	Total PAHs	**99.5**	**483.6**	**2583.9**	**650.9**	**4651.6**	**156.8**	**483.3**

Table 8.2. Pollutant concentrations in soil samples 1 to 7.

II-3-) Cd-spiked soil

Cadmium chloride ($CdCl_2$, Sigma, St Louis, MO, USA, reagent grade 99.9%) was used as the test substance. Dilutions of a Cd solution were prepared in distilled water and sprayed over 500g dw of 5M LUFA soil (LUFA Speyer, Germany) in order to obtain the appropriate concentrations (0, 20, 100, 500 and 2500 mg Cd/kg soil dw). The resulting spiked soils were manually homogenized before seeds were sowed.

II-4-) Acute toxicity tests

Acute toxicity tests were realized according to the general procedure of international standard ISO (2005) used in the evaluation of the chemical effects on the emergence and growth of higher plants. The tests were conducted in a phytotron at 20 ± 2°C, 1960 ± 20 lux and a 8 hour-dark-photoperiod. Experimental test units were prepared in triplicates. They were filled with 500g of soil (dw) sampled from the 7 areas of Homecourt site or with 5M LUFA soil spiked with Cd (20-100-500-2500 mg.kg). Unspiked 5M LUFA soil was used as the control soil. For each test unit, 20 seeds were sown and the moisture content was checked daily by weight measurements and adjusted daily to 60% of the soil water holding capacity (WHC). After 28 days, test units were observed for seed germination and seedling height.

II-5-) Data analyses

The lowest observed effect concentration (LOEC) values for seed germination were determined using Dunnett's procedure for multiple comparisons (Dunnett, 1955). The Dunnett Software (version 1.5) from US EPA was used to calculate the minimum difference between the control and the treatment means detected as statistically significant ($P<0.05$). The median inhibitory concentrations (IC_{50}) for seedling growth were determined by expressing each treatment as a proportion of the control seedling growth by the Trimmed Spearman–Karber method (Hamilton et al., 1977). The US EPA software ICP 2.0 was used to estimate IC_{50} values. Hazardous Concentrations 5% (HC_5) were calculated following the method of Aldenberg and Slob (1993) with the exception that IC_{50} and LOEC values were used in the calculations instead of NOEC (no observed effect concentrations). $HC_{5\%}$ values are interpreted as the pollutant concentration below which 5% of the species is in danger when derived from NOEC values. Here, $HC_{5\%}$ values cannot be interpreted strictly in the same way since LOAEC and $IC_{50\%}$ were used but they remain a relevant tool in order to compare the sensitivity of several groups of species.

In parallel, relationships between plant responses and pollutant concentrations in soils were analysed by using (i) the Pearson linear correlation method or (ii) multiple regression

analyses using the forward stepwise method. All statistical analyses were performed using Statistica 6.0 Software (©Statsoft).

III-) Results

The toxic effects of the industrial-wasteland soil samples on the germination and growth of the five selected species are presented on figures 1 and 2, respectively. In term of germination (Figure 8.1), *Artemisia vulgaris* was the most sensitive of the five species, showing inhibition from total heavy metal concentrations of 334 mg/kg (soil 1), whereas *Antirrhinum majus* and *Hypericum perforatum* were inhibited from about 400 mg/kg (soil 5). *Trifolium repens* and *Verbascum thapsus* were less sensitive with only 20% inhibition even for the most contaminated soil (soil 7). Concerning shoot growth (Figure 8.2), *A. vulgaris* and *H. perforatum* exhibited the same order of sensitivity, showing inhibition from about 395.6 mg/kg of heavy metals. The other species presented a clear inhibition only for soils 5, 6 and 7. Once again, *T. repens* and *V. thapsus* were the less sensitive species.

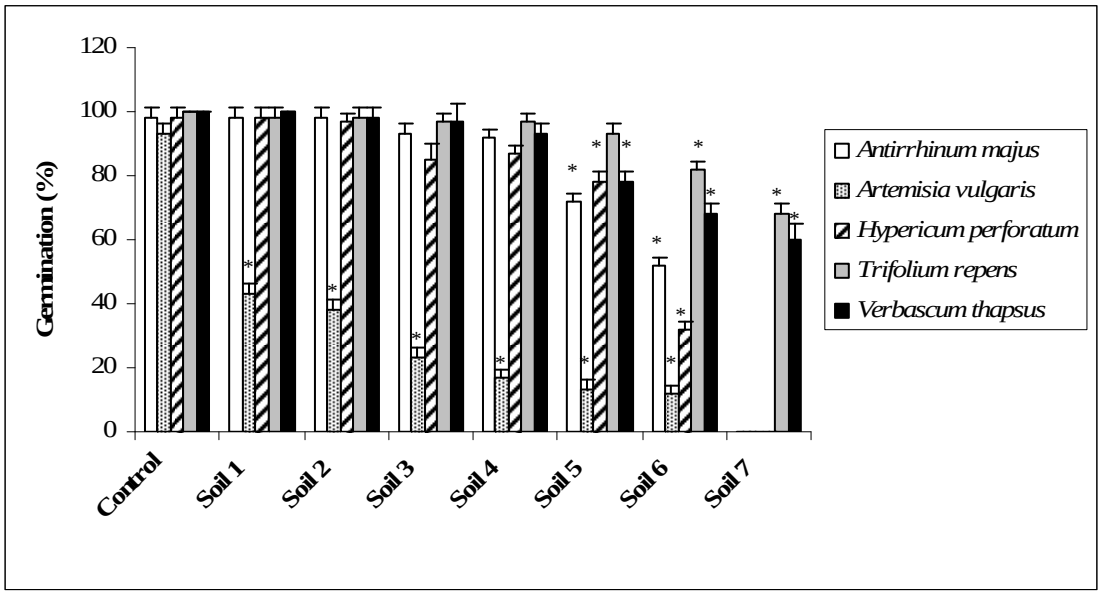


Figure 8.1. Seed germination 28 days after sowing of the five species exposed to seven wasteland soil samples. Bars represent one standard deviation of the mean of three replicates. Asterisks indicate significant differences from controls ($p<0.05$; Dunnett's test). Soils are ranked according to total metal concentrations with LUFA 5M used as control.

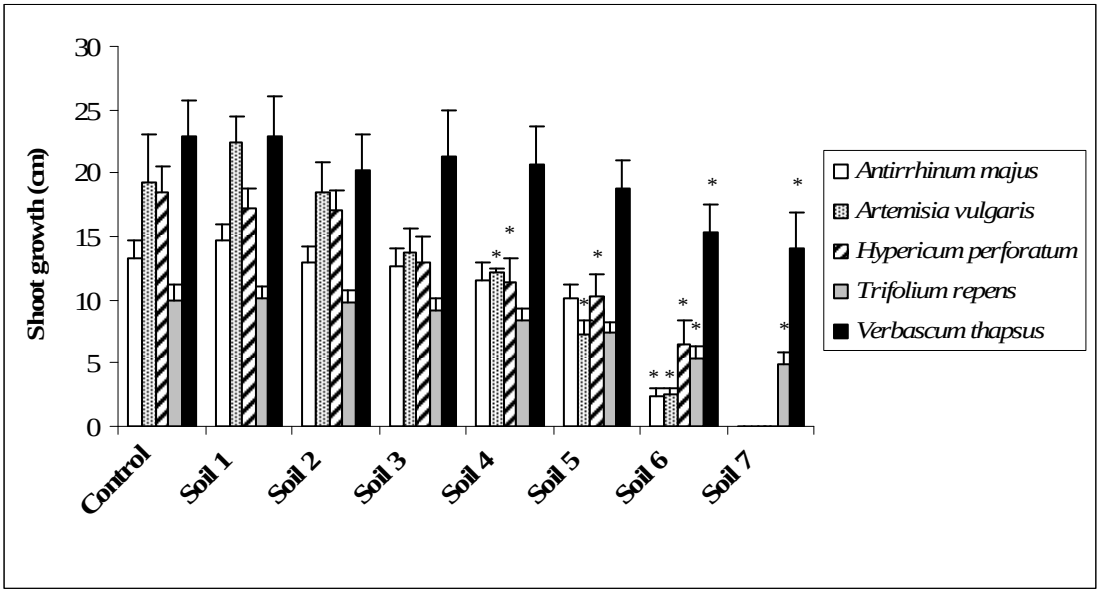


Figure 8.2. Shoot growth 28 days after sowing of the five species exposed to wasteland soil samples. Bars represent one standard deviation of the mean of three replicates. Asterisks indicate significant differences from controls ($p<0.05$; Dunnett's test). Soils are ranked according to total metal concentrations with LUFA 5M used as control.

Relationships between both endpoints and pollutant concentrations in the soil samples were studied through a multiple regression analysis (Table 8.3). All the models obtained tended to show that PAHs had minor effects on both germination and growth compared to heavy metals. Germination was mostly affected by Hg and Zn while Cd, Hg and Zn exerted toxic effects on plant growth.

In Cd spiked soil, seed germination rate and shoot growth was significantly impaired for all species (Figures 8.3 and 8.4). However, differences in species sensitivity were highlighted by considering their respective LOEC and IC_{50} values (Table 8.4). All species presented the same LOEC values for germination (100 mg Cd/kg). Concerning shoot growth, *A. vulgaris* presented the highest sensitivity (LOEC = 100 mg Cd/kg) while the other species were only affected above 500 mg Cd/kg (Figure 8.4). Moreover, *T. repens* and *V. thapsus* showed the highest IC_{50} values for both endpoints, suggesting that they were the less affected species. *A. vulgaris* was, once again, the most sensitive species with IC_{50} values of 162 mg/kg

Cd for germination and 257 mg/kg for shoot growth. The other 2 species, *A. majus* and *H. perforatum* showed less sensitivity to Cd stress.

		Regression models	*R*	*p*
Germination (%)	*Antirrhinum majus*	= -0.98 [Hg] + 95.16	0.98	< 0.01
	Artemisia vulgaris	= -0.86 [Zn] – 0.24 [Hg] + 90.79	0.97	< 0.01
	Hypericum perforatum	= -0.95 [Hg] + 91.87	0.95	< 0.01
	Trifolium repens	= -0.94 [Hg] – 0.11 [Zn] + 100.45	0.95	< 0.01
	Verbascum thapsus	= -0.92 [Hg] -0.86 [ACE] +0.62 [FL] + 97.77	0.94	0.02
Shoot Growth (cm)	*Antirrhinum majus*	= -0.90 [Hg] + 12.55	0.89	< 0.01
	Artemisia vulgaris	= -0.75 [Hg] -0.29 [Zn] + 23.06	0.89	0.02
	Hypericum perforatum	= -0.82 [Cd] – 0.36 [Acet] + 18.29	0.86	0.04
	Trifolium repens	= -0.85 [Cd] – 0.31 [Zn] – 0.22 [ACE] +0.165 [Cu] + 18.56	0.97	0.03
	Verbascum thapsus	= -0.73 [Cd] – 0.25 [Zn] +10.19	0.86	0.03

Table 8.3. Forward stepwise multiple regression results with germination and growth as dependant variables and pollutant concentrations as independent variables. ACE: acenaphtene; FL: fluorene.

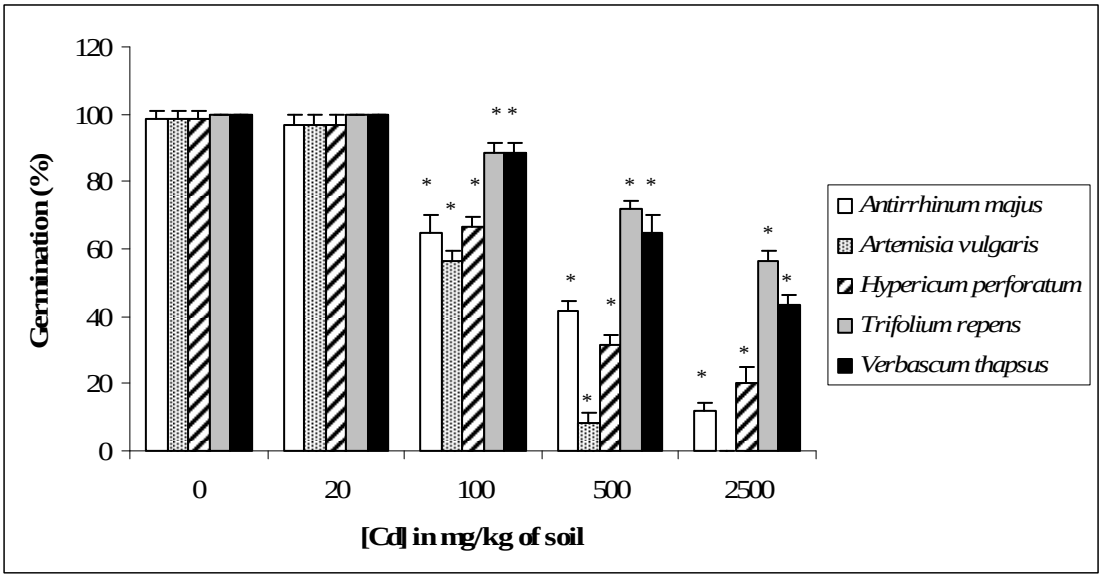


Figure 8.3. Seed germination 28 days after sowing of the five wasteland plant species exposed to a Cd-spiked soil. Bars represent one standard deviation of the mean of three replicates. Asterisks indicate significant differences from controls ($p<0.05$; Dunnett's test).

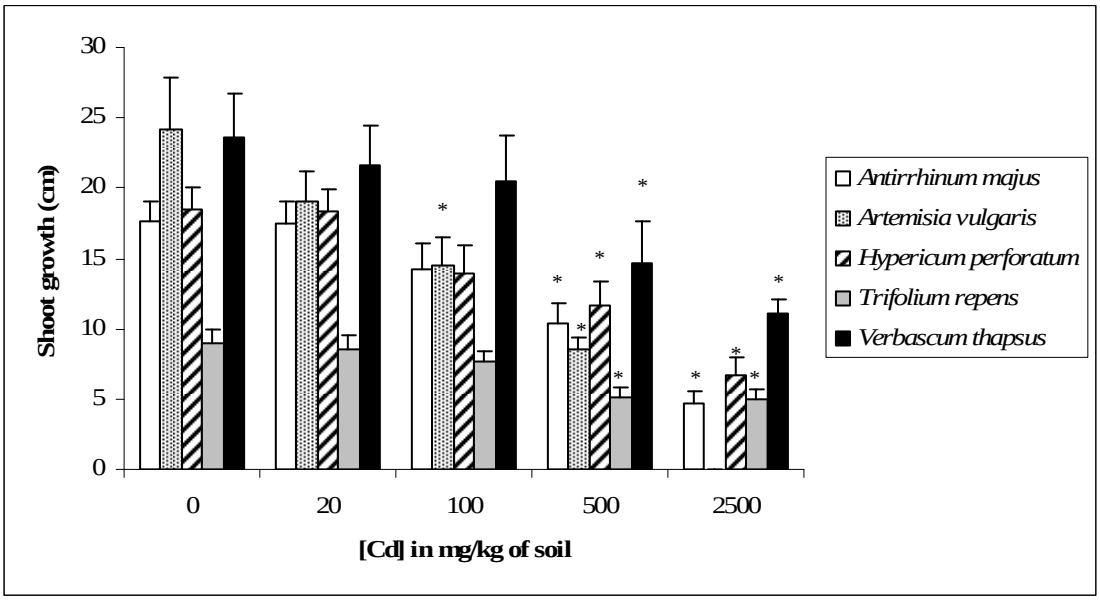


Figure 8.4. Shoot growth 28 days after sowing of the five wasteland plant species exposed to a Cd-spiked soil. Bars represent one standard deviation of the mean of at least five individuals. Asterisks indicate significant differences from controls ($p<0.05$; Dunnett's test).

	Germination		Growth	
	LOEC	**IC_{50}**	**LOEC**	**IC_{50}**
Antirrhinum majus	100	373 [329 ; 407]	500	1021 [626 ; 1320]
Artemisia vulgaris	100	162 [142 ; 181]	100	257 [91 ; 413]
Hypericum perforatum	100	301 [280 ; 331]	500	1419 [932 ; 1873]
Trifolium repens	100	>2500	500	>2500
Verbascum thapsus	100	1876 [1667 ; 2071]	500	1193 [447 ; 1952]

Table 8.4. Lowest-observed adverse effect concentrations (LOEC) and median effective concentrations (IC_{50}) for germination and shoot growth for the five plant species. IC_{50} and LOEC are expressed as mg Cd per kg dry soil. 95% confidence levels are indicated between brackets.

In other ways, correlations between both endpoint and Cd concentrations (Table 8.5) clearly indicated a direct relationship between the severity of the response and the increasing metal concentrations for all the test species. Significant relationships were noticed for *T. repens* and *V. thapsus* when considering germination as endpoint. On the contrary, in the cases of *A. majus*, *A. vulgaris* and *H. perforatum*, significant relationships were only recorded for growth.

	Germination (%)	**Shoot growth (cm)**
Antirrhinum majus	-0.87	-0.92*
Artemisia vulgaris	-0.75	-0.88*
Hypericum perforatum	-0.78	-0.89*
Trifolium repens	-0.89*	-0.75
Verbascum thapsus	-0.91*	-0.88

Table 8.5. Pearson linear correlation factors between the two toxicological endpoints (germination, shoot growth) and Cd concentrations. Asterisks indicated significance ($p<0.05$) tested with ANOVA on residuals.

IV-) Discussion

Plant ecotoxicology often focused on potential impact of pollutants on crop and vegetable species, considering possible impacts on ourselves (Moriarty, 1999). But it would be a mistake to sum up environmental problems to food chain contaminations and to forget other major threats like reduction of biodiversity and degradation of soil quality. Indeed, plant biodiversity regulated natural ecosystems through flows of energy and nutrients, and several studies have highlighted the negative effect on species richness of anthropogenic stresses like agriculture intensification (Gardi et al., 2002). As a matter of fact, it would be necessary to introduce more "ecologically relevant" species in ecotoxicological standardized protocols at an international level.

In this study, exposures of seeds and seedlings to seven polluted soils resulted in clear-cut biological effects and highlighted the relationship between increasing concentrations of heavy metals, especially Cd and Hg, and the degree of germination and shoot growth inhibitions for five meadow plant species. Indeed, Cd has been reported to inhibit seed

germination and to exert adverse effects on radicle and coleoptile growth in many species such as *Hordeum vulgare*, *Matricaria recutita* or *Pisum sativum* (De Pasquale et al., 1988; Mihoub et al., 2005; Munzuroglu and Zengin, 2006; Liu et al., 2007). Besides, Hg has already proved to exert a complete inhibition of germination in cucumber and wheat seeds at concentrations higher than 1.5 and 1.7 mM, respectively (Munzuroglu and Geckil, 2002). This metal also exhibited germination decrease in rice (*Oryza sativa*) exposed to 10 µM $HgCl_2$ (Mishra and Choudhuri, 1998).

In most of the studies cited above, germination was considered as the less sensitive endpoint, compared to shoot or root growth (Ferrari et al., 1999; Radetski et al., 2000; An, 2004; Da Rosa Correa et al., 2006; Munzuroglu and Zengin, 2006). In regards to our results, while taking into account LOEC values, germination was more sensitive than growth for all species, excepted *A. majus*. The same tendency was found for *A. majus* and *H. perforatum* when considering IC_{50} values. However, in that case, growth was the most sensitive endpoint for *V. thapsus* while no differences between endpoints were noticed for *A. vulgaris* and *T. repens*. Such discrepancies between our results and literature could be partly explained by the fact we used untreated biological seeds and not common F1 ones usually selected for their high germinative ability. Moreover, the species used in the present study could be considered as ruderal species (Grime, 1979) known for having a high mortality in the first development stages when exposed to environmental constraints.

A previous study by Da Rosa Correa et al. (2006) reported LOEC values of 25, 50 and 200 mg Cd per kg dry soil when considering germination of lettuce, oat and Chinese cabbage, respectively (Table 8.6). About the same order of magnitude (100 mg/kg) was found in our tests considering the same parameters.

	Germination		**Growth**		
Species	**LOEC**	**IC_{50}**	**LOEC**	**IC_{50}**	**References**
Lettuce	25	150	6.25	80	Da Rosa Correa *et al* (2006)
Oat	50	400	12.5	115	Da Rosa Correa *et al* (2006)
Chinese Cabbage	200	3200	50	1100	Da Rosa Correa *et al* (2006)
Sorghum	> 640	> 640	40	61	An (2004)
Cucumber	> 640	> 640	80	88	An (2004)
Wheat	640	> 640	40	113	An (2004)

Table 8.6. Literature data relative to Cd toxicity on higher plants (expressed in mg Cd/kg d.w.)

The same authors also observed LOEC values on biomass growth for lettuce, oat and Chinese cabbage, comprised between 6.25 and 50 mg Cd per kg dry soil (Da Rosa Correa et al., 2006), just as An (2004) who mentioned LOEC values of 40, 80 and 40 mg Cd per kg dry soil for shoot growth in *sorghum, cucumber and sweet corn*, respectively (Table 8.6). In our study, only *A. vulgaris* exhibited the same range of LOEC values on shoot growth.

Among the five tested plants, *T. repens* and *V. thapsus* showed a high resistance to Cd whereas the other ones were much more sensitive and should serve as tools for assessing soil ecotoxicity. For the same reasons, plants which exhibited a resistance to pollution could not be used for such purposes (An, 2006). Thus, according to our observations, *A. vulgaris* could be suggested as a potential organism to assess heavy metal contaminations. On the contrary, *T. repens* and *V. thapsus*, due to their high resistance to heavy metals, could be used in phytoremediation, as already suggested in previous papers (Wickland, 1990; Prasad and Freitas, 2003) where both species were noticed for their ability to establish on highly metal-contaminated soils.

Moreover, both acute toxicity tests and wasteland-soil samples assessment have shown high correlation factors between heavy metal concentrations and the two endpoints. Taken as a whole, *A. majus* presented some of the highest relationships between metals and physiological responses. According to these results and taking into account the relatively good sensitivity of that species, we suggested it as a pertinent model for ecotoxicity studies. Moreover, this species has been used for a long time as a biological model in the fields of plant genetics (Zhang et al., 2005), developmental biology (Bradley et al., 1996) or pollination ecology (Glover and Martin, 1998; Comba et al., 2000), conferring it significant advantages for research purposes.

At last, we compared the species sensitivity distribution for the five wild species considered in the present work and for species of agronomical interest that are often recommended for plant ecotoxicity tests. The comparison was made through the calculation of HC_5 values derived from LOEC or IC_{50} values.

HC_5 values were up to 10-times lower with agronomic species compared to wild plants (Table 8.7). This suggested that tests based on crop species were more protective than tests based on wild plants. Moreover, the difference between these two plant groups was particularly observed when considering growth LOEC or IC_{50} values, while this was not so clear for the germination endpoint.

	Toxicity endpoints and parameters considered for calculations			
	Germination		Shoot growth	
Species	LOAEC	$IC_{50\%}$	LOAEC	$IC_{50\%}$
Crop and vegetable plants (Tab.6)	10.4 (4)	44.1 (3)	5.8 (6)	23.9 (6)
Wild plants (present study)	nd	77.1 (4)	110.9 (5)	225.5 (4)

Table 8.7. $HC_{5\%}$ values of Cd (mg/kg soil) calculated from literature data and results of the present study. nd: not determined since no variation at all was observed in LOAEC values among the five tested species. In parenthesis is indicated the number of values used for distribution analysis.

De facto, in order to evaluate the potential use of wild plants in soil ecotoxicity assessment, it would be necessary in further investigations i) to use a wide range of monocots and dicots, including both classical plant models and wild species, and ii) to assess the phytotoxic effects of most heavy metals usually found in contaminated soils (i.e. As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn).

V-) Conclusion

Polluted soil exposures and Cd-spiked soil exposure disturbed both seed germination and shoot growth for the five wild plant species but with more or less intensity. We suggested the use of mugwort (*A. vulgaris*) as a plant model for acute toxicity tests whereas white clover (*T. repens*) and woody mullein (*V. thapsus*) were introduced as potential models for phytoremediation studies. Finally, snapdragon (*Antirrhinum majus*) could be considered as a pertinent model for ecotoxicology studies dealing with heavy metals. Further experiments should be performed, using soil spiked with representative industrial-wasteland pollutants (e.g. As, Hg, Zn or PAHs) in order to compare wild and agronomical species and to select appropriate species for toxicity testing.

VI-) Acknowledgments

Marc Dazy's PhD thesis is supported by the French Ministry of Education and Research. The present work was granted by GISFI (Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles) and Region Lorraine. Authors wish to thank Laure Sevin and the SARM team of the Centre de Recherches Pétrographiques et Géochimiques (CRPG - Nancy) for skilful technical assistance on soil physicochemical analyses.

VII-) References

Aldenberg T, Slob W. Confidence limits for hazardous concentrations based on log-logistically distributed NOEC toxicity data. Ecotoxicol Environ Saf 1993; 25: 48-63.

An YJ. Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. Environ Pollut 2004; 127: 21-26.

An YJ. Assessment of comparative toxicities of lead and copper using plant assays. Chemosphere 2006; 62: 1359-1365.

Blaise C, Férard F. Small-scale freshwater toxicity investigations: toxicity test methods. Kluwer Academic, Dordrecht, 2006, 551 pp.

Bradley D, Vincent C, Carpenter R, Coen E. Pathways for inflorescence and floral induction in *Antirrhinum*. Development 1996; 122: 1535-1544.

BRGM. Guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués. Document BRGM, 298. BRGM (Ed), Orléans, 2001, 83 pp.

Comba L, Corbet SA, Hunt H, Outram S, Parker JS, Glover BJ. The role of genes influencing the corolla in pollination of *Antirrhinum majus*. Plant Cell Environ 2000; 23: 639-647.

Da Rosa Correa AX, Rorig LR, Verdinelli MA, Cotelle S, Férard JF, Radetski CM. Cadmium phytotoxicity: Quantitative sensitivity relationships between classical endpoints and antioxidative enzyme biomarkers. Sci Total Environ 2006; 357: 120-127.

Das P, Samantaray S, Rout GR. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. Environ Pollut 1997; 98: 29-36.

De Pasquale R, Ragusa S, Iauk L, Barbera R, Galati EM. Effect of cadmium on germination, growth and active principle contents of *Matricaria recutita* L. Pharmacol Res Commun 1988; 20: 151-154.

Dunnett CW. Multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. J. Am. Stat. Assoc 1955; 50: 1096-1121.

Eom IC, Rast C, Veber AM, Vasseur P. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. Ecotoxicol Environ Saf 2007; 67: 190-205.

Ferrari B, Radetski CM, Veber AM, Férard JF. Ecotoxicological assessment of solid wastes: a combined liquid and solid phase testing approach using a battery of bioassays and biomarkers. Environ Toxicol Chem 1999; 18: 1195-1202.

Gardi C, Tomaselli M, Parisi V, Petraglia A, Santini C. Soil quality indicators and biodiversity in northern Italian permanent grasslands. Eur J Soil Biol 2002; 38: 103-110.

Glover BJ, Martin C. The role of petal cell shape and pigmentation in pollination success in *Antirrhinum majus*. Heredity 1998; 80: 778-784.

Grime, J.P., 1979. *Plant strategies and vegetation processes*. John Wiley (Ed), Chichester, 456 pp.

Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. Trimmed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ Sci Technol 1977; 11: 714-719.

Hsu MJ, Selvaraj K, Agoramoorthy G. Taiwan's industrial heavy metal pollution threatens terrestrial biota. Environ Pollut 2006; 143: 327-334.

ISO (International Organization for Standardization). Soil quality - effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*)—Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate. No. 11268-1. ISO, Geneve, 1993a, 6 pp.

ISO (International Organisation for Standardisation). Soil quality - determination of the effects of pollutants on soil flora. Part 1. Method for the measurement of inhibition of root growth. No. 11269-1. ISO, Geneve, 1993b, 10 pp.

ISO (International Organization for Standardization). Soil quality - Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Part 2: Determination of effects on reproduction. No. 11268-2. ISO, Geneve, 1998, 18 pp.

ISO (International Organization for Standardization). Soil quality - Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants. No. 11267. ISO, Geneve, 1999, 16 pp.

ISO (International Organization for Standardization). Soil quality - Determination of effects of pollutants on soil flora. Part 2: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants. No. 11269-2. ISO, Geneve, 2005, 12 pp.

Kapanen A, Itavaara M. Ecotoxicity Tests for Compost Applications. Ecotoxicol Environ Saf 2001; 49: 1-16.

Liu WX, Coveney, RM, Chen JL. Environmental quality assessment on a river system polluted by mining activities. Appl Geochem 2003; 18: 749-764.

Liu X, Zhang S, Shan XQ, Christie P. Combined toxicity of cadmium and arsenate to wheat seedlings and plant uptake and antioxidative enzyme responses to cadmium and arsenate co-contamination. Ecotoxicol Environ Saf 2007; 68: 305-313.

Mengchang H, Wang Z, Tang H. Modelling the ecological impact of heavy metals on aquatic ecosystems: a framework for the development of an ecological model. Sci Total Environ 2001; 266: 291-298.

Mihoub A, Chaoui A, El Ferjani E. Biochemical changes associated with cadmium and copper stress in germinating pea seeds (*Pisum sativum*). CR Biol 2005; 328: 33-41.

Mishra A, Choudhuri MA. Amelioration of lead and mercury effects on germination and rice seedling growth by antioxidants. Biol Plantarum 1998; 41: 469-473.

Moriarty F. Ecotoxicology: the study of pollutants in ecosystems. Academic Press, London, 1999, 347 pp.

Munzuroglu O, Geckil H. Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. Arch Environ Contam Toxicol 2002; 43: 203-13.

Munzuroglu O, Zengin FK. Effect of cadmium on germination, coleoptile and root growth of barley seeds in the presence of gibberellic acid and kinetin. J Environ Biol 2006; 27: 671-677.

Prasad, M.N.V., Freitas, H.M.O., 2003. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. Electr. J. Biotech. 6, 285-321.

Radetski CR, Cotelle S, Férard JF. Classical and biochemical endpoints in the evaluation of phytotoxic effects by the herbicide trichloroacetate. Environ Exp Bot 2000; 44: 221-229.

Rama Devi S, Prasad MNV. Copper toxicity in Ceratophyllum demersum L. (Coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants. Plant Sci 1998; 138: 157-165.

Smith, M.J., Flowers, T.H., Duncan, H.J., Alder, J., 2006. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues. *Environ. Pollut.* 141, 519-525.

Stephenson GL, Kuperman RG, Linder GL, Visser S. Toxicity tests for assessing contaminated soils and ground water. In: Sunahara GI, Renoux AY, Thellen CL, Pilon A, editors. Environmental analysis of contaminated sites. John Wiley & Sons, Chichester, 2002, pp. 25-43.

Truhaut R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. Ecotox Environ Saf 1977; 1: 151-173.

Wang WC, Freemark K. The use of plants for environmental monitoring and assessment. Ecotox Environ Saf 1995; 30: 289-301.

Wickland DE. Vegetation of heavy metal contaminated soils in North America. In: Shaw AJ, (Ed.). Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects. CRC Press, Boca Raton, 1990, pp. 40-49.

Zhang D, Yang Q, Bao W, Zhang Y, Han B, Xue Y, Cheng Z. Molecular cytogenetic characterization of the *Antirrhinum majus* genome. Genetics 2005; 169: 325-335.

CHAPITRE 9.

EVALUATION DE LA FONCTION D'HABITAT D'UN SOL DE COKERIE TRAITE PAR DESORPTION THERMIQUE

Use of a plant multiple-species experiment for assessing the habitat function of a coke factory soil before and after thermal desorption treatment

Marc Dazy*, Jean-François Férard and Jean-François Masfaraud

Article soumis à la revue Ecotoxicology and Environmental Safety

Abstract

The present study focused on the impact of a coke factory soil on plants, before (NM-100%) and after (NM-TD) a thermal desorption treatment was applied. In this way, seeds from several plant species were sown in racks filled with three soil samples (Control, NM-100%, NM-TD) and biological effects were studied at different organizational levels by considering ecological indices, seed germination, plant growth and biomass, leave chlorophyll fluorescence and antioxidative responses. NM-100% soil exhibited phytotoxic effects resulting in decreased species richness, biodiversity and biomass productivity. It also exerted impacts on several species at the cellular (production of free radicals and increased lipid peroxidation) and individual (decreased photosynthesis, growth and biomass) levels. Our results tended to prove some beneficial effects of thermal desorption treatment on plants as a recovery of vegetation was observed.

Keywords: thermal desorption, antioxidant enzymes, lipid peroxidation, chlorophyll fluorescence, biodiversity, vegetation recovery, polluted soil

I-) Introduction

In northern and eastern France, coke factories, metallurgical industries and mining activities during the last century caused extensive damages to local vegetation and important changes in soil characteristics (Gunn, 1995; Dudka and Adriano, 1997). Today, most of industrial wastelands are abandoned without particular safety measures and their potential environmental impacts have been poorly studied. Indeed, in these areas, the risk of lateral dispersion by wind erosion of contaminated particles and leaching of contaminants into nearby watercourses or ground water, due to water percolating through polluted soil, is a realistic and significant hazard (Vangronsveld et al., 1996; Venditti et al., 2000; Bleeker et al., 2002).

De facto, many methods were developed to improve soil remediation including low-cost phytoremediation techniques (Fischerova et al., 2006), soil washing (Fabbri et al., 2008; Keskin et al., 2008), the use of chelating agents (Lestan et al., 2008), mineral-amended composts (Van Herwijnen, 2007), lime and red-mud amendments (Gray et al., 2006) or paper mill sludges addition (Calace et al., 2005). Chemical treatments such as oxidation (Flores et al., 2007; Ferrarese et al., 2008), ozonation (O'Mahony et al., 2006) or thermal desorption (Chang and Yen, 2006) were also widely used.

Thermal desorption treatment has been considered as one of the most popular and versatile remediation technique due to its possible application to a wide range of organic contaminants and some heavy metals (Hg), converting them to volatile forms. Indeed, in this process, the contaminated soil is generally heated between 150 and 500 °C, and a physical separation that transfers the pollutants to a gas stream is produced (Chang and Yen, 2006; Merino and Bucala, 2007).

In most studies, the efficiency of such remedation treatments was only assessed through physico-chemical analyses (Lee et al.,1998 ; Rienks, 1998; Chang and Yen, 2006) and only a few papers evaluated their impact on ecosystem recovery through nutrient dynamics (Fernandez-Luqueno et al., 2008), soil microbial characteristics (Gong et al., 2005 ; Juwarkar et al., 2007 ; Epelde et al., 2008) and earthworm (Geissen et al., 2008) and nematode communities (Biederman et al., 2008; Shao et al., 2008). When taking into account effects on vegetation, studies mainly focused on the mobility and uptake of heavy metals by plants (Clemente et al., 2005; Friesl et al., 2006; Gadepalle et al., 2008) and only Pastor et al. (2007) described effects of remediation treatments on plant community structure. However,

no article dealing with potential effects of thermal desorption on vegetation recovery has been found in literature. Nevertheless, it would be interesting to assess the influence of such remediation treatment on the soil habitat function (i.e. ability of a soil to serve as a habitat for plants, microorganisms and soil-living animals; Maliszewska-Kordybach and Smreczak, 2003) through changes in plant community structure and plant physiological status.

Indeed, most of the pollutants present in industrial-wasteland soils have been demonstrated to exert toxic effects on plants including inhibition of plant growth and germination (Vasquez et al., 1987; Kimbrough et al., 1999; Aravind and Prasad, 2005). Also they were also shown to stimulate the formation of reactive oxygen species (ROS) which are among the most reactive compounds produced during heavy metal stress (Prasad, 1999) and lead to multiple toxic effects like lipid peroxidation, protein cleavage or DNA damages (Unyayar et al., 2006). However, in order to scavenge ROS and to avoid oxidative damages, cells are able to protect themselves by using enzymatic and non enzymatic mechanisms, including superoxide dismutase, catalase, peroxidases or glutathione (Apel and Hirt, 2004; Smirnoff, 1998). Consequently, changes in antioxidant levels or cellular-damages products are widely used to assess the physiological status of organisms (Aravind and Prasad, 2005; Prasad, 1999).

The aim of the present study was to characterize the biological effects of a coke factory soil by the use of a plant multispecies experiment and to describe a putative benefit resulting from a thermal desorption treatment. Effects at different organizational levels were studied through analyses of plant oxidative status, plant growth and germination or community indexes of richness and biodiversity.

II-) Material and methods

II-1-) Soil samples

Three different soil samples were used in this study. First, LUFA 5M soil (LUFA-Speyer standard soil) was considered as control. That agricultural soil was certified to present pollutant concentrations below French soil concentration values above which soil is considered as a pollution source (VDSS). Secondly, NM100% soil was sampled at the former cokery site of Neuves-Maisons (Lorraine region, France). This soil was contaminated by

heavy metals, especially Cr, Pb and Zn, and exhibited PAHs concentration of about 1500 mg/kg soil dw. Phytotoxicity of soils containing such high concentrations in metals and PAHs have already been demonstrated by several authors (Sverdrup et al., 2003; An, 2004; Da Rosa Correa et al., 2006). Finally, NM-TD soil corresponded to the Neuves-Maisons soil after a thermal desorption treatment (500°C, 1h) was undertaken. Physico-chemical characteristics of the Neuves-Maisons soil before and after thermal desorption are presented in Table 9.1.

	NM-TD	**NM-100%**
Soil characteristics		
Clay (< 2 µm) in g/kg	97 - 109	101 - 150
Silts (2/20 µm) in g/kg	92 – 111	105 - 158
Silts (20/50 µm) in g/kg	94 - 101	59 - 93
Sands (50/200 µm) in g/kg	130 - 150	61 - 104
Sands (200/2000 µm) in g/kg	554 - 580	508 - 644
C/N	61 – 63	21 - 24
pH	7.9 - 8.0	6.8 - 7.3
Pollutant Concentrations in mg/kg soil dw.		
Cr	379 – 428	562 - 679
Cu	107 – 111	128 - 133
Ni	100 - 104	94 - 99
Zn	2720 – 2780	1870 - 2350
Cd	2.0 – 2.2	2 - 3
Pb	651 – 704	421 - 543
Hg	1.4 - 1.9	4 - 24
Naphthalene	2.5 - 3.3	35 - 39
Acenaphtylene	2.8 – 3	45 - 51
Acenaphtene	0.8 - 0.9	53 - 64
Fluorene	2.5 - 2.7	50 - 63
Phenanthrene	9.0 – 9.7	135 - 139
Anthracene	6.1 – 6.5	69 - 86
Fluoranthene	15.2 – 16.1	250 - 259
Pyrene	10.1 – 10.9	176 - 180
Benzo[a]anthracene	7.8 – 8.5	128 - 137
Chrysene	4.9 – 5.9	63 - 77
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	10.3 – 11.3	114 - 120
Benzo[b]fluoranthene	8.5 – 9.5	146 - 152
Benzo[k]fluoranthene	2.8 - 4.4	49 - 51
Benzo[a]pyrene	7.7 – 8.8	111 - 114
Dibenzo[a,h]anthracene	4.8 – 5.0	23 - 24
Benzo[g,h,i]perylene	4.6 – 5.2	67 - 71
Σ 16 US-EPA PAHs	**100 – 111**	**1528 - 1606**

Table 9.1. Physico-chemical properties of the treated (NM-DT) and untreated (NM-100%) soils expressed as min-max of 4 values.

II-2-) Experimental design

Each soil was poured into triplicated 25x25x20 cm plastic racks. For each rack, 10 seeds of 16 open-land species (Table 9.2) were sown. Soil moisture content was checked daily by weight measurements and adjusted daily to 60% of the soil water holding capacity (WHC). The tests were conducted in a phytotron at 20 ± 2°C, 1960 ± 20 lux and a 8 hours-dark-photoperiod.

Scientific Names	**Common Names**	**Families**
Antirrhinum majus	Snapdragon	*Scrophulariaceae*
Artemisia vulgaris	Mugwort	*Asteraceae*
Campanula patula	Spreading Bellflower	*Campanulaceae*
Cardamine pratensis	Cuckoo Flower	*Brassicaceae*
Chenopodium album	Fat Hen	*Chenopodiaceae*
Epipactis helleborine	Broad-leaved helleborine	*Orchidaceae*
Erigeron canadensis	Horseweed	*Asteraceae*
Euphorbia cyparissias	Cypress Spurge	*Euphorbiaceae*
Hypericum perforatum	St. John's Wort	*Hypericaceae*
Myosotis arvensis	Field Forget-me-not	*Boraginaceae*
Oenothera biennis	Evening Primrose	*Onagraceae*
Origanum vulgare	Oregano	*Lamiaceae*
Portulaca oleracea	Little Hogweed	*Plantaginaceae*
Salvia pratensis	Meadow Clary	*Lamiaceae*
Solidago canadensis	Canadian Goldenrod	*Asteraceae*
Tanacetum vulgare	Common Tansy	*Asteraceae*

Table 9.2. Species used for toxicity testings.

II-3-) Ecological analyses

After 76 days, the number of individuals per species was recorded in all racks and Q (total number of plants per rack) was noticed. Species richness (S) was then estimated and indexes of Shannon-Weaver's diversity (H') and Pielou's equitability (J) were calculated according to Shannon and Weaver (1963) and Pielou (1966), respectively. Total aerial biomass was also measured to assess biological productivity. Finally, germination was followed every 3 days and maximum rates were taken into account.

II-4-) Physiological and biochemical responses

For these analyses, five species were selected considering the biomass available for biochemical analyses and but also the number of individuals ($n \geq 3$) sufficient to allow relevant statistical analyses. Chlorophyll fluorescence Fv/Fm ratio was measured in one leave of each individual with the use of a Handy-Pea portable fluorescence measurement system (Hansatech Instruments).

Then, individuals of each species were then separately taken from the racks. Samples were washed to eliminate dust particles, and stored at -80°C until analysis. Then, 100 mg of mature leaves were suspended in 125 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8) and crushed in a mortar placed on ice. The resulting suspension was centrifuged at 15,000 *g* for 10 min at 4°C and supernatant was used for biochemical analyses. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation level were measured according to Dazy et al. (2008) and reported to protein contents previously determined according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard.

II-5-) Data analyses

Levene's test was used to assess the homogeneity of variance of all results. For ecological indexes and plant physiological responses, significant differences ($p<0.05$) between treatments were highlighted by using ANOVA and Tukey's HSD test. For plant biochemical responses, Kruskall-Wallis and Wilcoxon – Mann-Whitney's U tests were used due to heterogeneity of variance. All these tests and correlation analysis were performed with Statistica 6.0 Software (©Statsoft).

III-) Results

Ecological indexes determined 76 d after sowing highlighted structural differences between plant mixtures (Table 9.3). Indeed, when comparing control to NM100% racks, decreases of all indexes were observed. As an example, 13 species were present in controls while only 8 were able to grow in the polluted soil. The two soils also differed in term of total

richness, equitability and species diversity (with H' values of 3.54 and 2.73 for the control and polluted soils, respectively) but the strongest effect was a 3-fold decrease in biomass indicating a loss of system productivity. After thermal desorption treatment (NM-TD), most parameters, excepted J, presented values significantly higher than NM-100% ones. Moreover, species (S) and total richness (Q) found in NM-TD were closed to control values, suggesting that the treatment favoured a vegetation recovery.

	S	H'	J	Q	Biomass (g)
Control	13 ± 2 a	3.54 ± 0.2 a	0.96 ± 0.01 a	36 ± 3.8 a	1330 ± 227 a
NM-100%	8 ± 1 b	2.73 ± 0.16 c	0.91 ± 0.01 b	18 ± 6.1 b	449 ± 91.4 c
NM-DT	11 ± 1.2 a	3.14 ± 0.13 b	0.92 ± 0.02 b	35 ± 2 a	817 ± 74 b

Table 9.3. Species richness (S), Shannon-Weaver diversity (H'), Pielou equitability (J) indexes and total richness (Q) and total aerial biomass determined for each treatment at the end of the experiment. Letters discriminate significant differences ($p<0.05$) between treatments using ANOVA followed by Tukey's HSD test.

The 16 species germination rates are presented in Figure 9.1. Globally, under control conditions, germination never exceeded 50% for all species. These low germination rates could be partly explained by soil physico-chemical properties and phytotron germinating conditions which were not optimal for all species. On other way, the toxicity of the polluted NM-100% soil and the effect of thermal desorption treatment (NM-TD) depended on the considered species. Indeed, five groups of species could be distinguished. First, *E. cyparissias*, *E. helleborine*, *O. biennis* were only able to establish, though at low rates, in the control soil while two other species, *O. vulgare* and *S. canadensis*, were also able to grow on the remediated soil. Other species, *A. majus*, *H. perforatum* and *S. pratensis*, germinated on NM-100% soil but with a rate lower than in controls. Also, their germination was not affected by NM-TD soil and even seemed to be stimulated. On opposite, in the cases of *A. vulgaris*, *P. oleracea* and *T. vulgare*, both NM-100% and NM-TD soils inhibited plant germination. Finally, five species (*C. album*, *C. patula*, *C. pratensis*, *E. canadensis* and *M. arvensis*) germinated on the 3 soils and seemed to cope with soil pollution.

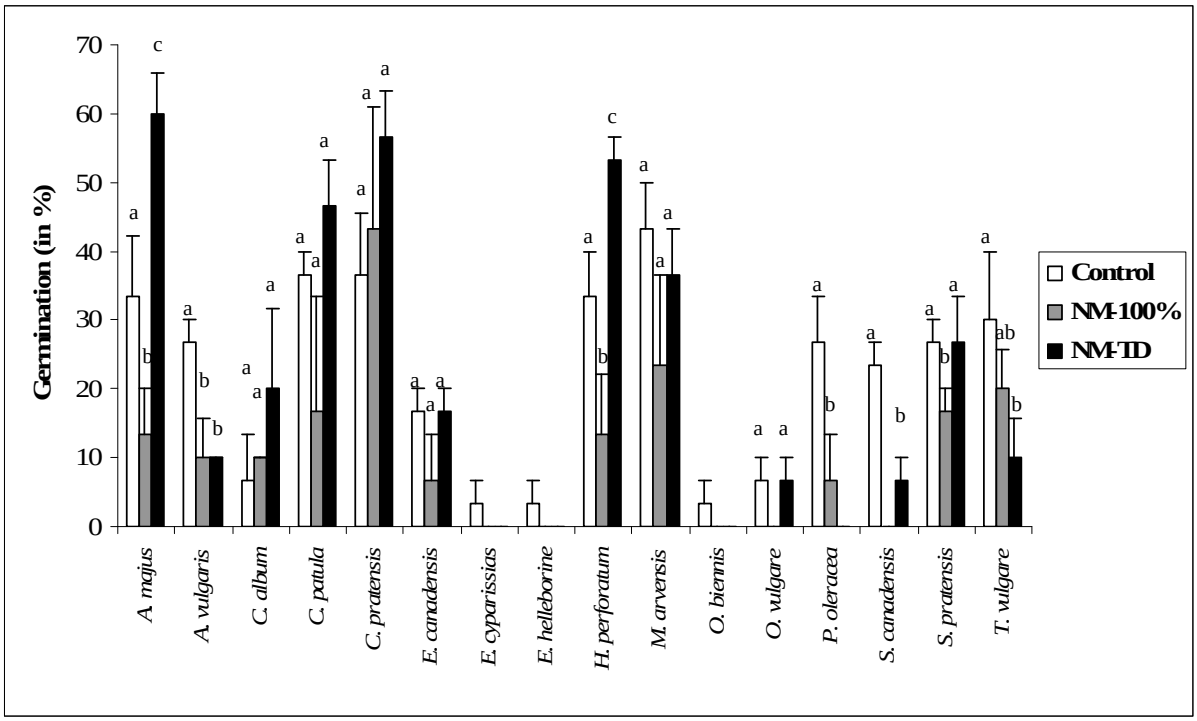


Figure 9.1. Germination rates of all species determined at the end of the experiments and expressed as means ± standard errors of 3 replicates.

With the exception of *M. arvensis*, all species had lower heights in NM-100% soil than in controls (Figure 9.2A). The growth was inhibited by approximately 30 to 60% depending on the species. The remediated soil remained highly toxic to *A. vulgaris* and *T. vulgare* while partial or total recovery was noted for *C. pratensis* and *H. perforatum* respectively. Concerning biomass (Figure 9.2B), the same trends were observed but this time only *A. vulgaris* exhibited decreases in both NM-100% and NM-TD. Moreover, biomass and growth were highly correlated in the cases of *A. vulgaris* ($r = 0.87$; $p < 0.01$), *C. pratensis* ($r = 0.96$; $p < 0.01$), *H. perforatum* ($r = 0.86$; $p < 0.01$) and *T. vulgare* ($r = 0.78$; $p < 0.05$).

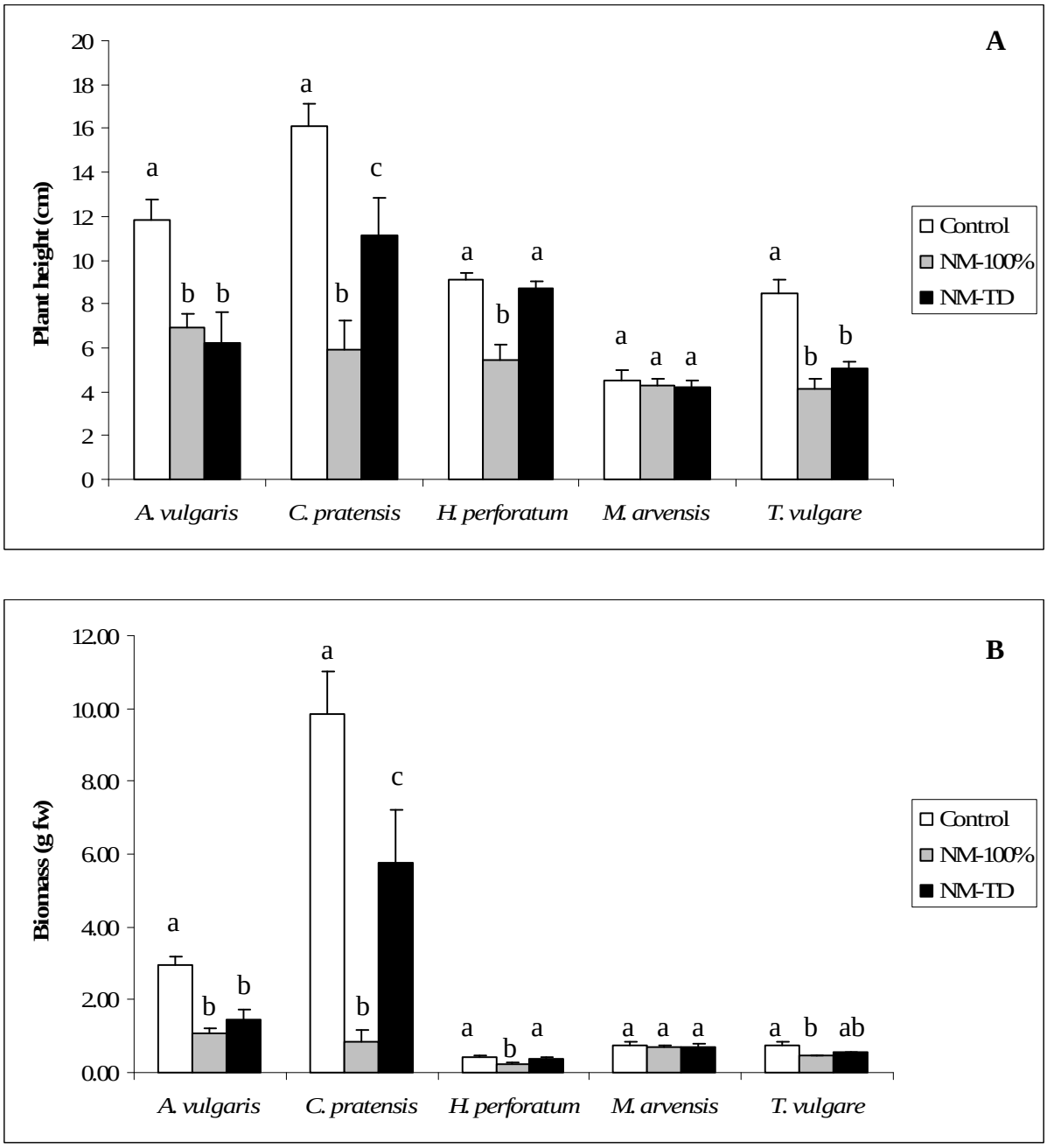


Figure 9.2. Plant height and biomass of *C. pratensis*, *M. arvensis* (n=5), *H. perforatum* (n=4), *A. vulgaris* and *T. vulgare* (n=3) measured at the end of the experiment. For a given species, different letters discriminate statistical differences between the corresponding treatments (ANOVA followed by HSD test from Tuckey, $p<0.05$).

Leaf chlorophyll fluorescence responded to NM100% and NM-TD soils for some species only (figure 9.3). The Genty-parameter (Fv/Fm), decreased in leaves of *A. vulgaris* and *T. vulgare* grown on both NM-100% and NM-TD soils even if NM-TD seemed to have a lower impact than NM-100% in *A. vulgaris*. Besides, chlorophyll fluorescence was only inhibited by NM-100% soil in the case of *H. perforatum*.

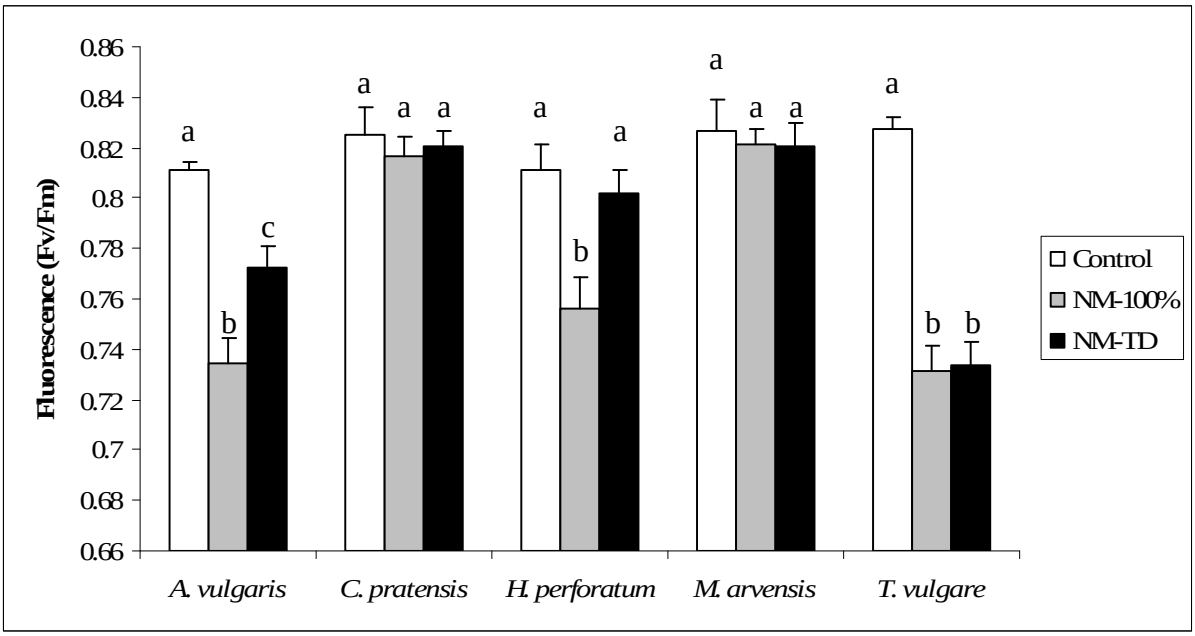


Figure 9.3. Chlorophyll fluorescence of *C. pratensis*, *M. arvensis* (n=5), *H. perforatum* (n=4), *A. vulgaris* and *T. vulgare* (n=3) measured at the end of the experiment. For a given species, different letters discriminate statistical differences between the corresponding treatments (ANOVA followed by HSD test from Tuckey, $p<0.05$).

The responses of the five species were studied at the cellular level through their antioxidant enzyme activities (Figure 9.4). Increases in SOD activity were observed in *A. vulgaris*, *H. perforatum* and *T. vulgare* grown in both NM-100% and NM-TD and in *M. arvensis* but only for NM-TD (Figure 9.4A). *C. pratensis* exhibited a rise in SOD activity when exposed to NM-TD while an inhibition was observed for NM-100%. Significant increases in CAT activity were noticed for both *C. pratensis* and *H. perforatum* and *M. arvensis* exposed to NM-TD while only *M. arvensis* presented decreases when grown on NM-100% (Figure 9.4B). No effects were detected for *A. vulgaris* and *T. vulgare*. Concerning

APX, no significant impact of the two soils were observed excepted for *C. pratensis* whom activities were increased in both cases (Figure 9.4C). Results of GPX activities exhibited the same trend for all species with decreases only for plants exposed to NM-100% (Figure 9.4D). Decreases in activity were also observed with GRD in *A. vulgaris* and *T. vulgare* exposed to both NM-100% and NM-TD (Figure 9.4E). On opposite, the GRD activity of *C. pratensis* was increased in both cases while no effects were observed for the other species. Finally, significant increases of MDA level were noticed for the two soils and all species, excepted *C. pratensis* for which significant difference were only observed when grown on NM-100% (Figure 9.4F). Moreover, the highest MDA levels were always observed for plants exposed to NM-100%.

IV-) Discussion

The present study showed that the plant mixture that established on the control soil was more complex and structured than the one present on NM-100% soil with higher values for all ecological indexes taken into account. On opposite, most ecological indexes, excepted J, found for the soil treated by thermal desorption presented values significantly higher compared to the non-treated one. Thermal desorption has been proved to decrease not only all PAH concentrations but also some heavy metal contents (Cr, Cu and Hg). However, other heavy metal concentrations exhibited non significant changes (Cd, Ni) or small increases (Pb, Zn) which may be explain by the destruction of organic matter (which results in an increase of concentrations when expressed as mg metal / g soil).

Thus, one may hypothesize i) that the decreases in pollutant concentrations would reduce the selection pressure exerted by pollution on plant development, and ii) that thermal desorption treatment generate a soil with physico-chemical properties tolerable for plants, at least during their initial life-cycle phases. Its habitat function, which was compromised by the high pollution degree, seemed to be partly restored. However, in our experiments, the life-cycles of the studied plant species were not followed in their entirety and we are not able to conclude on their ability to produce flowers and seeds, and to generate viable descendants.

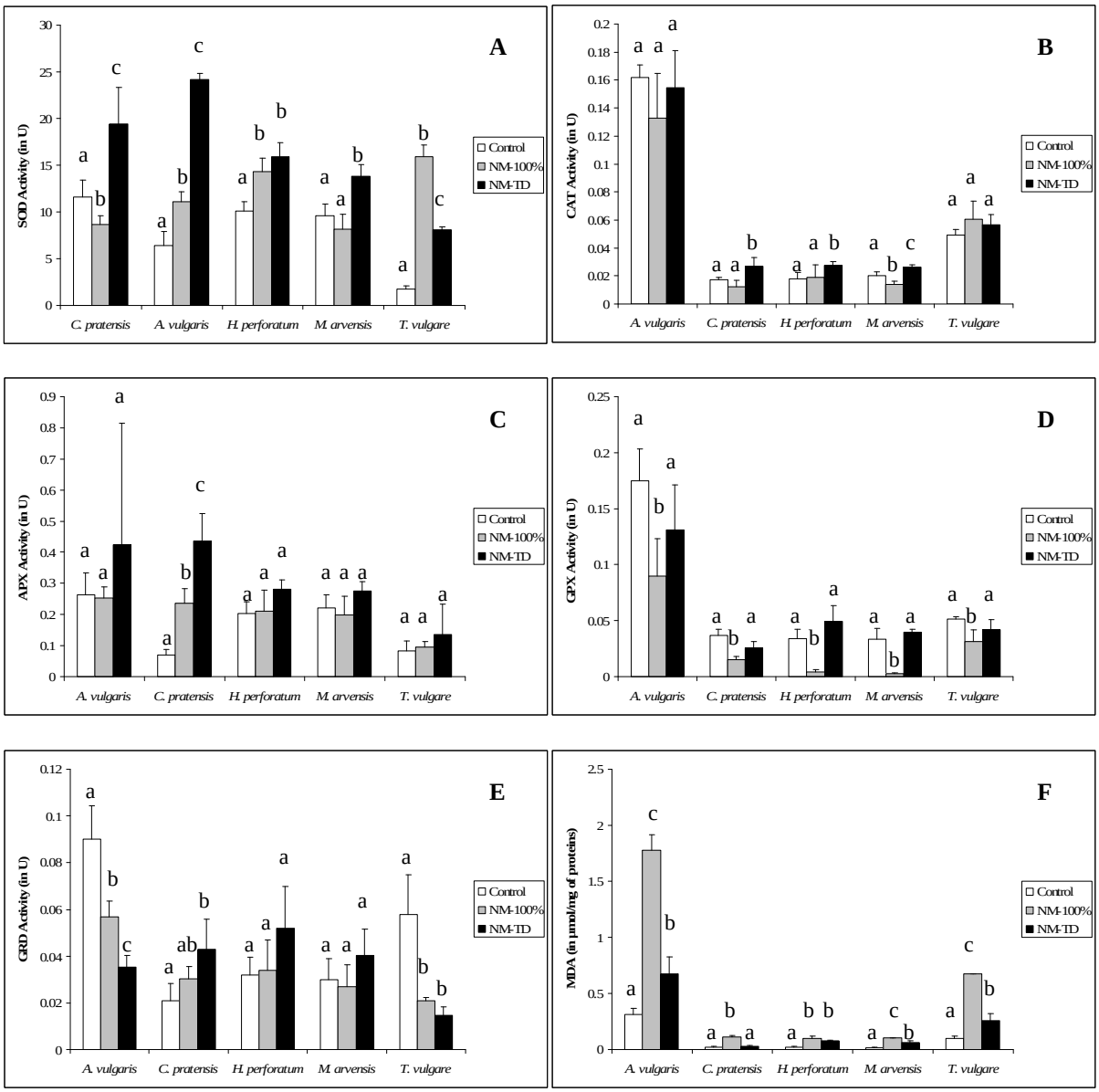


Figure 9.4. Biochemical responses in the leaves of the five species collected from the different racks. Antioxidant enzyme activities are expressed in U (µmol/min/mg of proteins) and MDA in µmol/mg of proteins. For a given species, different letters discriminate statistical differences between the corresponding treatments (Kruskal-Wallis followed by U test from Wilcoxon-Mann Whitney, $p<0.05$).

The details of plant germination rates shored up this idea, showing not only that more species were able to establish on NM-TD compared to NM-100% but also with more individuals. These results are in agreement with previous studies which described the effects of PAHs on seed emergences of red clover (Sverdrup et al., 2003), lettuce, onion and tomato (Kummerova and Kmentova, 2004). An (2006) recorded significant germination inhibitions

of *Sorghum bicolor* since 80 mg/kg Pb, while Wierzbicka and Obidzinska (1998) noticed that heavy metals delayed and lowered the ability of seeds to germinate in a dose-dependent manner for 9 out of the 15 tested species. In this study, Pb concentrations above 400 and 600 mg/kg were measured in NM-100% and NM-TD soils, respectively, suggesting heavy metals as one of the primary cause of the soil phytotoxicity.

Moreover, we can notice that the species whose germination rates did not increase in the treated soil were already presenting low rates in control conditions. This suggests that the seeds from these species were less adapted than the other ones to germinate and grow under the experimental conditions used in this study.

In parallel to effects on plant germination, soil pollution also seemed to have an impact on plant physiology. In the present study, decreases of plant heights and/or biomasses were observed for most species, excepted *M. arvensis*, when exposed to the contaminated soil while the thermal desorption treatment reduced soil phytotoxicity. In the same way, An (2006) recorded significant shoot growth inhibitions in *Cucumis sativus* exposed for 5 days to 40 and 160 mg/kg of Cu and Pb, repectively. In the same study, he observed shoot growth inhibitions of Sorghum bicolour exposed to 40 mg/kg Cu and *Triticum aestivum* exposed to 320 mg/kg Pb. In our study, soil concentrations in Cu and Pb were always above 100 and 400 mg/kg, respectively, suggesting a potential phytotoxicity of these elements. Moreover, Smith et al. (2006) observed biomass decreases in *Festuca arundinacea*, *Festuca rubra*, *Locus corniculatus*, *Trifolium pratense* and *Trifolium repens* exposed to soils contaminated with 1000 mg/kg PAHs. In the present study, PAH concentration in the NM-100% soil was closed to 1500 mg/kg, suggesting that PAHs could be partly responsible of the soil phytotoxicity. Several PAHs, such as phenanthrene, pyrene or fluoranthene, have already demonstrated a potential phytotoxicity on plant growth in *Sinapsis alba*, *Trifolium repens* or *Lolium perenne* since 37 mg/kg (Sverdrup et al., 2003). All these compounds were present in NM-100% soil at concentrations 4 to 6-fold higher than the one used in this study. However, if the effects of soil pollution on plants physiology are well documented, it was impossible to found studies dealing with the consequences of a thermal remediation-treatment on plant growth.

To understand the mechanisms involved in these plant-soils relationships, several physiological and cellular parameters were followed. First, the ratio of Fv/Fm is often used as a stress indicator and describes the intrinsic efficiency of photosystem II (PSII) photochemistry in the absence of light (Björkman and Demming, 1987). De facto, decreased

Fv/Fm ratio in plants exposed to polluted soils suggests disturbances in PSII induced in a direct or non direct manner by contaminants.

For all species, Fv/Fm ratio determined under control conditions were closed to values typically measured in healthy leaves (Björkman and Demming, 1987). The decreased Fv/Fm ratios observed in *A. vulgaris*, *H. perforatum* and *T. vulgare* indicated that leaves were not able to counteract the toxic effects of the contaminants present in both NM-100% and NM-DT soils. Previous experiments studying Cd effects on photosynthesis lead to various results as impairments of photosynthetic efficiency were found in *Chlamydomonas reinhardtii* (Faller et al., 2005) but not in *Brassica juncea* and *Brassica napus* (Gadapati and Macfie, 2006). Our results seemed to be in agreement with the study of Faller et al. (2005).

The mechanisms involved in photosynthesis inhibition under abiotic stresses have already been studied. As an example, inhibition of PSII by Cd^{2+} was attributed to its competitive binding to the essential Ca^{2+} site (Faller et al., 2005). Moreover, it has been found that the production of reactive oxygen species (ROS) was also able to directly inactivate the PSII reaction centres. Also, ROS were described to inhibit the repair process of PSII through the suppression of protein *de novo* synthesis (Murata et al., 2007). As the soils used in this study contain heavy metals, which are known to generate ROS (Prasad, 1999), it is possible to postulate that the mechanisms which impaired leave fluorescence were similar to those reported by Faller et al. (2005) and Murata et al. (2007).

The generation of ROS at the cellular level of plant leaves was suggested by the increases of most antioxidant enzyme activities when exposed to NM-TD soil and, in some case, to NM-100% soil. Indeed, the SOD/CAT couple and the ascorbate-glutathione cycle (monitored through APX and GRD) are considered for many years as the major defence systems toward ROS of peroxisomes (Mittler, 2002) and chloroplasts (Foyer and Halliwell, 1976; Noctor and Foyer, 1998), respectively.

For the five plant species, the SOD/CAT detoxification pathway was stimulated in plants exposed NM-TD soil. The same trend was observed in plants exposed to NM-100% excepted for *C. pratensis* and *M. arvensis* which exhibited weak inhibitions of these enzyme activities. Similarly, decreases in GPX activity, an enzyme located in cytosol, vacuoles, cell wall and apoplasm, were observed for all species in plants exposed to NM-100% soil. Moreover, decreases in ascorbate-glutathione cycle activity were observed in *C. pratensis* and *T. vulgare* in plants exposed to both soil. On opposite, increases of this defence system were noticed in *A. vulgaris* plants exposed to both soil while no changes were recorded for the

other species whether the exposure condition was. These results suggest a generation of ROS in the cell compartments including chloroplasts, peroxisomes, cell wall, cytosol and vacuoles.

The decreases in antioxidant enzyme activities observed in several species can be interpreted as a cytotoxicity sign due to an over-production of ROS which can not be coped efficiently by the cell and lead to oxidative stress. In these cases, ROS are able to interact with cellular components leading to severe damages including PSII inactivation but also lipid oxidation and membrane alterations as proved by decreased Fv/Fm ratios and increased MDA levels in plants exposed to NM-100% and/or NM-TD soils, respectively. Such effects were particularly observed for *A. vulgaris*, *H. perforatum* and *T. vulgare*.

The picture was different for the leaves of *C. pratensis* and *M. arvensis* for which Fv/Fm ratios remained high for plants exposed to NM-100% and NM-TD soils. Guidi and Degl'Innocenti (2008) suggested that such results may be attributed to a stimulation of antioxidant defences which afforded satisfactory protection to the photosynthetic machinery. In the present study, such phenomenon seemed to occur in *C. pratensis*. Indeed, for this species, APX was stimulated in plants exposed to contaminated soils and even more when exposed to NM-TD soil. These results suggested an activation of the chloroplastic ascorbate-glutathione cycle leading to excess ROS scavenging, and thus, to the protection of PSII. Concerning, *M. arvensis*, no significant changes in APX or GRD activities were noticed, suggesting that chloroplasts were not the primary target of environmental pollutants.

In the case of *C. pratensis*, decreases in plant height and biomass could not be imputed to the inhibition PSII activity. Interestingly, GPX, an enzyme assumed to be involved in a range of physiological processes related to plant growth and development (Ghamsari et al., 2007), exhibited decreased activity in plants exposed to NM-100% soil. Thus, its inhibition could be proposed as an explanation to the growth decreases observed not only for this species but for most of them.

Finally, if we focused on the effects of thermal desorption on the phytotoxic impact of the polluted soil, we can notice i) at the community level, a recovery of species richness, biodiversity and biomass productivity, ii) at the species level, better germination rates and restoring plant heights and biomasses, and iii) at the cellular level, less effects on PSII activity and the better ability of plant defence systems to cope and scavenge excess ROS.

V-) Conclusion

We run a plant multispecies experiment in order to assess at various biological scales the detrimental effects of a polluted soils on plants. Also, we aimed at identifying the beneficial effects of a thermal desorption treatment on the vegetation. Without treatment, the polluted soil exerted a phytotoxicity which had impacts on several species, with decreases of photosynthesis, growth and biomass, but also at the mixture level with a loss of species, biodiversity and biomass productivity. The same soil treated by thermal desorption demonstrated to have less impact at all levels, suggesting a restoration of soil habitat function.

VI-) Acknowledgments

This study has been realized within the framework of a transversal interdisciplinary project (GISFI) contributing to the resolution of pollution-related issues and designed to promote clean technologies for decontamination and treatment of industrial wastelands. This work was granted by Region Lorraine and Marc Dazy's phD thesis was supported by the French Ministry of Education and Research. Authors wish to thank Marie-Aude Liger and Elisa Gallet for skilful technical assistance.

VII-) References

An, Y.J., 2004. Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. Environ. Pollut. 127, 21-26.

An, Y.J., 2006. Assessment of comparative toxicities of lead and copper using plant assay. Chemosphere 62, 1359-1365.

Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Ann. Rev. Plant Biol. 55, 373-399.

Aravind, P., Prasad, M.N.V., 2005. Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism. Plant Physiol. Bioch. 43, 107-116.

Biederman, L.A., Boutton, T.W., Whisenant, S.G., 2008. Nematode community development early in ecological restoration: the role of organic amendments. Soil Biol. Biochem. 40, 2366-2374.

Björkman, O., Demming, B., 1987. Photon yield of O_2 evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K amongst plants of diverse origins. Planta 170, 489-504.

Bleeker, P.M., Assuncao, A.G.L., Teiga, P.M., de Koe, T., Verkleij, J.A.C., 2002. Revegetation of the acidic, As contaminated Jales mine spoil tips using a combination of spoil amendments and tolerant grasses. Sci. Total Environ. 200, 1-13.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

BRGM, 2001. Guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués. BRGM (Ed.), Orléans, France.

Calace, N., Campisi, T., Iacondini, A., Leoni, M., Petronio, B.M., Pietroletti, M., 2005. Metal-contaminated soil remediation by means of paper mill sludges addition : cjemical and ecotoxicological evaluation. Environ. Pollut. 136, 485-492.

Chang, T.C., Yen, J.H., 2006. On-site mercury-contaminated soils remediation by using thermal desorption technology. J. Hazard. Mater. 128, 208-217.

Clemente, R., Walker, D.J., Bernal, M.P., 2005. Uptake of heavy metals and As by *Brassica juncea* grown in a contaminated soil in Aznalcollar (Spain): the effect of soil amendments. Environ. Pollut. 138, 46-58.

Da Rosa Correa, A.X., Rorig, L.R., Verdinelli, M.A., Cotelle, S., Férard, J.F., Radetski, C.M. 2006. Cadmium phytotoxicity: Quantitative sensitivity relationships between classical endpoints and antioxidative enzyme biomarkers. Sci. Tot. Environ. 357, 120-127.

Dazy, M., Jung, V., Férard, J.F., Masfaraud J.F., 2008. Ecological recovery of vegetation on a coke-factory soil: role of plant antioxidant enzymes and possible implications in site restoration. Chemosphere. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.09.014

Dudka, S., Adriano, D., 1997. Environmental impacts of ore mining and processing: a review. J. Environ. Qual. 26, 590-602.

Epelde, L., Becerril, J.M., Hernandez-Allica, J., Barrutia, O., Garbisu, C., 2008. Functional diversity as indicator of the recovery of soil health derived from *Thlaspi caerulescens* growth and metal phytoextraction. Appl. Soil Ecol. 39, 299-310.

Fabbri, D., Bianco Prevot, A., Zelano, V., Ginepro, M., Pramauro, E., 2008. Removal and degradation of aromatic compounds from a highly polluted site by coupling soil washing with photocatalysis. Chemosphere 71, 59-65.

Faller, P., Kienzler, K., Krieger-Liszkay, A., 2005. Mechanism of Cd^{2+} toxicity, Cd^{2+} inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential Ca^{2+} site. Biochim. Biophys. Acta 1706, 158-164.

Fernandez-Luqueno, F., Marsch, R., Espinosa-Victoria, D., Thalasso, F., Hidalgo Lara, M.E., Munive, A., Luna-Guido, M.L., Dendooven, L., 2008. Remediation of PAHs in a saline-alkaline soil amended with wastewater sludge and the effect on dynamics of C and N. Sci. Tot. Environ. 402, 18-28.

Ferrarese, E., Andreottola, G., Oprea, I.A., 2008. Remediation of PAH-contaminated sediments by chemical oxidation. J. Hazard. Mater. 152, 128-139.

Fischerova, Z., Tlustos, P., Szakova, J., Sichorova, K., 2006. A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. Environ. Pollut. 144, 93-100.

Flores, R., Blass, G., Dominguez, V., 2007. Soil remediation by an advanced oxidative method assisted with ultrasonic energy. J. Hazard. Mater. 140, 399-402.

Foyer, C.H., Halliwell, B., 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta 133, 21-25.

Friesl, W., Friedl, J., Platzer, K., Horak, O., Gerzabek, M.H., 2006. Remediation of contaminated agricultural soils near a former Pb/Zn smelter in Austria: batch, pot and field experiments. Environ. Pollut. 144, 40-50.

Gadapati, W.R., Macfie, S.M., 2006. Phytochelatins are only partially correlated with Cd-stress in two species of *Brassica*. Plant Sci. 170**,** 471-480.

Gadepalle, V.P., Ouki, S.K., Van Herwijnen, R., Hutchings, T., 2008. Effects of amended compost on mobility and uptake of arsenic by rye grass in contaminated soil. Chemosphere 72, 1056-1061.

Geissen, V., Gomez-Rivera, P., Lwanga, E.H., Mendoza, R.B., Narcias, A.T., Marcias, E.B., 2008. Using earthworms to test the efficiency of remediation of oil-polluted soil in tropical Mexico. Ecotoxicol. Environ. Saf. 71, 638-642.

Ghamsari, L., Keyhani, E., Golkhoo, S., 2007. Kinetics properties of Guaiacol Peroxidase activity in *Crocus sativus* L. corm during rooting. Iran. Biomed. J. 11, 137-146.

Gong, Z., Alef, K., Wilke, B.M., Mai, M., Li, P., 2005. Assessment of microbial respiratory activity of a manufactured gas plant soil after remediation using sunflower oil. J. Hazard. Mater. 124, 217-223.

Gray, C.W., Dunham, S.J., Dennis, P.G., Zhao, F.J., McGrath, S.P., 2006. Field evaluation of a heavy metal contaminated soil using lime and red-mud. Environ. Pollut. 142, 530-539.

Guidi, L., Degl'Innocenti, E., 2008. Ozone effects on light-induced photoinhibition in *Phaseolus vulgaris*. Plant Sci. 174, 590-596.

Gunn, J.M., 1995. Restoration and Recovery of an Industrial Region. Springer, New-York, NY.

Juwarkar, A.A., Nair, A., Dubey, K.V., Singh, S.K., Devota, S., 2007. Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils. Chemosphere 68, 1996-2002.

Keskin, S., Akman, U., Hortaçsu, O., 2008. Soil remediation via ionic liquid and supercritical CO_2. Chem. Eng. Process. 47, 1693-1704.

Kimbrough, D.E., Cohen, Y., Winer, A.M., Creelman, L., Mabuni, C., 1999. A critical assessment of chromium in the environment. Crit. Rev. Env. Sci. Tec. 29, 1-46.

Kummerova, M., Kmentova, E., 2004. Photoinduced toxicity of fluoranthene on germination and early development of plant seedling. Chemosphere 56, 387-393.

Lee, J.K., Park, D., Kim, B.U., Dong, J.I., Lee, S., 1998. Remediation of petroleum-contaminated soils by fluidized thermal desorption. Waste Manage. 18, 503-507.

Lestan, D., Luo, C.L., Li, X.D., 2008. The use of chelating agents in the remediation of metal-contaminated soils: a review. Environ. Pollut. 153, 3-13.

Maliszewska-Kordybach, B., Smreczak, B., 2003. Habitat function o agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. Environ. Int. 28, 719-728.

Merino, J., Bucala, V., 2007. Effect of temperature on the release of hexadecane from soil by thermal treatment. J. Hazard. Mater. 143, 455-461.

Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci. 7, 405-410.

Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y., Allakhverdiev, A.I., 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. Biochim. Biophys. Acta 1767, 414-421.

Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49, 249-279.

O'Mahony, M.M., Dobson, A.D.W., Barnes, J.D., Singleton, I., 2006. The use of ozone in the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil. Chemosphere 63, 307-314.

Pastor, J., Aparicio, A.M., Gutierrez-Maroto, A., Hernandez, A.J., 2007. Effects of two chelating agents (EDTA and DTPA) on the autochtonous vegetation of a soil polluted with Cu, Zn and Cd. Sci. Tot. Environ. 378, 114-118.

Pielou, E.C., 1966. Shannon's formula as a measure of species diversity: its use and misuse.

Am. Nat. 100, 463-465.

Prasad, M.N.V., 1999. Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany.

Rienks, J., 1998. Comparison of results for chemical and thermal treatment of contaminated dredged sediments. Water Sci. Technol. 37, 355-362.

Shannon, C.E., Weaver, W., 1963. The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana, USA.

Shao, Y., Zhang, W., Shen, J., Zhou, L., Xia, H., Shu, W., Ferris, H., Fu, S., 2008. Nematodes as indicators of soil recovery in tailings of a lead/zinc mine. Soil Biol. Biochem. 40, 2040-2046.

Smirnoff, N., 1998. Plant resistance to environmental stress. Curr. Opin. Biotechnol. 9, 214-219.

Smith, M.J., Flowers, T.H., Duncan, H.J., Alder, J., 2006. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues. Environ. Pollut. 141, 519-525.

Sverdrup, L.E., Krogh, P.H., Nielsen, T., Kjaer, C., Stenersen, J., 2003. Toxicity of eight polycyclic aromatic compounds to red clover (*Trifolium pratense*), ryegrass (*Lolium perenne*), and mustard (*Sinapsis alba*). Chemosphere 53, 993-1003.

Unyayar, S., Celik, A., Cekic, F.O., Gozel, A., 2006. Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. Mutagenesis 21, 77-81.

Van Herwijnen, R., Hutchings, T.R., Al-Tabbaa, A., Moffat, A.J., Johns, M.L., Ouki, S.K., 2007. Remediation of metal contaminated soil with mineral-amended composts. Environ. Pollut. 150, 347-354.

Vangronsveld, J., Colpaer, J.V., Van Tichelen, K.K., 1996. Reclamation of bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: physiochemical and biological evaluation of the durability of soil treatment and revegetation. Environ. Pollut. 94, 131-140.

Vazquez, M.D., Poschenrieder, C., Barcelo, J., 1987. Chromium VI induced structural and ultrastructural changes in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). Ann. Bot. 59, 427-438.

Venditti, D., Durécu, S., Berthelin, J., 2000. A multidisciplinary approach to assess history, environmental risks and remediation feasability of soils contaminated by metallurgical activities. Part A: chemical and physical properties of metals and leaching ability. Arch. Environ. Con. Tox. 38, 411-420.

Wierzbicka, M., Obidzinska, J., 1998. The effect of lead on seed imbibition and germination in different plant species. Plant Sci. 137, 155-171.

4ème PARTIE :
DISCUSSION & CONCLUSION

CHAPITRE 10.

DISCUSSION GENERALE

L'objectif principal de cette thèse était de comprendre le processus de reconquête par les plantes de sols multi-contaminés. Les différentes études menées dans le cadre de cette thèse auront ainsi permis de caractériser un début de succession végétale sur sol industriel en s'intéressant tout particulièrement à la composition et la structure des communautés végétales présentes à chaque sère, mais aussi de comprendre quels étaient les mécanismes d'action toxique des polluants et les réponses induites au niveau des organismes. La possible utilisation de certains de nos résultats en écotoxicologie appliquée sera également discutée.

I-) Processus de colonisation végétale d'un sol contaminé

Le premier objectif de notre étude était de caractériser une succession végétale sur sol contaminé en s'intéressant tout particulièrement aux premiers stades de colonisation. Pour ce faire, un suivi de végétation a été réalisé durant plus de deux ans sur des parcelles contenant un sol industriel et des analyses des banques de graines de ce même sol sont venues compléter ces résultats.

I-1-) Influence des banques et pluies de graines sur la composition floristique

Lors de la première année d'étude sur le site du GISFI, nous avons cherché à savoir quels éléments permettaient l'initiation du processus de colonisation d'un sol par les plantes. Selon Fredrickson et Taylor (1982), les banques de semences des sols joueraient un rôle très important dans ce phénomène mais divers auteurs (Leck *et al*., 1989 ; Millberg, 1992 ; Peco *et al.*, 1998) ont tout de même souligné le faible degré de similitude entre banques de graines et communautés végétales observées sur un même site.

Lors de la première période d'échantillonnage (Automne 2005), 8 espèces ont été trouvées dans la banque de graine, alors qu'une seule était observée au sein du couvert végétal (*Chenopodium album*). L'indice de similitude n'était alors que de 25 ± 5 %. Ce résultat se rapproche de ceux décrits par Leck *et al*. (1989) ou Millberg (1992). Par contre, lors de la seconde campagne (Printemps 2006), soit après environ un an de colonisation spontanée, 13 des 22 espèces de la banque de graines étaient observées au sein de la communauté ; l'indice de similitude étant alors de 65 ± 8 % témoignant d'un rôle important des banques de semences sur les compositions floristiques obtenues en surface, ce qui est en accord avec les résultats de Fredrickson et Taylor (1982).

Par ailleurs, en comparant les banques de graines des deux campagnes, il est possible de noter l'arrivée de 14 espèces pendant la période hivernale. Il s'agit de migrants issus « des pluies de graines » (déposées par la pluie, le vent, les insectes…) dont le rôle au sein du processus de colonisation n'est donc pas à négliger. Néanmoins, sur ces 14 espèces, seules 7 ont été capables de s'établir.

D'une manière générale, seule une partie des espèces issues des banques et pluies de graines ont été capables de coloniser le sol contaminé de nos parcelles. Thompson et Grime (1979) soulignaient déjà ce phénomène en mettant en cause la faible longévité des graines de certaines espèces dans les sols et l'influence des conditions du milieu sur leur germination et sur le développement des plantes. La phytotoxicité de sols contaminés sur la germination des graines a déjà fait l'objet de nombreuses études (Brun *et al*., 2003; Ryser et Sauder, 2006; Ahsan *et al*., 2007; Gianazza *et al*., 2007) et il ne serait donc pas étonnant que ce facteur ait conditionné pour partie l'établissement des espèces sur les parcelles d'Homecourt. Toutefois, notre suivi des parcelles n'a pas été suffisamment fin pour savoir s'il s'agit d'effet sur la germination ou plutôt d'une toxicité vis-à-vis des plantules. Des expérimentations, relativement simples, dans leur principe au moins, pourraient être conduite en laboratoire pour répondre à cette interrogation.

Globalement, ces résultats tendent à prouver que les banques et pluies de graines jouent un rôle non négligeable dans le processus de recolonisation des milieux par les plantes. Klimesova et Klimes (2007) soulignent également le rôle important de la régénération végétative dans ce processus. Ce phénomène n'a pas été étudié dans le cadre de cette thèse mais mériterait que l'on s'y attarde lors de prochaines expérimentations. Le rôle de la régénération végétative pourrait être évalué *in situ* selon la méthode de Cornelissen *et al.* (2003) ou *ex-situ* selon la méthode de Lee (2004).

I-2-) Influence de la pollution sur le processus séquentiel de colonisation

Les communautés végétales de huit parcelles, quatre contenant le sol contaminé de Neuves-Maisons et quatre contenant un sol témoin, ont été suivies sur plus de deux ans. Après un an de colonisation (Eté 2006), des différences notables sont apparues entre les deux conditions. Les communautés végétales des parcelles témoins comportaient en moyenne 35 espèces et 16 familles végétales tandis que celles des parcelles contaminées ne présentaient que 15 espèces et 8 familles. Des différences entre ces deux conditions étaient également

notables en tenant compte des indices écologiques les plus fréquemment utilisés, la diversité de Shannon-Weaver (H'= 2,98 en zone témoin contre 1,32 en zone polluée) et l'équitabilité de Piélou (J= 0,58 en zone témoin et 0,33 en zone contaminée).

Après deux ans de colonisation (Eté 2007), les différences étaient moins nettes, les deux communautés tendant à se ressembler tant en terme de composition que de structure. Ainsi, les parcelles témoins présentaient toujours une plus grande richesse spécifique que celles contaminées (24 espèces contre 16) mais les deux zones comportaient le même nombre de familles (16 en zone témoin contre 17 en zone polluée). De même, si la diversité était toujours en faveur de la zone témoin (3,53 contre 3,06), les parcelles des deux conditions présentaient une équitabilité proche de 0,77.

Les mêmes tendances sont observées au niveau de la composition floristique. Après un an de colonisation, les parcelles témoins étaient dominées par les *Poacées* (26,9%) et les *Astéracées* (25,8%). Les *Rosacées* (8,6%), *Scrophulariacées* (6,5%) et *Boraginacées* (5,4%) représentaient également une part non négligeable des communautés. Les parcelles contaminées, elles, étaient dominées par les *Chénopodiacées* (31,6%), les *Astéracées* (31,6%) et les *Poacées* (23,7%). Les *Rosacées*, *Scrophulariacées* et *Boraginacées* ont donc laissé place aux *Chénopodiacées* dans ces parcelles.

Ces différences ne peuvent cependant pas être imputées exclusivement à une action toxique des polluants contenus dans les parcelles contaminées. Les légères différences de granulométrie, de pH et de rapport C/N entre les deux sols, mais aussi au niveau des banques de graines de ces sols peuvent également influencer ces résultats.

Après deux ans de colonisation, les parcelles des deux conditions sont dominées par les *Astéracées*, les *Poacées* et les *Fabacées* mais en proportions différentes. Les *Astéracées* représentaient 44,9% des plantes des parcelles témoins contre 34,6% des parcelles contaminées, les *Fabacées* 23,6% contre 4,8% et les *Poacées* 10,1% contre 45,2%. Il faut toutefois noter que cette forte proportion de *Poacées* dans les parcelles contaminées est dû, en partie, à un biais expérimental (semis d'un mélange *Lolium perenne*/*Festuca rubra* aux abords des parcelles contaminées). On peut donc supposer que sans ce biais, les Astéracées auraient été dominantes dans les deux conditions et que les proportions de *Poacées* auraient été plus ou moins proches.

Cependant, malgré ce biais expérimental, nos observations au niveau des parcelles contaminées sont en totale adéquation avec le schéma de succession végétale en milieu tempéré proposé par Bazzaz (1996) comme indiqué sur la figure 10.1. Le premier stade est

totalement dominé par *Chenopodium album* qui reste une des espèces majeures du deuxième stade qui voit la prolifération *d'Erigeron annuus* et *E. canadensis*. Enfin, après deux ans de colonisation, on observe une colonisation du milieu par l'espèce clonale *Solidago canadensis*.

D'une manière générale, il est possible de distinguer des différences de composition et de structure des communautés végétales poussant sur des milieux témoins et pollués. Néanmoins, ces différences semblent s'atténuer au fur et à mesure de la succession et n'entraînent aucune déviation par rapport au processus séquentiel général décrit dans la littérature.

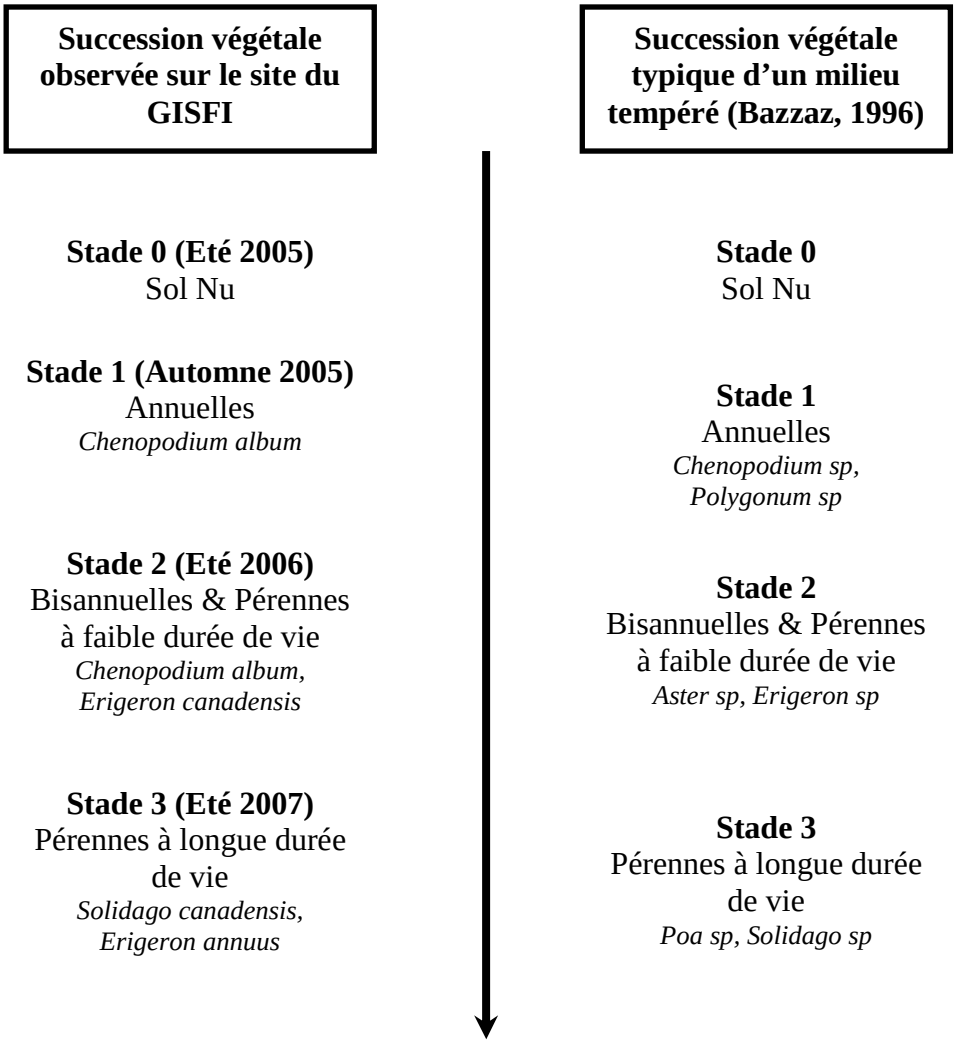


Figure 10.1. Comparaison des premiers stades de colonisation végétale d'un sol industriel au schéma classique de succession végétale en milieu ouvert de zone tempérée défini par Bazzaz (1996)

Par ailleurs, les compositions floristiques observées dans nos parcelles se rapprochent des observations réalisées sur différents sites pollués par Henner *et al*. (1999), Remon *et al*. (2005) ou Conesa *et al*. (2007). En effet, comme dans ces études, nos relevés de végétation mettent en évidence l'absence de métallophytes au sein des communautés dominées par les adventices et plantes de bords de chemins. La charge en éléments métalliques ne semble donc pas suffisamment importante pour discriminer les espèces et favoriser l'établissement de plantes métallicoles comme dans le cas du site métallifère décrit par Shallari *et al*. (1998).

I-3-) Possibles conséquences de la pollution sur la succession à moyen et long terme

Pour évaluer les possibles conséquences de la contamination sur la succession végétale à moyen et long terme, nous avons récolté, à la fin de la campagne 2007 des graines de plusieurs espèces (provenant des parcelles témoins et contaminées) que nous avons utilisées pour des expérimentations en laboratoire visant à déterminer si leur pouvoir germinatif pouvait être affecté par le milieu de vie (témoin ou contaminé) des individus parents. (Chapitre 7). Globalement, trois tendances ont pu être dégagées de ces expériences :

(i) dans le cas d'*Agrostis capillaris* : les graines, quelle que soit leur provenance, germent normalement à la fois sur sol témoin et contaminé, suggérant des effets à moyen et long terme négligeables.

(ii) dans le cas d'*Oenothera biennis* et *Erigeron canadensis* : les graines présentent de forts taux de germination sur sol témoin mais des inhibitions de germination sont observées sur sol contaminé et sont accompagnées de pertes de biomasse. De plus, pour ces espèces, les graines issues de plantes des parcelles polluées semblent moins affectées que les graines issues de plantes des parcelles témoins, ce qui suggère le développement d'un résistance/tolérance des premières à la pollution. Ces phénomènes d'adaptation au sein de populations exposées ont déjà été observés par divers auteurs (Wu *et al*., 1975 ; Brej, 1998 ; Schat *et al*., 2002). Dans ce cas, non seulement les populations risquent d'être perturbées à moyen et long terme mais les graines autochtones (issues des banques) semblant plus aptes à engendrer des plantes viables par rapport aux graines allochtones (déposées par les pluies de graines), une perte de diversité génétique paraît également inéluctable à long terme. On peut identifier ici un processus de sélection de variants selon l'origine des parents et le milieu d'exposition.

(iii) dans le cas de *Matricaria recutita* : les graines issues de plantes des parcelles contaminées germent moins que les graines issues des plantes des parcelles témoins, quel que soit le sol de destination. De plus, les individus issus de ces graines présentent des biomasses plus faibles que leurs homologues. Ces résultats suggèrent en premier lieu une possible stérilité des graines issues des plantes exposées, phénomène déjà observé par Brun *et al*. (2003) chez *Poa annua* et *Senecio vulgaris* exposés au cuivre, qui pourrait entraîner, à long terme, la disparition de l'espèce dans les parcelles contaminées.

Cependant, nos conditions expérimentales ne nous ont pas permis de boucler les cycles de vie des espèces étudiées. Nous n'avons donc pas pu connaître les masses de graines produites par individu ainsi que la viabilité et le pouvoir germinatif de celles-ci. En effet, une espèce peut fournir des graines à pouvoir germinatif inchangé, mais en moins grand nombre et, inversement, peut donner des graines ayant un pouvoir germinatif affaibli mais en plus grand nombre. Des effets à plus long terme ne peuvent donc pas être exclus.

II-) Implication des systèmes de défense cellulaire

Les organismes exposés au sol contaminé aux HAPs et métaux lourds présentaient divers symptômes suggérant une phytotoxicité des polluants : perte de biomasse, inhibition de la croissance (taille), observations de feuilles tordues, de flétrissements fréquents, de chloroses foliaires (chez certaines espèces), et plus grande sensibilité à la dessiccation… La plupart de ces symptômes ont déjà été répertoriés par Toppi et Gabbrielli (1999) et imputés aux métaux lourds. Les faibles établissements observés chez plusieurs espèces pourraient également être expliqués par la phytotoxicité des éléments métalliques (Brune *et al*., 1994 ; An, 2004 ; An, 2006 ; Da Rosa Correa *et al*., 2006). Ces résultats suggèrent une faible valence écologique (vis-à-vis des métaux, mais aussi de l'action combinée d'autres facteurs comme la sécheresse) des espèces concernées.

Néanmoins, toutes les espèces ne présentent pas de tels symptômes et certaines profitent même de la faible compétitivité des autres espèces pour développer une stratégie de « gain d'espace » (augmentation de la taille, modifications morphologiques) comme *Matricaria recutita*. La capacité de tolérance de ces espèces pourrait être expliquée, en partie au moins, par la mise en place de mécanismes de défense et de détoxication tels que la synthèse de phytochélatines ou le recours aux enzymes antioxydantes.

II-1-) Production de phytochélatines

Toutes les espèces végétales étudiées sur le site d'Homécourt présentaient des concentrations élevées en phytochélatines au niveau de leurs feuilles. De plus, ces concentrations augmentaient avec les teneurs en métaux dans les sols. Cette relation a déjà été démontrée par Xiang et Oliver (1998) ainsi que Béraud *et al*. (2007) chez *Arabidopsis thalliana* et *Vicia faba* respectivement, suite à une exposition au cadmium, et confirme l'idée d'une synthèse de PC initiée par l'entrée d'ions métalliques dans les cellules (Grill *et al*., 1987).

Néanmoins le degré d'implication des PC dans le phénomène de tolérance aux métaux lourds est difficile à établir. En effet, selon nos résultats, l'espèce produisant le moins de PC (*Euphorbia cyparissias*) était aussi l'espèce la plus sensible à la pollution mais, d'autre part, pour les autres espèces, aucune relation entre la concentration foliaire en PC et leur capacité à proliférer n'a été observée. Il semblerait donc, *a priori*, que les PC constituent un système de détoxication majeur chez certaines espèces (comme *E. cyparissias*) alors que leur implication dans la tolérance aux métaux lourds ne serait que secondaire chez d'autres plantes (comme *Bromus tectorum* ou *Hypericum perforatum*). Cette implication plus ou moins élevée des PC dans la tolérance des plantes aux métaux lourds est discutée depuis longtemps par de nombreux auteurs (Gupta et Goldsbrough, 1991; Schat et Kalff, 1992 ; Howden *et al*., 1995 ; Ernst *et al*., 2000 ; Schat *et al*., 2002 ; Sun *et al*., 2007 ; Ernst *et al*., 2008). Il en ressort que la tolérance constitutive dépendrait en grande partie de la capacité de la plante à synthétiser des PC tandis que leur implication dans la tolérance adaptative (chez les plantes hypertolérantes) serait limitée.

Concernant les espèces que nous avons observées sur le site, nos conclusions pourraient être infirmées ou confirmées par le recours à l'expérimentation. Par exemple, ces espèces pourraient être cultivées en milieux hydroponiques contaminés en métaux lourds en présence de L-buthionine-[S,R]-sulphoximine (BSO), un inhibiteur de la synthèse de PC, via la γ-glutamylcysteine synthétase (Schat *et al*., 2002). En mesurant des paramètres témoignant de l'état de santé de la plante (taille, biomasse…), il serait alors possible de déterminer la capacité (ou non) pour les plantes dépourvues de PC de se développer en milieu contaminé aux métaux lourds. Le même type d'expérience a également été mené sur des cultures cellulaires de carottes en utilisant le taux de MDA comme indicateur de l'intégrité cellulaire (Di Toppi *et al*., 1998).

II-2-) Stress oxydant et cytotoxicité

Les hausses d'activités antioxydantes observées chez les plantes se développant sur un sol contaminé témoignent d'une production excessive d'ERO nécessitant la mise en place de mécanismes de contrôle de leur concentration foliaire (Inzé et Van Montagu, 1995) : i) la voie de la SOD/CAT au niveau des chloroplastes et des peroxysomes (Mittler, 2002) et ii) le cycle ascorbate-glutathion (APX/GRD) au niveau des mitochondries (Noctor et Foyer, 1998).

La surproduction d'ERO proviendrait du dérèglement de différents mécanismes biochimiques dû à l'interaction des métaux avec certains composants cellulaires (Prasad, 1999). Lorsque ces interactions sont peu importantes, les ERO en excès peuvent être éliminées par action des enzymes antioxydantes (Inzé et Van Montagu, 1995). Par contre, lorsqu'elles sont trop importantes, les enzymes n'arrivent plus à assurer correctement la détoxication des ERO qui vont pouvoir interagir avec les composantes cellulaires et générer une situation de stress oxydant (Mittler, 2002).

Ainsi, les diminutions d'activités (par rapport aux témoins) observées chez les plantes exposées aux plus fortes concentrations en polluants témoignent d'un phénomène de cytotoxicité. Il nous est néanmoins impossible de savoir si ces inhibitions sont dues à des interactions des métaux avec les sites actifs des enzymes ou d'une moindre production de ces enzymes par inhibition de l'expression des gènes codants leurs sous unités, ou encore d'un mécanisme plus général. Seules des expériences complémentaires de biologie moléculaire pourraient nous apporter cette information. Néanmoins, l'inhibition du cycle ascorbate-glutathion indiquerait une incapacité des systèmes de défense à détoxiquer les fortes quantités d'ERO produites au niveau des mitochondries (Noctor et Foyer, 1998). Par ailleurs, il a été suggéré par Ghamsari *et al.* (2007) que l'inhibition de la GPX, une enzyme située au niveau du cytosol, de l'apoplasme et des parois, pourrait s'expliquer par une multiplication des interactions radicalaires hors des organites cellulaires. Ces résultats expliqueraient, en partie au moins, la hausse de peroxydation lipidique (MDA) observée dans de telles conditions (Dietz *et al.*, 1999). Cette peroxidation lipidique témoigne d'altérations au niveau des membranes plasmiques et mitochondriales et génère de nouveaux composés pouvant conduire à i) des altérations structurelles des organites cellulaires et ii) des perturbations de mécanismes biochimiques et/ou moléculaires comme la photosynthèse, le métabolisme des sucres et acides gras, mais aussi de la respiration mitochondriale (Prasad, 1999).

Ainsi, le dérèglement du PSII (observé dans nos études via la diminution du rapport Fv/Fm) et la baisse d'activité photosynthétique l'accompagnant (Björkman et Demming, 1987 ; Murata *et al*., 2007) pourrait expliquer, en partie au moins, les baisses de croissance observées chez ces mêmes organismes. Une autre explication à ces baisses de croissance serait les inhibitions de la GPX observées chez les plantes exposées aux plus fortes concentrations en polluants. La GPX est en effet connue pour intervenir dans divers processus physiologiques liés au développement comme l'élongation ou la différenciation cellulaire (De Marco *et al*., 1999 ; Liszkay *et al*., 2004).

Notons toutefois que l'ensemble de cette discussion est basée sur nos observations au niveau des feuilles et qu'il serait particulièrement intéressant d'étudier, dans de futures expérimentations, les stratégies de détoxication mises en place par les plantes et les mécanismes d'action toxique des polluants au niveau racinaire.

Par ailleurs, les résultats de ces expérimentations ont permis, à plusieurs reprises d'effectuer un changement d'échelle i) en effectuant une analyse intégrée de différents marqueurs individuels (croissance, activité photosynthétique…) et sub-individuels (stress oxydant, dommages lipidiques…) de certaines espèces végétales afin d'expliciter les liens pouvant exister entre ces deux types d'effets, ii) en identifiant des paramètres clefs dans la vulnérabilité des populations à la contamination. Le but final était d'extrapoler les caractéristiques populationnelles et/ou communautaires à partir des valeurs des diverses caractéristiques des cycles de vie de certaines espèces en proposant une lecture au niveau populationnel et/ou communautaire des effets toxiques individuels.

Ainsi les baisses de croissances observées chez certaines espèces ont pu être expliquées en partie par la perturbation de la photosynthèse (en en particulier du PSII) tandis que la perte de richesse et de diversité au niveau communautaire a pu être liée, en partie au moins, à la phytotoxicité germinative des éléments métalliques.

Ces changements d'échelles ne sont pas si fréquents dans la littérature. En fait, seules les relations entre marqueurs sub-individuels et individuels ont fait l'objet de quelques publications récentes (Da Rosa Correa *et al*., 2006 ; Fusconi *et al*., 2007 ; Guo *et al*., 2007 ; Sinha *et al*., 2007). Les relations entre marqueurs individuels et populationnels ou communautaires n'ont été, quant à elles, que très peu étudiées (Andreucci *et al*., 2006 ; Pastor *et al*., 2007). Cette faible documentation peut être expliquée par les difficultés liées à ce changement d'échelle : i) trouver les bons marqueurs individuels (croissance, émergence, établissement, production de graines, viabilité des semences…), ii) trouver les marqueurs

populationnels ou communautaires adéquats (richesse, diversité, proportion de couvert végétal, abondance, dynamique de population…), iii) disposer de conditions expérimentales permettant d'accumuler suffisamment de données pour réaliser des analyses statistiques pertinentes (conditions de culture appropriées pour boucler les cycles de vie des espèces, réplicats, nombre élevé de stations d'échantillonnage,…). Bon nombre de ces difficultés ont d'ailleurs été rencontrées lors de nos expérimentations, comme signalé précédemment.

III-) Perspectives pratiques : possibles applications en écotoxicologie appliquée

Nos observations de terrain nous ont permis d'identifier des plantes présentant différents degrés de sensibilité/tolérance aux polluants contenus dans des sols multicontaminés. De fait, il est possible d'envisager l'utilisation de ces espèces pour i) évaluer des risques environnementaux (pour les plus sensibles) et améliorer les tests écotoxicologiques préconisés à l'heure actuelle et ii) améliorer les techniques de remédiation de sols pollués (pour les espèces les plus tolérantes).

III-1-) Amélioration des tests écotoxicologiques normalisés

Assez couramment utilisée à des fins de recherches ou d'études d'impact, la biosurveillance végétale reste encore trop peu employée en tant qu'outil de caractérisation ou de suivi de la qualité de l'environnement par les réseaux de mesure. En effet, malgré un marché économique viable pour la biosurveillance, plusieurs freins à son développement ont été identifiés: la législation, l'information et la normalisation des méthodes (Garrec et Van Haluwyn, 2002). En France, plusieurs normes ont pu être établies pour mieux caractériser i) la qualité des eaux de surface, via l'inhibition de croissance des algues vertes (NF EN ISO 8692) et ii) la qualité d'un sol, via l'évaluation de sa génotoxicité sur *Vicia faba* (NF T90-327) ou de sa phytotoxicité sur la germination (NF X31-201) et la croissance (NF X31-202) de divers végétaux supérieurs à choisir parmi: i) pour les monocotylédones : l'avoine (*Avena sativa*), le blé (*Triticum aestivum*), le maïs (*Zea mays*), l'orge (*Hordeum vulgare*), le riz (*Oriza sativa*) ou le sorgho (*Sorghum bicolor*) ; ii) pour les dicotylédones : le chou chinois (*Brassica campestris*), le colza (*Brassica napus*), le haricot (*Phaseolus aureus*), la laitue (*Lactuca*

sativa), la moutarde blanche (*Sinapsis alba*), le navet (*Brassica rapa*), le radis (*Raphanus sativus*) ou la tomate (*Lycopersicon esculentum*).

Le problème principal de ces tests est que toutes les espèces recommandées sont des plantes d'intérêt agronomique qui ne sont pas naturellement retrouvées dans les milieux ouverts. Ainsi les normes sont adaptées à l'évaluation des risques pour les cultures (effets néfastes de substances sur les productions agricoles, aptitude d'un sol à produire de la biomasse végétale) mais pas à l'évaluation de l'aptitude d'un sol/d'une substance à réduire la biodiversité des milieux naturels. Nous proposons donc d'utiliser d'autres espèces, caractéristiques de ces milieux, pour compléter les tests décrits dans ces normes.

Les expérimentations menées dans le cadre de cette thèse ont permis d'identifier diverses espèces et familles végétales caractéristiques de prairies méso- et/ou xérophiles. Des tests d'écotoxicité classiques ont alors été réalisés en laboratoire avec plusieurs espèces (dont les graines sont disponibles dans le commerce) exposées à différentes concentrations en cadmium.

Les résultats obtenus présentaient une certaine hétérogénéité : la germination de l'armoise (*Artemisia vulgaris*) présentant 50% d'inhibition (CI_{50}) dès 160 mg Cd/kg tandis que le bouillon blanc (*Verbascum thapsus*) et le trèfle (*Trifolium repens*) ne présentaient de tels effets qu'à partir de 2000 mg Cd/kg environ. Ces valeurs sont comparables aux CI_{50} de la laitue (150 mg Cd/kg) et du chou chinois (3200 mg Cd/kg) observées par Da Rosa Correa *et al*. (2006). D'autres espèces comme le muflier (*Antirrhinum majus*) ou le millepertuis (*Hypericum perforatum*) présentaient des sensibilités intermédiaires avec des CI_{50} aux alentours de 300-350 mg Cd/kg, se rapprochant ainsi de la CI_{50} obtenue chez l'avoine (400 mg Cd/kg) par An (2004).

Néanmoins, si l'on tient compte des données relatives à la croissance, l'ensemble de nos CI_{50} sont supérieures à celles de la littérature (à l'exception de la CI_{50} du chou chinois – 1100 mg Cd/kg, Da Rosa Correa *et al*., 2006) qui sont toutes comprises aux alentours de 60-120 mg Cd/kg (An, 2004 ; Da Rosa Correa *et al*., 2006). Dans le cas présent, même *A. vulgaris*, l'espèce la plus sensible, présente une CI_{50} de 257 mg Cd/kg.

Globalement, les espèces domestiques, d'intérêt agronomique, semblent plus protectrices que les espèces sauvages. Ceci n'est pas surprenant car ces espèces « agronomiques » sont, le plus souvent, au contact de sols relativement indemnes de contamination. De fait, leurs défenses sont peu sollicitées au cours des générations et les graines du commerce sont, en conséquence, assez sensibles. De plus, leur sélection s'est

opérée sur l'allocation de leurs ressources pour produire les parties valorisables (alimentation humaine ou animale) au contraire des espèces sauvages (mêmes issues de graines commerciales) dont la sélection s'est opérée en fonction de leur capacité à tolérer les conditions du milieu. Ce questionnement relève de la biologie de l'évolution.

D'autres tests ont également été réalisés (chapitre 8) pour caractériser la sensibilité de ces mêmes espèces lors d'expositions à des sols multicontaminés (sols des différentes zones de l'expérience des transects, voir chapitre 3). Dans ce cas, la quasi-totalité des réponses obtenues (germination et croissance) pouvait être directement corrélées aux teneurs en métaux non-essentiels des sols (notamment Cd, Hg). Les résultats obtenus étaient en total adéquation avec nos observations de terrain qui avaient mis en relation non seulement l'abondance de certaines espèces, mais aussi la richesse des communautés, avec les teneurs en métaux non-essentiels dans les sols (Chapitre 3).

Une autre amélioration des tests d'écotoxicité normalisés serait la prise en compte du changement d'échelle entre marqueur individuel et communautaire signalé précédemment (voir § II-2). Pour ce faire, l'utilisation de tests multispécifiques (Chapitre 9) semble être un bon moyen de se rapprocher de la réalité environnementale puisqu'ils permettent la « simulation », *ex-situ*, de communautés végétales.

Ainsi, les résultats de ces tests ont permis de vérifier, en condition de laboratoire, les pertes de richesse spécifique, de biodiversité ou d'équitabilité induites par le sol de Neuves-Maisons issu des parcelles utilisées dans les autres expériences. Ce même test a également permis de vérifier que ce sol induisait des inhibitions de croissance (taille et/ou biomasse) chez certaines espèces, des modifications (inductions ou inhibitions) des activités antioxydantes et des augmentations de la teneur foliaire en MDA (lipoperoxydation).

III-2-) Sélection d'espèces à des fins de remédiation des sols pollués

La phyto-dépollution est une technologie qui semble efficace pour un large spectre de polluants organiques et inorganiques et de substrats solides, liquides ou gazeux (Pilon-Smits, 2005). Elle repose sur les capacités des plantes à extraire et transformer le contaminant du sol ou d'augmenter la participation des micro-organismes du sol dans le processus de dégradation du polluant (Prasad, 1999) ou encore limiter leur mobilité.

Les classifications des mécanismes de phytoremédiation varient en fonction des auteurs (Just et Schnoor, 2004 ; Schoenmuth et Pestemer, 2004), mais d'une manière

générale, quatre mécanismes principaux peuvent être retenus : la phytoextraction (ou phytoaccumulation ou phytofiltration), la phytotransformation (ou phytodégradation), la rhizodégradation (ou phytostimulation) et la phytostabilisation.

La phytodépollution présente de nombreux avantages : i) elle est environ dix fois moins chère que les technologies classiques comme l'excavation, l'incinération des sols ou les systèmes d'extraction et de traitement chimique, ii) le travail *in situ* réduit aussi les risques de dispersion et d'exposition et iii) elle permet aussi d'améliorer la qualité des sols en stimulant leur aération mais aussi l'activité microbiologique, de même que l'apport de nutriments au travers des exsudats racinaires (Suresh et Ravishankar, 2004).

Elle présente cependant des inconvénients non négligeables. Tout d'abord, il s'agit d'un traitement à long terme, la vitesse de dépollution pouvant varier de l'ordre de quelques années pour la rhyzodégradation à quelques dizaines d'années pour la phytoaccumulation. Ensuite, les contaminants doivent être accessibles aux tissus absorbants. La phytodépollution est donc limitée par la profondeur des racines des plantes utilisées (Negri *et al*., 2003). Enfin, les plantes doivent être viables et en contact avec le polluant pour pouvoir agir. De fait, le choix des plantes est essentiellement basé sur leur capacité de tolérance aux polluants et sur leur efficacité en matière de dépollution des sols (Sun *et al*., 2004).

L'identification de plantes aptes à coloniser un sol pollué est donc importante, en particulier dans le cadre d'une opération de phytostabilisation. En effet, un autre facteur limitant est la présence sur les sites de plusieurs contaminants, souvent à des concentrations variables et de répartition hétérogène. Le sol peut alors devenir phytotoxique pour les plantes choisies alors que le seul contaminant de référence ne l'était pas (Alexander, 2000).

Ainsi un suivi d'une colonisation végétale d'un sol industriel tel que celui effectué dans le cadre de cette thèse, permet d'identifier des espèces suffisamment tolérantes vis-à-vis d'un mélange de polluants pour s'établir sur de telles matrices et, *de facto*, être utilisées en phytostabilisation. Par ailleurs, les relevés de végétation réalisés lors de nos expérimentations terrain ont montré que 25 à 30% des espèces en présence étaient considérées comme pouvant contribuer à la dépollution des milieux par Prasad et Freitas (2003) du fait de leur capacité à accumuler les éléments métalliques. La question peut donc se poser pour les autres espèces et nécessiterait l'étude de certaines de leurs caractéristiques comme leurs compétences métaboliques (phytodégradation), leur architecture racinaire et leurs capacités à accumuler les métaux dans les racines et les parties aériennes (phytoextraction) ou encore le fait qu'elles

soient annuelles ou pas (possibles retours des métaux dans les sols sous une nouvelle forme) (Meagher et Heaton, 2005 ; Pilon-Smits, 2005).

Références :

Ahsan, N., Lee, D.G., Lee, S.H., Kang, K.Y., Lee, J.J., Kim, P.J., Yoon, H.S., Kim, J.S., Lee, B.H., 2007. Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. *Chemosphere* 67, 1182-1193.

Alexander, M., 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ. Sci. Technol*. 34, 4259-4265.

An, Y.J., 2004. Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. *Environ. Pollut.* 127, 21-26.

An, Y.J., 2006. Assessment of comparative toxicities of lead and copper using plant assay. *Chemosphere* 62, 1359-1365.

Andreucci, F., Barbato, R., Massa, N., Berta, G., 2006. Phytosociological, phonological and photosynthetic analyses of the vegetation of a highly polluted site. *Plant Biosystems* 140, 176-189.

Bazzaz, F.A., 1996. *Plants in changing environments: linking physiological, population and community ecology*. Cambridge University Press, Cambridge, 320 pp.

Béraud, E., Cotelle, S., Leroy, P., Férard J.F., 2007. Genotoxic effects and induction of phytochelatins in the presence of cadmium in *Vicia faba* roots. *Mutat. Res*. 633, 112-116.

Björkman, O., Demming, B., 1987. Photon yield of O_2 evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K amongst plants of diverse origins. *Planta* 170, 489-504.

Brej, T., 1998. Heavy metal tolerance in *Agropyron repens* (L.) P. Bauv. population from the Legnica copper smelter area, Lower Silesia. *Acta Soc. Bot. Pol*. 67, 325-333.

Brun, L.A., Le Corff, J., Maillet, J., 2003. Effects of elevated soil copper on phenology, growth and reproduction of five ruderal plant species. *Environ. Pollut*. 122, 361-368.

Brune, A., Urbach, W., Dietz, K.J., 1994. Compartimentation and transport of zinc in barley primary leaves as basic mechanisms involved in zinc tolerance. *Plant Cell Environ.* 17, 153-162.

Conesa, H.M., Garcia, G., Faz, A., Arnaldos, R., 2007. Dynamics of metal olerant plant communities' development in mine tailings from the Cartagena-La Union Mining District (SE Spain) and their interest for further revegetation purposes. *Chemosphere* 68, 1180-1185.

Cornelissen, J.H.C., Lavorel, S., Garnier, E., Diaz, S., Buchmann, N., Gurvich, D.E., Reich, P.B., ter Steege, H., Morgan, H.D., van der Heijden, M.G.A., Pausas, J.G., Poorter, H., 2003. A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide, *Aust. J. Bot.* 51, 335–380.

Da Rosa Correa, A.X., Rorig, L.R., Verdinelli, M.A., Cotelle, S., Férard, J.F., Radetski, C.M. 2006. Cadmium phytotoxicity: Quantitative sensitivity relationships between classical endpoints and antioxidative enzyme biomarkers. *Sci. Total Environ.* 357, 120-127.

De Marco, A., Guzzardi, P., Jamet, E., 1999. Isolation of Tobacco isoperoxidases accumulated in cell-suspension culture medium and characterization of activities related to cell wall metabolism. *Plant Physiol*. 120, 371-382.

Di Toppi, L.S., Lambardi, M., Pazzagli, L., Cappugi, G., Durante, M., Gabbrielli, R., 1998. Response to cadmium in carrot *in vitro* plants and cell suspension cultures. *Plant Sci*. 137, 119-129.

Dietz, K.J., Baier, M., Kramer, U., 1999. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. *In*: Prassad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems. Springer-Verlag, Berlin, pp. 73-97.

Ernst, W.H.O., Krauss, G.J., Verkleij, J.A.C., Wesenberg, D., 2008. Interaction of heavy metals with the sulphur metabolism in angiosperms from an ecological point of view. *Plant Cell Environ*. 31, 123-143.

Ernst, W.H.O., Nelissen, H.J.M., Ten Bookum, W.M., 2000. Combination toxicology of metal-enriched soils: physiological responses of a Zn- and Cd-resistant ecotype of *Silene vulgaris* on polymetallic soils. *Environ. Exp. Bot*. 43, 55-71.

Fredrickson, L.H., Taylor, T.S., 1982. *Management of seasonally flooded impoundments for wildlife*. U.S. Fish and Wildlife Service Resource Publication 148, 29 pp.

Fusconi, A., Gallo, C., Camusso, W., 2007. Effects of cadmium on root apical meristems of *Pisum sativum* L.: cell viability, cell proliferation and microtubule pattern as suitable markers for assessment of stress pollution. *Muta. Res.* 632, 9-19.

Garrec, J.P., Van Haluwyn, C., 2002. *Biosurveillance végétale de la qualité de l'air – Concepts, méthodes et applications*. Tec&Doc, Paris, 117 pp.

Ghamsari, L., Keyhani, E., Golkhoo, S., 2007. Kinetics properties of guaiacol peroxidase activity in *Crocus sativus* L. during rooting. *Iran. Biomed. J*. 11, 137-146.

Gianazza, E., Wait, R., Sozzi, A., Regondi, S., Saco, D., Labra, M., Agradi, E., 2007. Growth and protein profile changes in *Lepidium sativum* L. plantlets exposed to cadmium. *Environ. Exp. Bot.* 59, 179-187.

Grill, E., Winnacker, E.L., Zenk, M.H., 1987. Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 439-443.

Guo, T.R., Zhang, G.P., Zhang, Y.H., 2007. Physiological changes in barley plants under combined toxicity of aluminum, copper and cadmium. *Colloids Surf. B.* 57, 182-188.

Gupta, S.C., Goldsbrough, P.B., 1991. Phytochelatin accumulation and stress tolerance in tomato cells exposed to cadmium. *Plant Physiol*. 97, 306-312.

Henner, P., Schiavon, M., Druelle, V., Lichtfouse, E., 1999. Phytotoxicity of ancient gaswork soils. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on plant germination. *Org. Geochem*. 30, 963-969.

Howden, R., Goldsbrough, P.B., Andersen, C.R., Cobbett, C.S., 1995. Cadmium-sensitive, cad1, mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin-deficient. *Plant Physiol*. 107, 1059-1067.

Inzé, D., Van Montagu, M., 1995. Oxidative stress in plants. *Curr. Opi. Biotech.* 6, 153-158.

Just, C.L., Schnoor, J.L., 2004. Phytophotolysis of Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) in leaves of Reed Canary Grass. *Environ. Sci. Technol*. 38, 290-295.

Klimesova, J., Klimes, L., 2007. Bud banks and their role in vegetative regeneration – A literature review and proposal for simple classification and assessment. *Persp. Plant. Ecol. Evol. Syst*. 8, 115-129.

Leck, M.A., Parker, V.T., Simpson, R.L., 1989. *Ecology of soil seed banks*. Academic Press, San Diego, 462 pp.

Lee, P., 2004. The impact of burn intensity from wildfires on seed and vegetative banks, and emergent understory in aspen-dominated boreal forests. *Can. J. Bot.* 82, 1468–1480.

Liszkay, A., Van der Zalm, E., Schopfer, P., 2004. Production of reactive oxygen intermediates (O_2-, H_2O_2 and •OH) by Maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiol*. 136, 3114-3123.

Meagher, R.B., Heaton, A.C.P., 2005. Strategies for the engineered phytoremediation of toxic element pollution: mercury and arsenic. *J. Industr. Microbiol. Biotechnol*. 32, 502-513.

Millberg, P. 1992. Seed bank in a 35-year-old experiment with different treatments of a semi-natural grassland. *Acta Oecologica* 13, 743-752.

Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*. 7, 405-410.

Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y., Allakhverdiev, A.I., 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 414-421.

Negri, M.C., Gatliff, E.G., Quinn, J.J., Hinchman, R.R., 2003. Root development and rooting at depths. *In*: McCutcheon, S.C., Schnoor, J.L. (Eds) *Phytoremediation - Transformation and control of contaminants*, John Wiley & Sons , Hoboken, pp. 663-694.

Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249-279.

Pastor, J., Aparicio, A.M., Gutierrez-Maroto, A., Hernandez, A.J., 2007. Effects of two chelating agents (EDTA and DTPA) on the autochtonous vegetation of a soil polluted with Cu, Zn and Cd. *Sci. Tot. Environ.* 378, 114-118.

Peco, B., Ortega, M., Levassor, C., 1998. Similarity between seed bank and vegetation in Mediterranean grassland: a predictive model. *J. Veg. Sci*. 9, 815-828.

Pilon-Smits, E., 2005. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol*. 56, 15-39.

Prasad, M.N.V., 1999. Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 462 pp.

Prasad, M.N.V., Freitas, H.M.O., 2003. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electr. J. Biotech*. 6, 285-321.

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

Ryser, P., Sauder, R., 2006. Effects of heavy-metal-contaminated soil on growth, phenology and biomass turnover of *Hieracium piloselloides*. *Environ. Pollut*. 140, 52-61.

Schat, H., Kalff, M.M.A., 1992. Are phytochelatins involved in differential metal tolerance or do they merely reflect metal-imposed strain? *Plant Physiol*. 99, 1475-1480.

Schat, H., Llugany, M., Vooijs, R., Hartley-Whitaker, J., Bleeker, P.M., 2002. The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *J. Exp. Bot*. 53, 2381-2392.

Schoenmuth, B.W., Pestemer, W., 2004. Dendroremediation of trinitrotoluene (TNT) - Part 1: Literature overview and research concept. *Environ. Sci. Pollut*. Res. 11, 273-278.

Shallari, S., Schwartz, C., Hasko, A., Morel, J.L., 1998. Heavy metals in soils and plants of serpentine and industrial sites of Albania. *Sci. Total Environ*. 209, 133-142.

Sinha, S., Mallick, S., Misra, R.K., Singh, S., Basant, A., Gupta, A.K., 2007. Uptake and translocation of metals in *Spinacia oleracea* L. grown on tannery sludge-amended and contaminated soils: Effect on lipid peroxidation, morpho-anatomical changes and antioxidants. *Chemosphere* 67, 176-187.

Sun, W.H.H., Lo, J.B., Robert, F.M., Ray, C., Tang, C.S., 2004. Phytoremediation of petroleum hydrocarbons in tropical coastal soils - I. Selection of promising woody plants. *Environ. Sci. Pollut. Res*. 11, 260-266.

Sun, R.L., Zhou, Q.X., Sun, F.H., Jin, C.X., 2007. Antioxidative defense and proline/phytochelatin accumulation in a newly discovered Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Environ. Exp. Bot*. 60, 468-476.

Suresh, B., Ravishankar, G.A., 2004. Phytoremediation - A novel and promising approach for environmental clean-up. *Critical Rev. Biotechnol*. 24, 97-124.

Thompson, K., Grime, J.P., 1979. Seasonal variation in the seed banks of herbaceous species in ten contrasting habitats. *J. Ecol*. 67, 893-921.

Toppi, S.D.L., Gabbrielli, R., 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot*. 41, 105-130.

Wu, L., Bradshaw, A.D., Thurman, D.A., 1975. The potential for evolution of heavy metal tolerance in plants. III. The rapid evolution of copper tolerance in *Agrostis stolonifera*. *Heredity* 34, 165-187.

Xiang, C., Oliver, D., 1998. Glutathione metabolic genes co-ordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 1539–1550.

Normes citées :

NF EN ISO 8692 (T90-304) « Qualité de l'eau. - Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes unicellulaires », 2005.

NF X 31-201 (X 31-201) « Qualité des sols - essai d'inhibition de germination de semences par une substance », 1982.

NF X 31-202 (X 31-2002) « Qualité des sols - essai d'inhibition de la croissance des végétaux par une substance », 1986.

T 90-327 « Qualité du sol – Evaluation des effets génotoxiques sur végétaux supérieurs - Evaluation de la fréquence d'apparition de micronoyaux dans les racines secondaires de *Vicia faba* », 2004.

CONCLUSION GENERALE
&
PERSPECTIVES

Les expérimentations menées dans le cadre de cette thèse ont permis de caractériser les premières étapes d'une dynamique successionnelle végétale sur sol pollué, d'un point de vue écologique et écophysiologique. Ainsi, il nous a été possible de démontrer que l'initiation du processus de succession était dépendante à la fois des banques de semences du sol mais aussi des pluies de graines allochtones.

Le suivi de végétation a par ailleurs permis de démontrer que le processus de colonisation d'un sol industriel suivait de près le schéma classique de succession végétale en milieux ouverts dans les zones tempérées : dominance de plantes annuelles et bisannuelles lors de la première année puis établissement progressif de plantes pérennes et clonales qui dominent majoritairement la communauté lors de la seconde année. Cependant, aucune plante métallophyte n'a été observée au sein des communautés se développant sur le sol industriel étudié.

Ce processus de colonisation s'accompagne d'un gain progressif en terme de richesse spécifique et biodiversité conduisant à des communautés plus équilibrées. Par ailleurs, les communautés de début de succession (première année) d'un sol pollué présentent une biodiversité moins élevée qu'une communauté du même âge s'étant établie sur un sol témoin. Ces différences tendent à s'estomper au fur et à mesure du processus de colonisation.

Ces différences entre végétations poussant sur sols témoins et pollués se retrouvent également au niveau individuel chez de nombreuses espèces. Ainsi, les espèces sensibles présentent des baisses de croissance, de plus faibles émergences en milieu contaminé et une moindre viabilité des graines. Ces symptômes conduisent à une baisse de compétitivité qui profite aux espèces tolérantes qui, pour certaines, vont présenter des biomasses plus importantes et/ou la production de graines adaptées aux conditions du milieu.

Cette sensibilité/tolérance aux polluants a pu être caractérisée en s'intéressant aux réponses individuelles et sub-individuelles de certaines espèces. Ainsi, la pollution semble agir sur certains mécanismes cellulaires (comme la photosynthèse) pour produire de manière excessive des composés hautement réactifs : les espèces réactives de l'oxygène. Ces composés peuvent conduire les cellules à un état de stress oxydant, générant de multiples dommages cellulaires (dont l'altération des membranes lipidiques).

Dans le cas de plantes tolérantes (*e.g. Hypericum perforatum, Matricaria recutita*), ces composés peuvent être éliminés par l'intermédiaire de mécanismes de défense qui vont soit piéger les métaux pour limiter leur phytotoxicité (phytochélatines), soit interagir avec les

radicaux libres pour les détoxiquer (enzymes antioxydantes). Dans le cas des plantes les plus sensibles (*e.g*. *Euphorbia cyparissias*, *Oenothera biennis*), ces systèmes de défense sont incapables de détoxiquer efficacement les radicaux libres.

D'un point de vue pratique, la discrimination d'espèces sensibles et tolérantes à la pollution des sols et caractéristiques de milieux ouverts pourrait avoir divers intérêts écotoxicologiques. Tout d'abord, les espèces sensibles que nous avons identifiées (*e.g*. *Artemisia vulgaris*) pourraient être utilisées dans le cadre des évaluations de risques environnementaux faisant appel à des tests normalisés qui ne mettent en œuvre que des espèces d'intérêt agronomique. Cette idée est appuyée par les fortes relations entre les teneurs en métaux dans les sols et les réponses individuelles observées chez les plantes sauvages étudiées. Ensuite, les espèces tolérantes (*e.g. Erigeron canadensis*, *Matricaria recutita*), capables de coloniser les milieux fortement pollués, présenteraient un intérêt à des fins de phytostabilisation voire de phytodépollution.

Le principal objectif de ce travail de thèse était de décrire et de comprendre le processus successionnel sur un site pollué. En considérant en parallèle plusieurs échelles d'observation, notre travail a permis de démontrer certaines relations entre des marqueurs sub-individuels, individuels, populationnels et communautaires.

Néanmoins, de nombreux doutes subsistent et la mise en place d'expérimentations complémentaires s'avère nécessaire pour répondre à certaines questions comme le rôle potentiel de la régénération végétative dans la colonisation des milieux pollués, les effets des facteurs abiotiques autres que la pollution dans le phénomène de succession (pH du sol, granulométrie…), ou l'implication exacte des phytochélatines et d'autres systèmes de défense non mesurés ici (acides organiques, proline…) dans le mécanisme de tolérance aux polluants. La capacité des espèces observées *in situ* à accumuler les métaux permettrait également de mieux caractériser leurs stratégies de défense mais aussi d'évaluer leur potentiel d'utilisation en phytodépollution des milieux. Certaines de ces expérimentations (degré d'implication des phytochélatines dans la tolérance aux métaux lourds de plantes sauvages) sont en cours de réalisation au sein du laboratoire et devraient prochainement donner lieu à publication.

AUTRES CONTRIBUTIONS

Publications dans des revues internationales à comité de lecture :

(1) Dazy M., Béraud E., Cotelle S., Meux E., Masfaraud J.F, Férard J.F, 2008. Antioxidant enzyme activities as affected by trivalent and hexavalent chromium species in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere* 73(3), 281-290.

(2) Dazy M., Masfaraud J.F., Férard J.F., Induction of oxidative stress markers associated with heavy metal stress in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere* (En révision)

(3) Dazy M., Béraud E., Cotelle S., Masfaraud J.F, Férard J.F, Phytotoxicity of heavy metals on seed germination and early development stages in Snapdragon (*Antirrhinum majus*). *Journal of Experimental Botany* (en preparation).

(4) Dazy M., Béraud E., Cotelle S., Masfaraud J.F, Férard J.F, Heavy-metal sensitivity in two *Scrophulariacea*: role of cellular defense systems. *Environmental and Experimental Botany* (en preparation).

Communications lors de congrès internationaux :

(1) Dazy M., Béraud E., Cotelle S., Akinomi P., Giambérini L., Férard J.-F. and Masfaraud J.-F., 2005. Oxidative stress induced by trivalent and hexavalent chromium species in *Fontinalis antyperetica* Hedw, *XVII International botanical congress*. Vienna, Austria, 17-23 July 2005. (communication affichée)

(2) Masfaraud, J.-F., Giambérini, L., Bauda, P., Béraud, E., Billard P., Cossu-Leguille, C., Cotelle, S., Dazy, M., Doyen, P., Férard, J.-F., et al., 2005. Integrated study of metal and organic pollutant fate and biological responses at the confluence of the Fensch and Moselle rivers (France), SEFS 4 - 4th Symposium for European freshwater sciences. Cracovie, Pologne, 22-26 June 2005.

(3) Dazy M., Béraud E., Masfaraud J.-F., Cotelle S. and Férard J.-F., 2006. Effects of heavy metals on physiological parameters and oxidative stress in Snapdragon (*Antirrhinum majus*), *16th Annual meeting of SETAC Europe*. The Hague, The Netherlands, 07-11 May 2006. (communication affichée)

(4) Dazy M., Grévilliot F., Masfaraud J.-F. and Férard J.-F., 2007. Plant diversity and cell defence systems in an industrial wasteland at Homécourt (France), *17th Annual meeting of SETAC Europe*. Porto, Portugal, 20-24 May 2007. (communication orale)

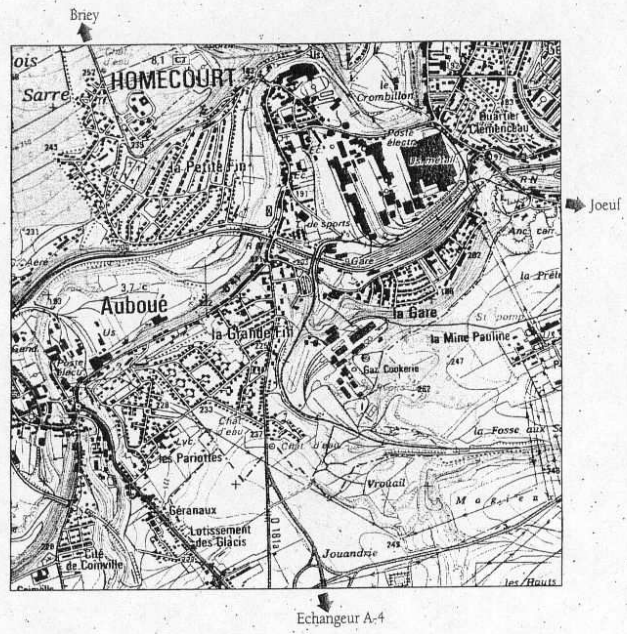
(5) Bert, V., Caron, L., Lors, C., Biaz, A., Ponge, J.F., Dazy, M., Masfaraud, J.-F., 2007. Is phytostabilization a sustainable technology for metal contaminated sediment deposits? ICOBTE. 9th International conference on the Biogeochemistry of trace elements. Beijing, China, 5-19 July 2007. (communication affichée)

(6) Foltete, A.S., Béraud, E., Dazy, M., Cotelle, S., Masfaraud, J.F., Férard, J.F., 2008. Phytochelatins induction after heavy metal exposure in *Vicia faba* roots. International Symposium Glutathione and Related Thiols in Microorganisms and Plants. Nancy, France, 26-29 August 2008. (communication affichée)

ANNEXES

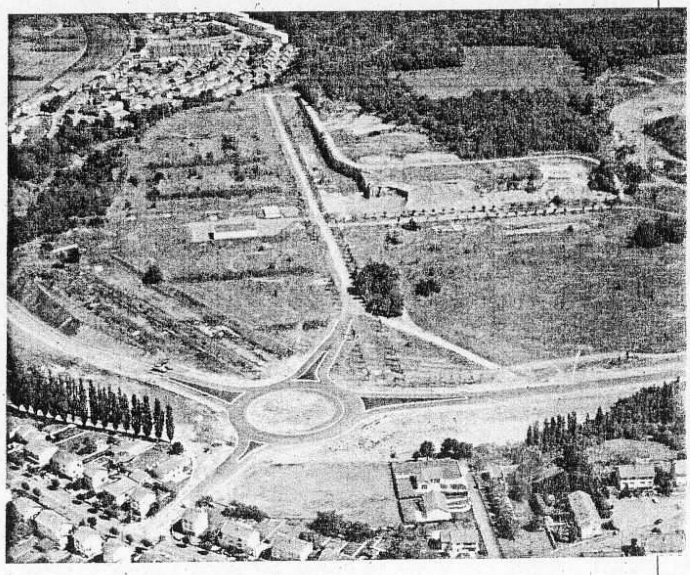
ANNEXE 1
SITE DE LA COKERIE ET DU CRASSIER D'HOMECOURT

SITE DE LA COKERIE ET DU CRASSIER D'HOMÉCOURT

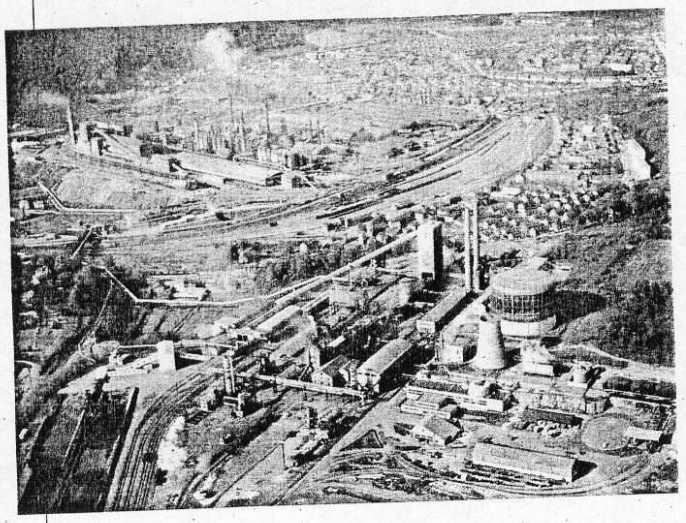


Situé à proximité d'un échangeur sur l'autoroute A4, ce site a accueilli, à la marge de l'agglomération Homécourt-Joeuf, deux cokeries successives ainsi qu'un vaste crassier, où étaient déversés les résidus de l'activité sidérurgique.

Les travaux de démantèlement des installations de cokerie effectués par la sidérurgie ont laissé place à deux plates-formes à requalifier. L'EPML a mené une action légère de paysagement d'attente sur ces espaces.



Le site de la cokerie en cours de réaménagement



Complexe sidérurgique d'Homécourt (cokerie et usine) en activité

Sur le secteur du crassier où des matériaux à usage routier sont encore exploités, plusieurs buttes ont été remodelées et plantées (plus de 130 000 plants ont été mis en place), et constituent désormais un signal positif dans le paysage.

Enfin, l'intervention de l'EPML a permis de désenclaver le site par la construction d'une bretelle de raccordement à l'autoroute. Cette réalisation confère à ce lieu une bonne accessibilité et s'inscrit dans la perspective d'une liaison rapide entre Homécourt et Briey. Le site reste cependant marqué par certaines contraintes lourdes : contamination des sols sur l'ancienne cokerie, contraintes minières sur le crassier. Le développement qui est envisagé, orienté surtout vers l'accueil de nouvelles activités industrielles, devra donc rester cantonné aux secteurs sans contrainte ou à contrainte légère.

Communes concernées :	**Population totale :**
Homécourt	7 088
Sainte-Marie-aux-Chênes	3 302
Montois-la-Montagne	2 759

Surface du site : cokerie 32 ha, crassier 70 ha

Activité initiale - produits : production de coke et sous-produits, stockage résidus.

Nature des installations :
Cokerie : fours à coke, parc à charbon, complexe de préparation de la pâte à coke, gazomètre, réfrigérants, réservoirs, ateliers et bureaux (production en 1967 : 441 000 t coke)
Crassier : stockage résidus de l'activité sidérurgique (laitier, scories), volume 8 000 000 m³, installations de concassage, criblage du laitier

Démarrage de l'activité : 1923 (cokerie), 1924 (crassier)

Nombre de salariés à l'apogée : 300 personnes

Date de fermeture : juin 1980

Protocole : Protocole EPML/ SIAFI signé le 27.3.86

Acquisition EPML : cokerie le 4.8.87 pour 2 MF ; crassier le 6.11.90 pour 2,546 MF

Calendrier d'intervention :
Etudes : étude d'impact (90), étude d'urbanisme (91), étude économique (91), étude de pollution (91), étude pédologique (86), sondages géotechniques et étude acoustique de la desserte (91)
Travaux : terrassements, plantations (sept 88 à juin 89), desserte routière (mai 93 à nov 93)

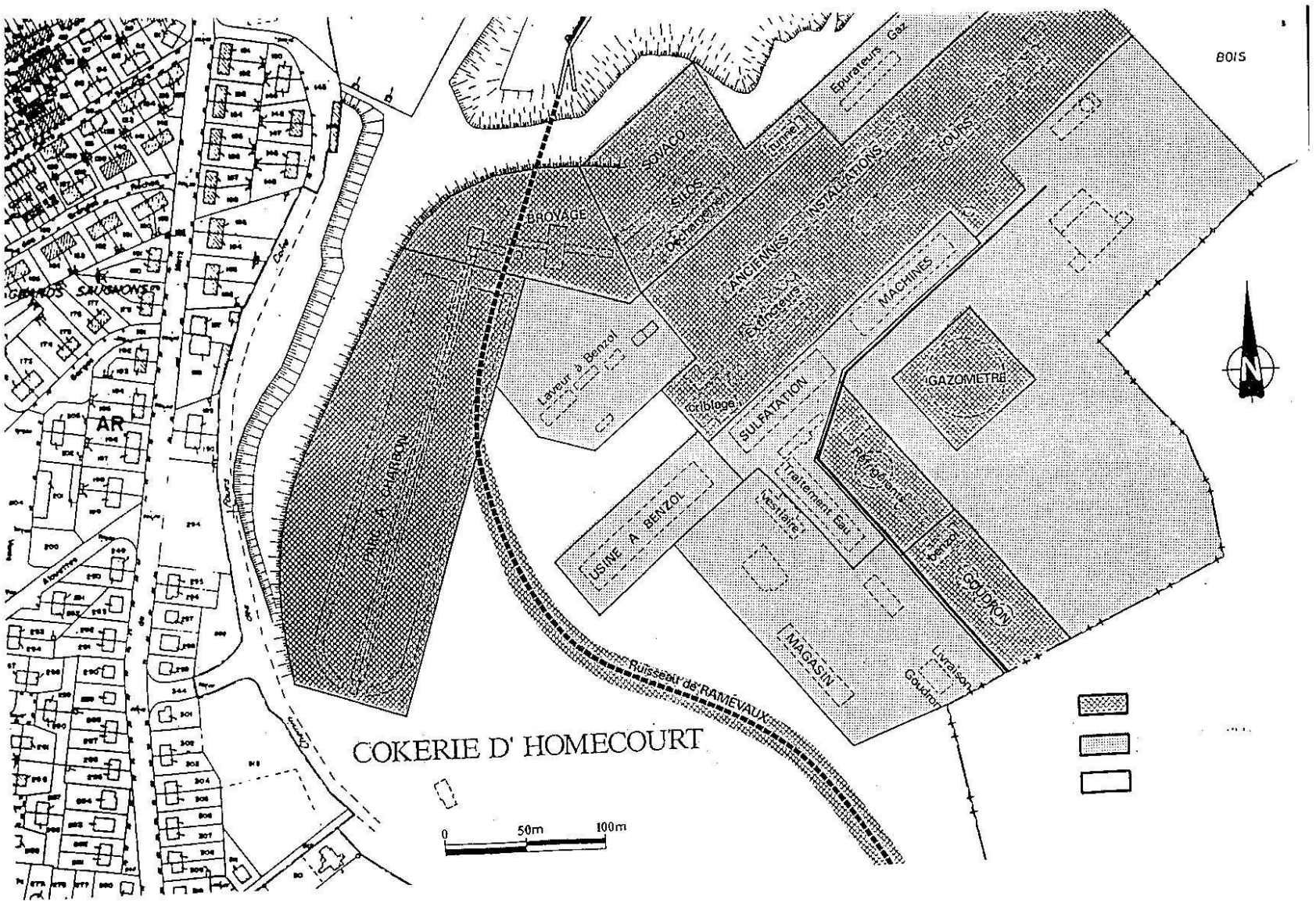
Coût des travaux : Requalification paysagère : 4,475 MF, Desserte routière : 13,965 MF

Nombre de plants : 133 500 unités

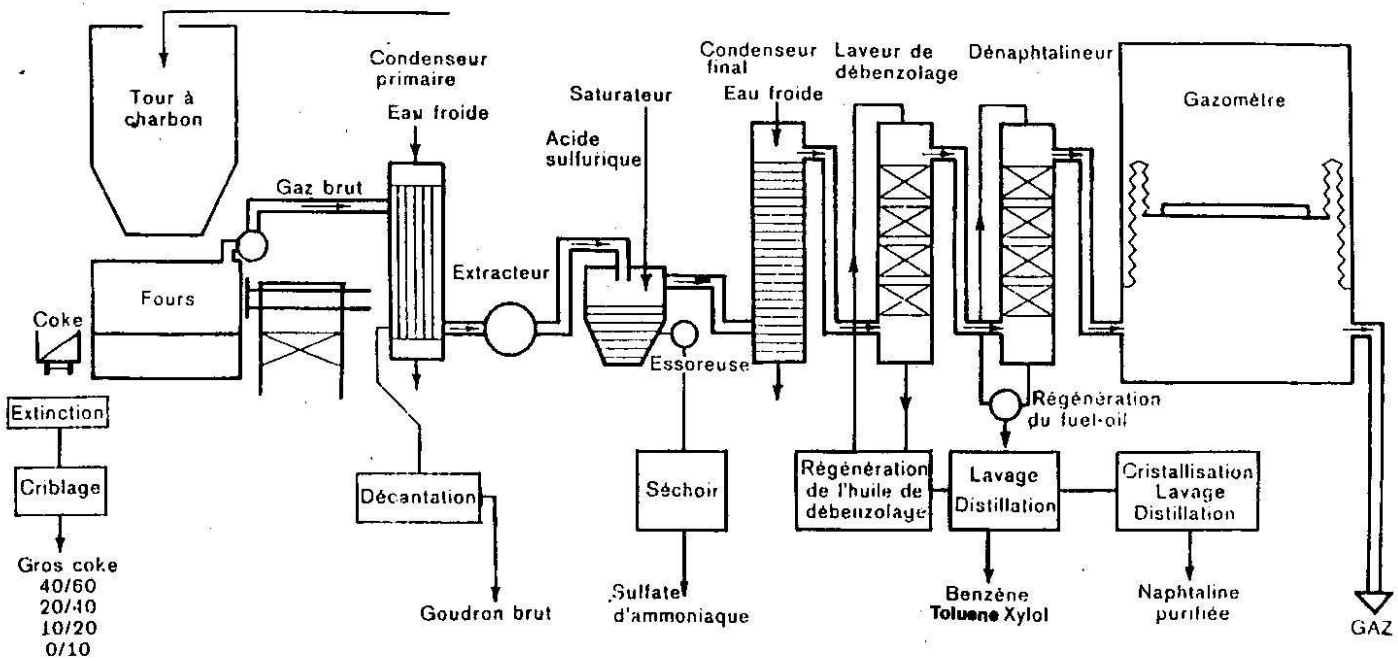
Nouvelles vocations : vocations industrielles, espaces verts rustiques

Intervenants :
- bureaux d'études : Ecolor, Gollin-Sgard, A. Thouard, ANRED, De Bary, Hardy, Jolin, Fondasol, CETE de l'Est
- maîtres d'œuvre : Collin, Sgard, DDE 54
- entreprises : Groupement Slag-Urano (terrassements), Christophe (paysagement), Groupement Cochery-Bourdin-Chausse (travaux routiers), J. Lefebvre, Muller, SCR (travaux publics), Norelec (éclairage), Neuhaus et Marquage de Bande du Saulnois (signalisation routière)

Lombard et Associés BC Metz B 372 802 066

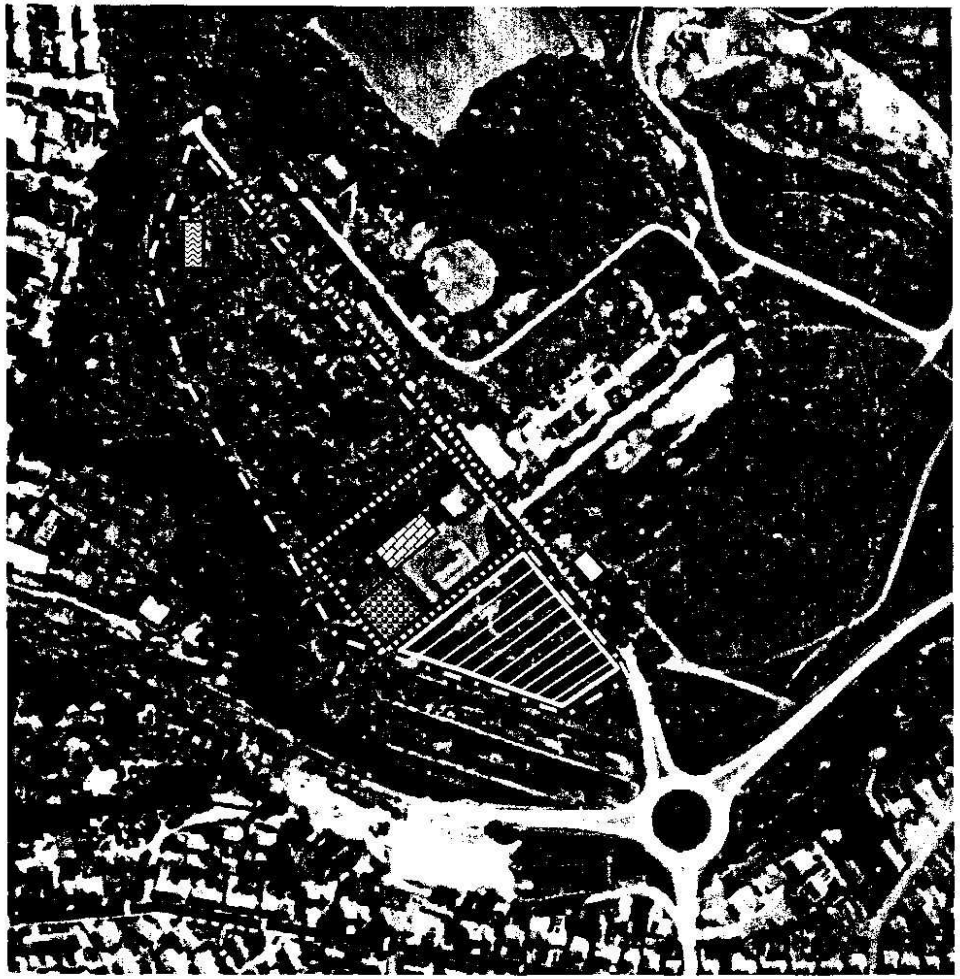


BOIS
Epurateurs Gaz
SOVACO
SILOS
Déchargement
tunnel
INSTALLATIONS
FOURS
BROYAGE
ANCIENNES
Extincteurs
MACHINES
Laveur à Benzol
criblage
SULFATATION
GAZOMETRE
AR
PARC A CHARBON
Réfrigérants
Traitement Eau
Vestiaire
USINE A BENZOL
benzol
GOUDRON
MAGASIN
Livraison
Goudron
Ruisseau de RAMEVAUX
COKERIE D' HOMECOURT
0
50m
100m
N


Tour à charbon
Condenseur primaire
Eau froide
Saturateur
Acide sulfurique
Condenseur final
Eau froide
Laveur de débenzolage
Dénaphtalineur
Gazomètre
Gaz brut
Extracteur
Fours
Coke
Essoreuse
Régénération du fuel-oil
Extinction
Criblage
Décantation
Séchoir
Régénération de l'huile de débenzolage
Lavage Distillation
Cristallisation Lavage Distillation
Gros coke
40/60
20/40
10/20
0/10
Goudron brut
Sulfate d'ammoniaque
Benzène
Toluène Xylol
Naphtaline purifiée
GAZ

ANNEXE 2
STATION EXPERIMENTALE DU GISFI

Station expérimentale du GISFI



Zone GISFI (5 ha)

Zone clôturée (1,5 ha)
Juillet 2005

Parcelles 1ère tranche
sol en place (2001)

Parcelles 2ème tranche
Reconstitution de sols (2003)

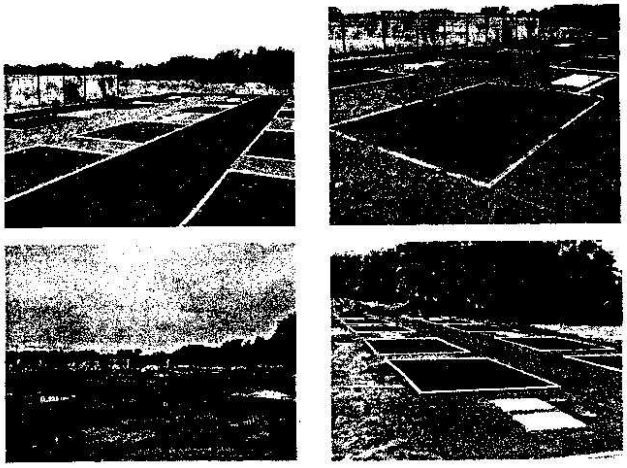
Bâtiment relais
Matériel mi-lourd

Parcelles 3ème tranche
Parcelles lysimétriques (2005)

Projet 4ème tranche
Parcelles de demonstration (2006

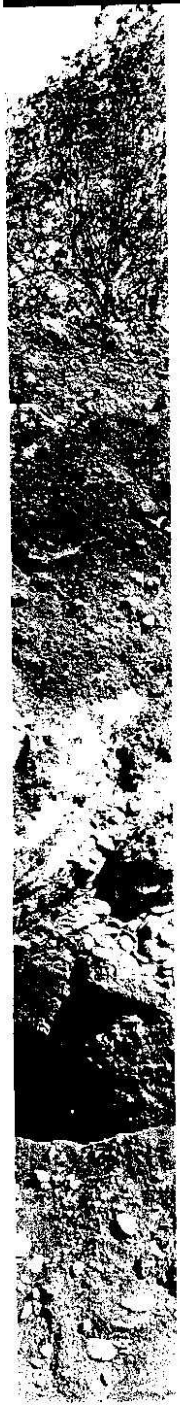
Projet construction
station lysimétrique (2007)

Parcelles Lysimétriques (juin 2005)



Protocole scientifique : approche intégrée du devenir des polluants et des interactions avec les organismes *in situ*

- Caractéristiques des parcelles
  - Terre polluée / Terre traitée par désorption thermique
  - Sol planté / Sol nu, végétalisation spontanée
  - 2 plantes : *Thlaspi Caerulescens* et luzerne,
  - Luzerne mycorhizée ou non
- Nature des travaux
  - Interactions organismes polluants :
    - Biocapteurs bactériens luminescents ou fluorescents
    - Diversité microbienne fonctionnelle
    - Réponse des plantes
  - Transport et caractérisation des polluants
    - Biodisponibilité des polluants (organiques, métalliques)
    - Flux de polluants
  - Gestion des sols dégradés
    - Bioremédiation/phytoremédiation/stabilisation *in situ*
- Equipes impliquées
  - ESE, G2R, LIMOS, LSE

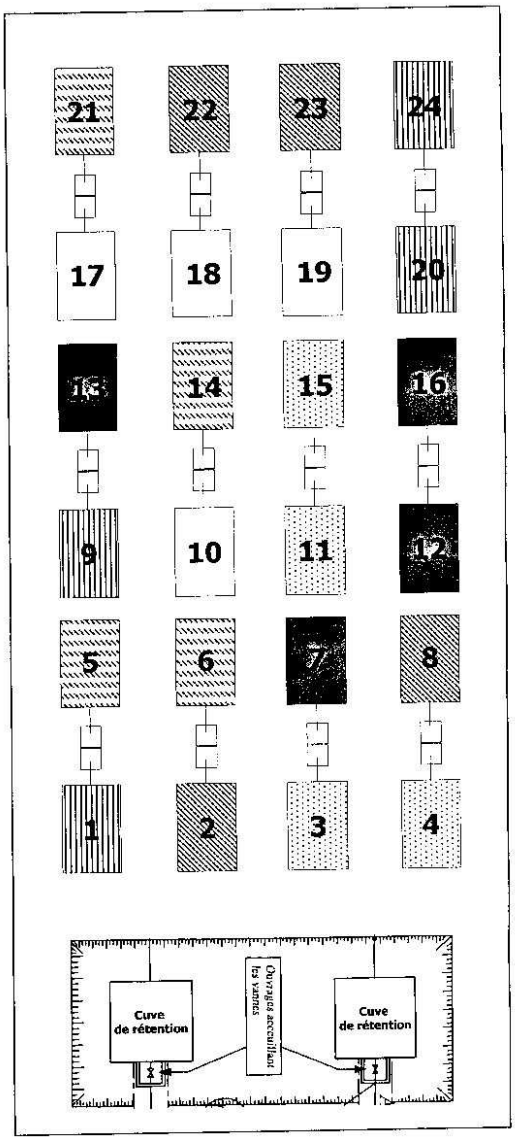


Station expérimentale du GISFI

Dispositifs de parcelles expérimentales pour l'étude de la dynamique des polluants

http://www.gisfi.prd.fr

TN	**Terre Nue**
VS	**Végétation Spontanée**
TC	***Thlaspi Caerulescens***
MS	**Luzerne**
MS myc	**Luzerne mycorhizée**
TD	**Terre après Desorption Thermiquee**



ANNEXE 3
TRAITEMENT PAR DESORPTION THERMIQUE

TRAITEMENT PAR DESORPTION THERMIQUE

TRAITEMENT DES TERRES :

Pollution traitée : huiles, essences, HAP, produits chlorés, cyanures ...

➢ **Prétraitement des terres :**

Les sols sont concassés et criblés à une dimension inférieure à 50 mm.

➢ **Unité de traitement :**

- composée d'un four rotatif cylindrique chauffé par un brûleur consommant du fioul,
- le temps de passage des terres dans le four varie de 8 à 16 mn en fonction du type de sols et de pollution,
- la température est comprise entre 450 et 550 ° C.

➢ **Refroidissement des terres :**

- les terres sont refroidies par injection d'eau dans un mélangeur à vis,
- les poussières sont aussi envoyées dans le mélangeur,
- la vapeur d'eau produite par le refroidissement des terres est envoyée dans les filtres à manches pour y être dépoussiérées.

TRAITEMENT DES GAZ

➢ **Le Cyclône :**

- C'est un cylindre conique placé directement après le four rotatif,
- Il permet d'éliminer les grosses poussières de gaz qui sont envoyées vers le refroidisseur de terres propres,
- Les gaz dépoussiérés se dirigent ensuite vers la post-combustion.

➢ **La Post-combustion :**

- permet d'incinérer les gaz à une température maximale de 1050 ° C,
- lors de la post-combustion, les pollutions organiques sont transformées en CO_2 et H_2O,
- le brûleur a une puissance de 10 MW,
- après la post-combustion, les gaz sont acheminés dans la tour de refroidissement par eau.

➢ **La Tour de refroidissement :**

- constituée d'un cylindre de diamètre 3,5 m et de longueur 16 m,
- destinée à refroidir très rapidement les gaz incinérés par pulvérisation d'eau.

➢ **Les filtres à manches :**

- constitués de 2 chambres avec chacune 620 filtres en fibre de verre recouverte de téflon,
- la poussière forme des "cakes" au fond des filtres,
- les "cakes" formés tombent dans les chambres à filtres et sont entraînés vers le refroidisseur des terres.

➢ **Le ventilateur de dépression :**

Il permet de maintenir une dépression dans la machine, ce qui évite l'émission de gaz vers l'extérieur.

➢ **La tour d'adsorption (charbon actif) :**

En présence de mercure, on injecte du charbon actif en poudre pour adsorber le mercure.

➢ **La tour de lavage (neutralisation des gaz) :**

- c'est une tour de refroidissement.
- les gaz qui arrivent sont refroidis par eau.
- après le passage dans la tour de lavage, les gaz quittent l'installation par une cheminée.
- les rejets atmosphériques sont contrôlés en continu, conformément à la législation des ICPE.

Coût du traitement : 85 à 90 €/tonne

Tonnage traité : 8000 tonnes

Figure 12 : PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DE L'UNITE DRAGON 35

