



Aix-Marseille Université

Laboratoire de Chimie de l'Environnement - FRE 3416

Équipe Développement Métrologique et Chimie des Milieux

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Aix-Marseille

Spécialité Sciences de l'Environnement Terrestre

Approche des mécanismes de tolérance du romarin aux éléments traces métalliques et métalloïdes : perspectives pour une phytostabilisation des sols méditerranéens pollués

Marie-Cécile AFFHOLDER

École doctorale des Sciences de l'Environnement

Jean-Louis MOREL	Professeur, Université de Lorraine (France)	Rapporteur
Gianniantonio PETRUZZELLI	Professeur, CNR Pise (Italie)	Rapporteur
Hans-Rudolf PFEIFER	Professeur, Université de Lausanne (Suisse)	Examineur
Isabelle LAFFONT-SCHWOB	MCF, HDR, Université Aix-Marseille (France)	Examineur
Bruno COULOMB	MCF, Université Aix-Marseille (France)	Co-directeur
Pascale PRUDENT	MCF, HDR, Université Aix-Marseille (France)	Directrice



Résumé

Mots clés : éléments traces métalliques et métalloïdes, *Rosmarinus officinalis*, phytoremédiation, sols contaminés méditerranéens, symbioses racinaires, phytométabolites de stress.

Les conséquences des activités industrielles passées, et notamment métallurgiques, persistent encore aujourd'hui. C'est le cas dans l'actuel Parc National des Calanques, qui abrite l'ancienne fonderie de plomb de l'Escalette (sud-est de Marseille). Ainsi, plus de 80 ans après la fermeture de cette usine, une contamination importante et étendue en éléments traces métalliques et métalloïdes (ETMM) est présente.

Les objectifs de cette thèse ont été de contribuer à l'évaluation de la contamination diffuse en ETMM des sols des Calanques situés aux alentours du site industriel abandonné de l'Escalette. Dans un but futur de restauration écologique, solution adaptée dans le contexte particulier de la zone de pollution diffuse, située dans le Parc National des Calanques, les capacités d'accumulation et les mécanismes de tolérance d'une espèce autochtone, le romarin (*Rosmarinus officinalis*) ont été étudiés. Pour ce faire, des études *in situ* et en conditions contrôlées ont été réalisées. Les concentrations en ETMM ont été dosées dans les différents organes du romarin (feuilles, tiges, racines), ainsi que plusieurs phytométabolites de stress. De plus, le rôle des symbioses racinaires dans la tolérance du romarin aux ETMM a été évalué.

Les résultats montrent que le romarin accumule les ETMM au niveau de ses racines et les transloque peu vers les parties aériennes, ce qui est intéressant pour la phytostabilisation, et particulièrement dans ce cas, puisque le romarin est une plante comestible. Concernant les biomarqueurs de tolérance, les résultats montrent, entre autre, une implication des composés thiolés et une modification de la composition des huiles essentielles. Une augmentation de la biosynthèse de composés antioxydants paraît également favorisée dans le cas des romarins provenant des sites les plus contaminés. Quant aux symbioses mycorhiziennes, elles semblent fortement impliquées dans la tolérance aux ETMM du romarin puisqu'un taux de colonisation significativement plus important est observé dans le cas des romarins provenant des sites contaminés.

Ainsi, cette étude a permis de mettre en évidence quelques mécanismes de tolérance aux ETMM certainement mis en jeu dans le cas du romarin. Les résultats montrent que le romarin pourrait être un candidat intéressant pour la phytostabilisation aux vues de sa capacité d'accumulation des ETMM dans les racines, ainsi que sa résistance à des niveaux de contamination très élevés.

Abstract

Key words: traces metals and metalloids, *Rosmarinus officinalis*, phytoremediation, Mediterranean contaminated soils, root symbioses, stress phytometabolites.

Past industrial activities, particularly metallurgical one, have current environmental consequences. As an example, the former lead smelter from l'Escalette (South-East Marseille, France) in the National Park of Calanques lead to an important environmental pollution of its surroundings. Thus, more than 80 years after its activity ceased, a trace metal and metalloide (TMM) diffuse pollution is still present.

This PhD study aimed to contribute to the assessment of the diffuse contamination levels by TMM of the Calanque's soils around the former lead smelting factory. Aiming at identifying an adapted solution of ecological restoration of the areas with diffuse pollution located in the National Park of Calanques. Accumulation abilities and tolerance mechanisms of a native plant species, rosemary (*Rosmarinus officinalis*), were studied. In order to achieve this, *in situ* and *ex situ* assays were performed. TMM concentrations in rosemary organs (leaves, stems, roots) and some stress phytometabolites were assessed. Moreover, the role of mycorrhizal symbioses in rosemary tolerance was evaluated.

Results showed that rosemary preferentially accumulated TMM in its roots and that translocation into shoots is low, which is interesting for a phytostabilization process, particularly in the case of this edible species. Concerning tolerance biomarkers, involvement of thiols compounds was demonstrated and essential oil composition were modified. Antioxidant compound biosynthesis seems improved in rosemary growing on TMM contaminated site. Regarding mycorrhizal symbioses, the increase of colonisation percentage with TMM contamination suggest their important role in rosemary tolerance.

Thus, this study highlighted some of the mechanisms involved in rosemary tolerance in response to TMM. This species seems to be an interesting candidate for a phytostabilization process considering its accumulation abilities in roots and its resilience to high TMM contamination.

"Rêve de grandes choses, cela te permettra au moins d'en faire de toutes petites"
Jules renard

Remerciements

Voici la partie de la thèse qu'il me tardait le plus d'écrire...la seule en fait. Le soulagement est d'autant plus grand qu'elle arrive à la fin de la rédaction. Mais maintenant que le moment est venu, je suis inquiète : arriverais-je à retranscrire le plus fidèlement possible tout ce que j'aimerais dire? Combien de personnes vais-je oublier? Et arriveront-ils à me pardonner?

Pour les personnes que je vais oublier (et il y en aura) sachez que vous avez été formidables, que vous êtes formidables. Bref, ne changez rien !

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, Messieurs les professeurs J.L. Morel, G. Petruzzelli et H.R. Pfeifer pour avoir accepté de juger mon travail, ainsi que Mme I. Laffont-Schworb qui, en plus de participer au jury, aura été d'une aide plus que précieuse dans la réalisation de ce travail de thèse.

Je remercie également le directeur du LCE, Mr. H. Wortham, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire, et de m'avoir permis d'effectuer une année en temps qu'ATER, me permettant de finir ma thèse sans passer par la case pôle emploi. Un grand merci aussi à Mr J.L. Boudenne, chef de l'équipe DMCM pour son accueil, son aide et ses conseils concernant la chimie, et en particulier lors du dosage des composés thiolés.

J'en profite pour remercier tous les membres de l'équipe DMCM que j'ai côtoyé pendant ces quelques années et avec qui j'ai pu avoir des petits moments de bavardages bien sympathiques : Laurence, sa patience, son sourire et son efficacité redoutable, Violaine, Olsen, Julien, Roger...

Je tiens particulièrement à remercier mes directeurs de thèse Pascale et Bruno. Merci de m'avoir accordé votre confiance et de m'avoir laissé une liberté d'action très appréciable. Merci aussi pour votre écoute, votre disponibilité et votre aide tout au long de la thèse. Pascale, avec tes petites attentions et tes paroles positives, tu as su me remotiver et me faire garder le moral quand le désespoir commençait à me gagner et que la panique montait face à la masse de travail à faire. Bruno, tu m'as appris à affronter ma peur, parce que oui, au début tu me faisais peur (va savoir pourquoi). Merci pour ton aide et tes conseils particulièrement en analytique, pour ton aide concernant les enseignements que j'ai été amenée à présenter en tant qu'ATER, et pour ta prévenance. Merci aussi de m'avoir fait découvrir la maison des sciences (dont je remercie l'équipe au passage!) et les joies de l'animation scientifique. Malgré ma phobie des enfants, j'ai passé de très bons moments en leur compagnie.

Un grand merci aussi à toute l'équipe Biotechnologies et Bioremédiation de l'IMBE, particulièrement à Isabelle Laffont-Schworb, mais aussi à Véronique Masotti et à Jacques Rabier, pour leur collaboration et leur aide inestimable tout au long de la thèse, et le tout dans la bonne humeur! Que demander de plus? Grâce à vos connaissances et compétences en physiologie végétale, j'ai beaucoup appris et pu envisager des manipulations qui auraient été impossibles sans vous.

Merci également à tous les participants du projet Marséco pour les sorties terrain, à Catherine Keller pour ses données sur les sols, à Steven Criquet pour son aide et le temps qu'il m'a consacré pour la manipulation de respiration du sol. Et un grand merci à Andreea qui a été d'une aide inestimable et aura, grâce à ses explications simples et claires, presque fini par me faire aimer les statistiques ainsi qu'à Perrine Chaurand pour les analyses en micro-fluorescence X.

Parmi les personnels du LCE, je crois que je ne remercierais jamais assez (un semi-remorque plein de chocolat devrait équilibrer les choses mais, pour votre santé, et afin de garder de bonnes relations avec ma banquière, je m'abstiendrai) nos techniciens de folie que sont Carine et Laurent. Merci pour votre aide précieuse, votre efficacité et votre patience ! Même quand je venais pour la x^{ème} fois dans votre bureau avec une "dernière" demande d'analyse urgente, vous m'avez accueilli avec le sourire. Ne changez rien, vous êtes parfaits!

Je ne pourrais pas non plus oublier tous ceux qui ont partagé mon bureau, Fabien, Nisreen, Edwin, Nikita, Jean-Aubin, Fadi et surtout ma petite Anca. Anca, tu es très vite devenue bien plus qu'une collègue de bureau. Tu as été le soleil de mes journées pendant presque un an. Avant de te rencontrer je n'aurais jamais pensé que quelqu'un puisse être si généreux. Grâce à toi les heures au labo et les congrès ont été des moments inoubliables. Merci pour toutes nos discussions concernant la science évidemment, mais surtout la vie, nos craquages, fou rires, et merci aussi pour tous ces moments où tu as été là pour moi après le boulot quand je n'allais pas bien ou quand il s'agissait de sortir se dégourdir les pattes sur un terrain de beach volley ou une piste de danse.

Merci aussi à tous mes petits "esclaves" (stagiaires), je pense particulièrement à Fabien, Rosalie, Nadège et Antoine, qui ont permis de grandes avancées dans mon travail de thèse, et surtout ont été la source de très bons moments. Vous m'avez ouvert les yeux sur mon orientation. Même si j'ai pris beaucoup de plaisir à vous entendre m'appeler "chef" et "maître", je crois que je vais devoir laisser tomber mon rêve : devenir "maître du monde"! Oui, finalement, vous faire souffrir et trimer jusqu'à épuisement ne m'a apporté que peu de satisfaction.

En dehors du labo, mais toujours sur le campus, je tiens à remercier mes compagnons des pauses déjeuner et thé, qui ont rythmé la grande majorité de mes journées : Julie, Alma, Annabelle, mes compères de blagues soul, et Laurent. Pouvoir partager toutes ces discussions, blagues et coups de gueule a été salvateur pour ma santé mentale!

Laurent, les pic-nics et sushis St-charliens du samedi avec Thiéphaïne et toi m'ont presque fait aimé travailler le week end...j'espère que je n'en serai pas trop nostalgique.

Merci aux doctoriales en Provence qui, après deux années de misère sociale, m'ont permis de rencontrer des gens très sympathiques (Fabien, Grégoire, Béangère...) et d'avoir enfin une vie sociale...et bien plus.

Et puis, je ne peux pas ne pas remercier ceux qui ont partagé mon quotidien pendant mon séjour Marseillais : mes moultes colocs! Annabelle qui m'a sorti à mon arrivée à Marseille quand je ne connaissais « dégun » ; Stéphanie et Flo, les deux pipelettes complètement barrées avec qui les fous rires étaient quotidiens ; Julien et sa bonne cuisine au beurre (mes hanches en gardent les stigmates), Robin 1 et 2, les petits cons ; Laet, son énergie positive et nos duo musicaux, qui même loin arrive à m'encourager avec des fleurs et ses sms "citation sérénité" quotidiens! Merci ma Brenda! ; Philou et son zèbre à pois ; et les petits derniers, Stéph et son rire communicatif, et Eddy, que du coup je n'ai pas vraiment eu l'occasion de voir beaucoup. Merci à tous pour toutes les bonnes soirées passées ensemble, tous ces apéros, repas, sorties, etc...vous avez été ma deuxième famille! Merci aux derniers qui me laissaient à manger quand je rentrais tard et ont nourri mon chat (que je remercie, mais brièvement pour ne pas passer pour une vieille à chat : Mich mich, le survivor, celui qui a su déjouer le mauvais œil qui sabattait sur les félins de la maison et dont les moments câlins, bien que rares, ont été intelligemment choisis).

Merci également à Laureline, qui, bien que pas officiellement "co-loc", à fait parti intégrante de la maison. Ma poule, merci pour nos week-ends et randos : écouter nostalgie et chanter les classiques de la chanson française à tue tête dans la clio...c'était du bonheur!

Je remercie aussi mes potos qui bien que loin, m'ont rendu visite régulièrement (même si pour les Alsaciens et Ecossais c'est plus le soleil qui vous a motivé que l'idée de me voir. Seriez-vous venus aussi souvent si j'avais fait ma thèse à Dunkerque? Hein?! Bon...): ma petite Sandrine, mon vieux Marco, mon liseron et puis Mathieu et Oualid. C'est toujours très bon de voir que, même après plusieurs mois sans se voir ou se parler, quand on se retrouve c'est comme si l'on ne s'était jamais quitté. Vous n'imaginez pas à quel point la touche d'Alsace que vous m'avez apportée à chaque fois (surtout Marco avec ton accent bien de chez nous) m'a fait un bien fou!

Et puis, parmi mes amis, il y en a un que je remercie profondément : Greg. Petit gars, depuis la fin du master tu as été là quand j'en avais le plus besoin. Tu as toujours été à l'écoute, tu m'as toujours soutenue et poussée vers l'avant et tu as été présent dans les moments difficiles, même si cela impliquait un aller-retour à travers la France pour une journée. J'espère pouvoir te rendre la pareille un jour. Je te dois aussi la découverte du monde sous-marin et des souvenirs impérissables de week-end rando avec l'invité surprise incontournable : l'orage!

Evidemment je remercie aussi ma famille. Mes parents qui ont toujours accepté mes choix d'orientation et m'ont soutenue, même si laisser partir leur "petite fille" tout là bas, tout loin, dans la jungle Phocéenne n'a pas forcément été facile à accepter au début. Merci pour tout ce que vous avez pu m'apporter à tous les niveaux, qui font qu'aujourd'hui je n'ai presque pas besoin de psychothérapie. Sachez que votre impatience et votre fierté anticipée à l'idée de me voir un jour soutenir cette thèse à été un moteur pendant la rédaction. Toutes les fois où, désespérée devant mon écran, j'ai eu envie de partir casser des cailloux au Bangladesh (oui, autant mettre à profit les compétences en broyage que j'ai développé pendant la thèse), j'ai pensé à vous, et j'ai continué.

Merci à mon frère bien sur. Même s'il n'a jamais trouvé le temps et l'argent de venir voir sa petite sœur au soleil! Mec, pouvoir rendre les parents fous et former un équipe de tueurs au times-up grâce à notre complicité fraternel, ça n'a pas de prix! Merci pour tous ces moments de gaminerie partagés lors de mes retours au bercail.

Pour finir, je tiens à remercier Pierre-Henri. Ferdi, sous ton air de petit intello, tu es le mec le plus odieux qu'il m'ait été donné de rencontrer et pourtant...Par je ne sais quel miracle, ces derniers mois ta simple présence suffisait à m'apaiser et à me déridier. J'appréhendais énormément la période de rédaction commune, et au final, nos week-end et jours fériés studieux ont presque été agréables. Partager cette "épreuve" avec toi à été un vrai soulagement. Même si tu as été fatiguant et insupportable par moment (mais tu peux certainement en dire autant sur moi), je crois que nous avons trouvé un bon équilibre entre travail et moments de détente. Franchement, je n'ai jamais autant rit en travaillant (les nerfs y étaient pour beaucoup, je l'accorde). Mais surtout, ta présence au labo quand il n'y avait personne m'as beaucoup rassurée. Eh oui, c'est bien cas d'attaque du psychopathe-qui-se-promène-avec-une-tête-dans-un-sac-plastique, c'est toi qui y serais passé en premier, parce que tu cours moins vite et qu'il y a plus (beaucoup plus) à manger sur toi! Bref, j'espère que tu me supporteras encore un petit moment pour pouvoir partager tout un tas d'autres "aventures" avec toi!

Trêve de sentiments dégoulinants, place...à "la science" ?

Liste des figures	1
Liste des tableaux	7
Introduction	10
Chapitre 1 : étude bibliographique et objectifs de l'étude	
1.1. Contamination des sols par les éléments traces métalliques et métalloïdes (ETMM)	12
1.1.1. Sources de contamination	12
1.1.2. Contamination des sols liée à l'industrie métallurgique	16
1.1.3 Comportement des ETMM dans les sols	20
1.2. Passage dans les racines et effet des symbioses racinaires	30
1.2.1. Mécanismes de transferts	30
1.2.2. Effet des exsudats racinaires sur le transfert des ETMM	33
1.2.3. Effets des symbioses racinaires	34
1.2.4. Translocation vers les parties aériennes	39
1.3. Tolérance des plantes aux ETMM	40
1.3.1. Phytotoxicité des ETMM	40
1.3.2. Phytométabolites liés aux mécanismes de tolérance	43
1.4. Utilisation des plantes tolérantes aux ETMM en phytoremédiation	47
1.4.1. La phytoextraction	50
1.4.2. La phytostabilisation	56
1.4.3. Risques pour la santé humaine	58
1.5. Problématique de la contamination issue du site de l'Escalette	61
1.5.1. Le site de l'Escalette	61
1.5.2. Historique des activités de l'usine de l'Escalette	62
1.5.3. Etat des connaissances actuelles sur les impacts environnementaux liés à l'ancienne usine de l'Escalette	66
1.5.4. Relevés floristiques sur le site de l'Escalette	76
1.5.5. Cas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. : le romarin	77
1.6. Bilan bibliographique et objectifs de l'étude	79
1.6.1. Bilan bibliographique	79
1.6.2. Objectifs des travaux de thèse	81
Références bibliographiques	84

Chapitre 2 : matériels et méthodes

2.1. Méthodologie et échantillonnage	96
2.1.1. Site d'étude	96
2.1.2. Expérimentation in situ - protocole expérimental	104
2.1.3. Expérimentations en conditions contrôlées – protocole expérimental	109
2.2. Méthodes analytiques	116
2.2.1. Caractérisation biologique et physico-chimique des sols	116
2.2.2. Analyses des ETMM	121
2.2.3. Caractérisation des phytométabolites dans le romarin	130
2.2.4. Suivis physiologiques	140
2.2.5. Analyses statistiques	141
Références bibliographiques	142

Résultats et discussions

Chapitre 3 : Contamination des sols par les ETMM, transferts au romarin *in situ* et évaluation des risques d'exposition humaine

3.1. Caractéristiques physico-chimiques des sols	147
3.1.1. ETMM pseudo-totaux	150
3.1.2. ETMM mobilisables	157
3.1.3. ETMM échangeables	160
3.2. ETMM dans le romarin	163
3.2.1. ETMM, Fe et Mn dans les racines du romarin	163
3.2.2. ETMM, Fe et Mn dans les parties aériennes du romarin	165
3.3. Evaluation des risques d'exposition des riverains et usagers	172
3.4. Conclusion	177
Références bibliographiques	178

Chapitre 4 : mécanismes de tolérance mis en place par le romarin en présence d'ETMM

4.1. Implication des acides aminés et des thiols	182
4.1.1. Histidine	187
4.1.2. Glycine, cystéine et glutathion	188
4.1.3. Thiols libres	190
4.2. Détermination de marqueurs physiologiques chez le romarin	193
4.3. Modification de la composition des huiles essentielles	196
4.4. Conclusion	199
Références bibliographiques	202

Chapitre 5 : évaluation du potentiel de phytostabilisation *in situ* du romarin et estimation de la contribution des symbioses racinaires

5.1. Evaluation de l'accumulation racinaire et des facteurs de bioconcentration et de translocation	207
5.1.1. Accumulation racinaire	207
5.1.2. Facteurs de bioaccumulation racinaire et de translocation	209
5.2. Détermination de l'implication des symbioses racinaires	216
5.3. Evaluation de l'absorption et de l'adsorption racinaire et localisation des ETMM dans les racines	221
5.4. Conclusion	231
Références bibliographiques	232

Chapitre 6 : effet des ETMM sur le romarin en conditions contrôlées et évaluation de l'effet de la rhizosphère dans la tolérance de cette espèce

6.1. Niveau de contamination des sols	237
6.1.1. Métaux et métalloïdes pseudo-totaux	239
6.1.2. Métaux et métalloïdes mobilisables	239
6.2. Croissance et concentrations en ETMM dans les romarins	243
6.2.1. Effet de la contamination sur la croissance du romarin et marqueurs physiologiques	243
6.2.2. Accumulation des ETMM dans les romarins	246
6.3. Etude de la rhizosphère	255
6.3.1 Symbioses racinaires	255

6.3.2. Effet de la pollution sur les exsudations racinaires	257
6.3.3. Evaluation de l'activité microbienne des sols	259
6.4. Conclusion	262
Références bibliographiques	263
Conclusions et perspectives	267
Références bibliographiques	272
Annexes	299

Liste des figures

- Figure 1.1** : Populations soumises aux risques liés aux industries de la métallurgie du plomb (Harris and McCarty, 2011)
- Figure 1.2** : Schéma de l'équilibre dynamique se produisant dans les sols (Lindsay, 1972). Les flèches représentent les processus de réactions (discussion dans le texte).
- Figure 1.3** : Répartition des métaux dans les sols selon leur phytodisponibilité (d'après Morel, 1997).
- Figure 1.4** : Mobilité des ETM en fonction du pH du sol (données pour un sol faiblement minéralisé) d'après Kabata-Pendias, 2000.
- Figure 1.5** : méthode d'extraction séquentielle BCR (Quevauviller, 1997)
- Figure 1.6**: Voies de transport apoplastique et symplastique (Campbell and Reece, 2005)
- Figure 1.7** : Schéma récapitulatif des actions des bactéries favorisant la croissance des plantes, sur la mobilité des ETMM dans la rhizosphère (d'après Rajkumar et al., 2012)
- Figure 1.8** : Schéma d'endomycorhize à arbuscule et à vésicule
- Figure 1.9** : Modèle conceptuel de l'absorption des ETMM par les plantes en relation avec la concentration en ETMM du sol. Les zones désignées "immobilisation des métaux" et "augmentation de l'absorption" montrent une meilleure absorption des ETMM pour les plantes colonisées par les CMA que les plantes non colonisées lorsque la concentration du sol est faible (1), et une absorption moindre dans le cas de sol fortement contaminé (2). La zone de transition entre "augmentation de l'absorption" et "immobilisation des métaux" ne montre pas de différence détectable entre les plantes colonisées ou non (d'après Audet and Charest, 2007)
- Figure 1.10** : Modèle conceptuel de la biomasse relative (%) en relation avec la concentration en ETMM du sol. Les zones de carence (a) pour les sols pauvres en ETMM, optimales (b) pour les sols à teneur en ETMM intermédiaire, et toxicité (c) pour les sols contenant de fortes concentrations en ETMM, sont indiquées. La zone désignée "immobilisation des métaux" met en évidence une biomasse plus importante pour les plantes colonisées par les CMA pour des concentration en ETMM du sol élevées (1), et pas de réponse associée à la colonisation dans les zone de transition et "augmentation de l'absorption" où les teneurs en ETMM dans les sols sont respectivement intermédiaires et faibles (d'après Audet and Charest, 2007)
- Figure 1.11** : Courbe dose réponse montrant l'effet des ETMM essentiels et non essentiels sur la croissance des plantes (d'après Berry et Wallace, 1981).
- Figure 1.12** : Séquestration vacuolaire des ETMM dans la cellule végétale. Après entrée dans la cellule par les transporteurs de la famille ZIP, les ETMM, comme Cd^{2+} se retrouvent dans le cytosol où ils stimulent la phytochélatine synthase (PCS) qui synthétise les phytochélatines (PC) à partir de glutathion. Les complexes PCs- Cd^{2+} formés dans le cytosol sont de faible poids moléculaire (LMW) et sont transportés dans la vacuole par des transporteur localisés sur le tonoplaste : les ATP-binding-cassette (ABC). Dans la vacuole, les complexes de faible poids moléculaire (LMW) deviennent des complexes de haut poids moléculaire (HMW) en accumulant plus de Cd^{2+} , entré dans la vacuole via un échangeur cation/proton (CAX) localisé dans le tonoplaste. Les transporteurs du tonoplaste, MTPs (protéine de tolérance aux métaux) et NRAMPs (protéine de résistance naturelle associée aux macrophages), régule le passage des ions métalliques pour la compartimentation ou la remobilisation. D'autres chélatants

incluant les métallothionéines (MTs), les acides organiques et aminés aident à tamponner la concentration en métal du cytosol (d'après Zhao and Chengcai, 2011).

Figure 1.13 : Structure primaire des phytochélatines (A) et d'un complexe phytochélatine-Cd (B). La structure des phytochélatines est généralement connue comme $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, où $n= 2$ à 11. Les ions métalliques, comme le Cd peuvent être liés à un, deux, trois ou à la capacité maximum, c'est à dire quatre atomes de soufre d'une ou plusieurs molécules de phytochélatines, résultant en des complexes amorphes (d'après Hirata et al., 2005).

Figure 1.14 : Les différentes stratégies de réponse des plantes face à l'accroissement de la concentration en ETMM dans le sol (d'après Baker, 1981).

Figure 1.15 : Les différents types de phytoremédiation : la phytoextraction où les ETMM du sol sont accumulés dans les parties aériennes de la plante, la phytostabilisation où la mobilité des ETMM dans le sol est réduite au niveau des racines, la phytodégradation où les polluants sont dégradés à l'aide d'enzymes, et enfin la phytovolatilisation où les éléments toxiques comme le sélénium, par exemple, sont transformés en éléments volatils moins toxiques (d'après Buchanan et al., 2002)

Figure 1.16 : Principe de la phytoextraction (d'après Padmavathiamma and Li, 2007)

Figure 1.17 : Principe de la phytostabilisation (d'après Padmavathiamma and Li, 2007)

Figure 1.18 : Plan de masse des activités industrielles sur le littoral sud de Marseille au 19^{ième} siècle (Conseil Général des Bouches du Rhône, 2001)

Figure 1.19 : Situation géographique du site de l'Escalette (d'après Airmaraix, 2003)

Figure 2.20 : Schéma du procédé d'extraction du plomb à partir de la galène (rapport Maeva, 2007 ; Testiati, 2012).

Figure 1.21: Vue aérienne de l'ancienne usine de l'Escalette.

Figure 1.22 : Plan des points de prélèvements pour la cartographie des contaminations en ETMM dans le massif des Calanques (Marséco 2008, Testiati, 2012).

Figure 1.23 : Zone côtière des calanques de Marseille : contaminations par l'élément plomb, Pb (projet Marséco – travail collectif, réalisation carte E. Dumas, 2012)

Figure 1.24 : Zone côtière des calanques de Marseille : contaminations par l'élément Zinc, Zn (projet Marséco– travail collectif, réalisation carte E. Dumas, 2012)

Figure 1.25 : Zone côtière des calanques de Marseille : contaminations par l'élément Arsenic, As (projet Marséco– travail collectif, réalisation carte E. Dumas, 2012)

Figure 1.26 : Concentrations maximales (mg/kg) mesurées dans les parties aériennes et dans les racines de romarin sur le site de l'Escalette (Testiati, 2012).

Figure 2.1 : Carte géographique de la côte au sud de Marseille (BRGM, 2012)

Figure 2.2 : Données météorologiques relevées à Marseille durant l'année 2007-2008 (Météo-France).

Figure 2.3 : Direction et vitesse du vent à la station Météo-France de Borely (entre 2003 et 2006) (source données Météo-France).

Figure 2.4: Schéma géologique de la zone des Calanques (Molinier, 1935)

Figure 2.5: Schéma structural de la répartition des habitats terrestres sur le calcaire karstique d'après P. Moutte (GIP des Calanques, 2008)

Figure 2.6 : Photographie de romarin dans les Calanques de Marseille

Figure 2.7 : Schéma du protocole expérimental pour l'étude *in situ*

Figure 2.8 : Localisation géographique des 8 sites de prélèvement

Figure 2.9 : Photographie satellite de la zone de l'Escalette et position des sites G0 à G3.

Figure 2.10 : Photographie satellite avec les positions des sites G1 à G5.

- Figure 2.11** : Photographie satellite du massif de Marseilleveyre avec position des sites G0 à G6 et de S3.
- Figure 2.12** : Plan expérimental de l'étude en conditions contrôlées : organisation des rhizotrons
- Figure 2.13** : Schéma du protocole expérimental pour l'étude en conditions contrôlées
- Figure 2.14** : Schéma d'un rhizotron (vues transversale et frontale)
- Figure 2.15**: Schéma récapitulatif des manipulations non destructives effectuées durant les 6 mois de culture des romarins en rhizotrons dans les phytotrons
- Figure 2.16** : à gauche : photographie d'un système Oxitop® ; à droite: exemple de cinétique de dépression pouvant être obtenu.
- Figure 2.17**: Procédure de fermeture des réacteurs de minéralisation pour le four micro-onde
- Figure 2.18**: Molécule d'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) complexée ou non avec un cation métallique
- Figure 2.19** : Réaction de dérivation entre le groupe thiol et l'éthylpropiolate (Zacharis et al., 2009).
- Figure 2.20** : Montage de l'appareil de type Clevenger utilisé pour l'obtention des huiles essentielles de romarin.
- Figure 3.1** : Analyse en composante principale (ACP) des caractéristiques des sols du transect et de référence. A droite, tableau de contribution des variables aux dimensions de l'ACP.
- Figure 3.2** : histogramme de la concentration moyenne des sols en As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn des différents sites étudiés en mg/kg de sol sec. De G0 à G6 ; points du transect, S3 : référence. Pour un élément, les barres surmontées de la même lettre ne présentent pas de différence significative (test de Wilcoxon, $p < 0,05$).
- Figure 3.3** : analyse en composante principale (ACP) de la contamination en ETMM pseudo totale des sols. A gauche : tableau de contribution des variables aux dimensions de l'ACP
- Figure 3.4** : concentrations des ETMM mobilisables du sol (mg/kg) en fonction de leur concentration pseudo-totale dans le sol (mg/kg). Echelle logarithmique. de G0 à G6 ; points du transect, S3 : référence.
- Figure 3.5** : Concentrations en ETMM échangeables du sol (mg/kg) en fonction de leur concentration pseudo-totale dans le sol (mg/kg). Echelle logarithmique. De G0 à G6 ; points du transect, S3 : référence.
- Figure 3.6** : boîtes à moustache des concentrations (mg/kg) en As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn dans les racines des romarins des sites étudiés. De G0 à G6 : points du transect, S3 : référence. Pour un élément, les boîtes à moustache surmontées de la même lettre ne présentent pas de différence significative (test Wilcoxon, $p < 0,05$).
- Figure 3.7** : boîtes à moustache des concentrations ($\mu\text{g/g}$) en As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn dans les feuilles (f) et tiges (t) des romarins des sites étudiés. De G0 à G6 ; points du transect, S3 : référence. Pour As et Sb, les valeurs des mesures qui sont hors de l'échelle du graphique sont indiquées. Elles sont montrées par une flèche surblombée d'un rond. Pour un élément et un même organe, les boîtes à moustache surmontées de la même lettre ne présentent pas de différence significative (test de Wilcoxon, $p < 0,05$).
- Figure 3.8** : concentrations log-transformées en As, Pb, Sb et Zn ($\mu\text{g/g}$) dans les parties aériennes en fonction des concentrations log-transformées de sol pseudo-totale ($\mu\text{g/g}$). De G0 à G6 ; points du transect, S3 : référence
- Figure 4.1** : schéma récapitulatif des voies de biosynthèse de l'histidine (en bleu), du glutathion et des phytochélatines (en rouge). Les enzymes impliquées dans les transformations sont en noir et en italique, les sous produits en noir. Les régulations positives (+) et négatives (-) connues sont indiquées par les flèches pointillées. Pi : phosphate

inorganique, α -KG : alpha ketoglutarate. (D'après Noctor et al., 1998; Cobbett, 2000; Stepansky and Leustek, 2006).

Figure 4.2 : Schéma récapitulatif des corrélations significatives mises en évidence entre les concentrations en acide aminé et les concentrations en métaux et métalloïdes dans les différents organes du romarin

Figure 4.3 : boîte à moustache des concentrations en thiols dans les parties aériennes de romarin des sites de G1 à G6 du transect. Les boîtes à moustache surmontées de la même lettre ne présentent pas de différence significative (test de Wilcoxon, $p < 0,05$)

Figure 4.4 : boîtes à moustache des indices de chlorophylles, flavonols, phénols et anthocyanes obtenus pour les sites de G1 à G6 du transect. Les boîtes à moustache surmontées de la même lettre ne présentent pas de différence significative (test de Wilcoxon, $p < 0,05$)

Figure 4.5 : concentrations en Pb dans les feuilles de romarin en fonction des indices de chlorophylle et de phénol mesurés sur les individus des sites de G1 à G6

Figure 4.6 : Analyse de co-inertie entre la composition chimique des huiles essentielles et la contamination du sol en ETMM pour les romarins et les sols des sites G0 et S3

Figure 4.7 : schéma récapitulatif des mécanismes de tolérance mis en place par le romarin en cas de contamination par les ETMM dans le sol et des marqueurs du stress métallique.

Figure 5.3 : concentrations racinaires en fonction des concentrations pseudo-totales dans les sols pour As, Pb, Sb et Zn (échelle logarithmique). De G0 à G6 : points du transect, S3 : site référence

Figure 5.2 : facteurs de bioconcentration racinaire moyens pour As, Pb, Sb et Zn obtenus sur tous les sites étudiés. De G0 à G6 : points du transect, S3 : site référence. Les boîtes à moustaches surmontées d'une même lettre ne présentent pas de différence significative (test Wilcoxon $p < 0,05$)

Figure 5.3 : facteurs de translocation de As, Pb, Sb et Zn dans les romarins en fonction de la concentration pseudo-totale dans les sols en ETMM (échelle logarithmique). De G0 à G6 : points du transect, S3 : site référence

Figure 5.4 : résumé des valeurs de moyennes TF et BCF pour le plomb par site (de G0 à G6 : points du transect, S3 : site référence). BCF_{tot} : facteur de bioconcentration calculé à partir de la concentration en ETMM pseudo-totale du sol, BCF_{mob} : facteur de bioconcentration calculé à partir de la concentration en ETMM mobilisable du sol, BCF_{éch} : facteur de bioconcentration calculé à partir de la concentration en ETMM échangeable du sol, TF : facteur de translocation.

Figure 5.5 : photos des structures fongiques formées par des champignons endomycorhiziens dans les racines de romarin. Grossissement entre parenthèse A : arbuscule intracellulaire ; B : racine de romarin colonisée, présentant des vésicules (V) et des filaments mycéliens ; C : détail d'une vésicule ; D : spore (S) ouverte de champignon, E : mycélium extra-radiculaire endomycorhizien.

Figure 5.6 : Pourcentage de colonisation par les champignons endomycorhiziens à arbuscules en fonction de la concentration pseudo-totale de As, Pb, Sb et Zn dans le sol (échelle semi-logarithmique). De G0 à G6 : points du transect, S3 : site référence

Figure 5.7 : photos des endophytes foncés septés observés dans les racines de romarin, avec de gauche à droite : des microsclérotés ; des microsclérotés liées au mycélium ; du mycélium de DES (grossissement : $\times 400$)

Figure 5.8 : pourcentage de colonisation des racines de romarin par les DSE en fonction de la concentration pseudo-totale du sol en As, Pb, Sb et Zn (échelle semi-logarithmique). De G1 à G6 : points du transect.

- Figure 5.9** : pourcentage d'ETMM absorbés par les racines de romarin poussant dans un sol très contaminé en As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn (site G0)
- Figure 5.10** : concentrations en As, Pb, Sb et Zn dans des racines de tailles différentes échantillonnées sur un romarin poussant sur un sol contaminé (site G0).
- Figure 5.11** : photos des échantillons de racine analysés en micro-spectroscopie de fluorescence X et cartographie obtenue pour chaque échantillons pour deux éléments : Pb et Zn
- Figure 5.12a** : spectre d'analyse X de la racine primaire (spectre 1) et d'une racine secondaire (racine 2) pour laquelle deux spectres ont été réalisés : spectre 2a dans une partie de la racine où Pb et Zn ont été détectés lors de la cartographie, et spectre 2b à coté de la racine afin d'éliminer un potentiel bruit de fond
- Figure 5.12b**: spectre d'analyse X d'une racine secondaire (racine 3) pour laquelle deux spectres ont été réalisés : spectre 3a dans une partie de la racine où Pb et Zn ont été détectés lors de la cartographie, et spectre 3b à coté de la racine afin d'éliminer un potentiel bruit de fond.
- Figure 6.1**: concentrations pseudo-totales en As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn (en $\mu\text{g/g}$ de sol sec) des sols des rhizotrons en fin d'expérimentation. Rhizotrons 1 et 2 : sol témoin, rhizotrons 3 et 4 : contamination 1, rhizotrons 5 et 6 : contamination 2, rhizotrons 7 et 8 : multi-contamination. Les rhizotrons avec un chiffre pair ont reçu un ajout de cystéine. Pour un même élément, les histogrammes surmontés d'une même lettre ne présentent pas de différence significative (test Wilcoxon, $p < 0,05$)
- Figure 6.2** : concentrations en As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn mobilisables (en $\mu\text{g/g}$ de sol sec) des sols des rhizotrons en fin d'expérimentation. Rhizotrons 1 et 2 : sol témoin, rhizotrons 3 et 4 : contamination 1, rhizotrons 5 et 6 : contamination 2, rhizotrons 7 et 8 : multi-contamination. Les rhizotrons avec un chiffre pair ont reçu un ajout de cystéine. Pour un même élément, les histogrammes surmontés d'une même lettre ne présentent pas de différence significative (test Wilcoxon, $p < 0,05$)
- Figure 6.3** : indices de phénols (en haut) et de chlorophylles (en bas) moyens mesurés sur les romarins des rhizotrons à 1 mois (gauche), 3 mois (milieu) et 6 mois (droite) de culture. Rhizotrons 1 et 2 : sol témoin, rhizotrons 3 et 4 : contamination 1, rhizotrons 5 et 6 : contamination 2, rhizotrons 7 et 8 : multi-contamination. Les rhizotrons avec un chiffre pair ont reçu un ajout de cystéine. Pour un même élément, les boîtes à moustache surmontées d'une même lettre ne présentent pas de différence significative (test Wilcoxon, $p < 0,05$). Les résultats du rhizotron 5 ne concernant que 2 individus à 3 et 6 mois, et les tests de comparaison de moyenne n'étant pas valables dans ce cas, les boîtes à moustache de cette condition ne sont surmontées d'aucune lettre. Indice sans unité
- Figure 6.4** : concentrations moyennes en As, Pb, Sb et Zn (en $\mu\text{g/g MS}$) dans les parties aériennes des romarins des rhizotrons en fin d'expérimentation. Rhizotrons 1 et 2 : sol témoin, rhizotrons 3 et 4 : contamination 1, rhizotrons 5 et 6 : contamination 2, rhizotrons 7 et 8 : multi-contamination. Les rhizotrons avec un chiffre pair ont reçu un ajout de cystéine. Pour un même élément, les boîtes à moustache surmontées d'une même lettre ne présentent pas de différence significative (test Wilcoxon, $p < 0,05$). Echelle logarithmique
- Figure 6.5** : concentrations moyennes en As, Pb, Sb et Zn (en $\mu\text{g/g MS}$) dans les racines des romarins des rhizotrons en fin d'expérimentation. Rhizotrons 1 et 2 : sol témoin, rhizotrons 3 et 4 : contamination 1, rhizotrons 5 et 6 : contamination 2, rhizotrons 7 et 8 : multi-contamination. Les rhizotrons avec un chiffre pair ont reçu un ajout de cystéine. Pour un même élément, les boîtes à moustache surmontées d'une même lettre ne présentent pas de différences significatives (test Wilcoxon, $p < 0,05$). Les

résultats du rhizotron 5 ne concernant que 2 individus et les tests de comparaison de moyenne n'étant pas valables dans ce cas, les boîtes à moustache de cette condition ne sont surmontées d'aucune lettre. Concentrations présentées suivant une échelle logarithmique.

Figure 6.6 : Pourcentage de colonisation par les CMA (champignons endomycorhiziens à arbuscules) (à gauche) et par les DES (champignons foncés septés) (à droite), des racines des romarins ayant poussés dans les rhizotrons, en fin d'expérimentation. Rhizotrons 1 et 2 : sol témoin, rhizotrons 3 et 4 : contamination 1, rhizotrons 5 et 6 : contamination 2, rhizotrons 7 et 8 : multi-contamination. Les rhizotrons avec un chiffre pair ont reçu un ajout de cystéine. Pour un même graphique, les boîtes à moustache ne présentant pas de différence significative sont surmontées d'une même lettre (test Wilcoxon, $p < 0,05$).

Figure 6.7 : mesure de la respiration en $\text{mg d'O}_2/\text{g de sol sec/ jour}$ des sols des rhizotrons. Rhizotrons 1 et 2 : sol témoin, rhizotrons 3 et 4 : contamination 1, rhizotrons 5 et 6 : contamination 2, rhizotrons 7 et 8 : multi-contamination. Les rhizotrons avec un chiffre pair ont reçu un ajout de cystéine. Pour un même graphique, les boîtes à moustache ne présentant pas de différence significative sont surmontées d'une même lettre (test Wilcoxon, $p < 0,05$).

Liste des tableaux

- Tableau 1.1** : Abondance des métaux et métalloïdes (MM) dans la roche mère (gamme) et les sols (moyenne) (mg/kg). (Kabata-Pendias, 2011)
- Tableau 1.2** : Pourcentage représentatif des sites pollués par les métaux en France (BASOL, 2012)
- Tableau 1.3** : Exemples d'espèces accumulatrices (d'après Padmavathiamma and Li, 2007)
- Tableau 1.4** : Concentrations totales en ETMM dans les scories et les encroûtements de la cheminée rampante, sur site de l'ancienne usine de l'Escalette (en mg.kg⁻¹ ou ppm) (Testiati, 2012).
- Tableau 2.1** : Données climatiques de Marseille (entre 1971 et 2000, WMO 2012)
- Tableau 2.2** : Paramètres physico-chimique de l'eau de source Mont Roucous®
- Tableau 2.3** : Paramètres expérimentaux de l'ICP-AES utilisés pour la quantification de As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn dans les solutions d'extraits des ETMM.
- Tableau 2.4** : Paramètres expérimentaux du GF-AAS pour la quantification de l'arsenic, de l'antimoine et du plomb
- Tableau 2.5** : Gradient d'éluion utilisé pour le dosage des acides aminés en chromatographie ionique
- Tableau 2.6** : Représentation des différents potentiels et temps d'application à l'électrode pour la détection ampérométrique
- Tableau 3.1** : Granulométrie moyenne (\pm écart-type) en g/kg des sols des différents sites étudiés (n=5). De G0 à G6 ; points du transect, et S3 : référence.
- Tableau 3.2** : Principales caractéristiques chimiques des sols (Capacité d'échange cationique, azote total Kjeldahl (en pourcentage), carbone total (en pourcentage), phosphore échangeable et pH). De G0 à G6 ; points du transect, et S3 : référence
- Tableau 3.3** : facteurs de contamination moyens pour les métaux et métalloïdes sur les sites de G0 à G6 (points du transect), calculés en fonction de la concentration de S3 (site référence)
- Tableau 3.4** : Seuils de concentrations en ETMM dans les sols exprimé en mg/kg (sol sec), définis en Russie (pour un sol neutre i.e. pH> 5,5), en Hollande (valeur de référence), au Canada (pour les zones industrielles) et en Turquie ; valeurs des PNEC (Predictable Non Effect Concentration) et valeurs medianes dans les sols agricoles français.
- Tableau 3.5** : fraction mobilisable moyenne (\pm écart-type) des ETMM du sol (en pourcentage) pour As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn des sites étudiés. De G0 à G6 ; points du transect, S3 : référence.
- Tableau 3.6** : fraction échangeable moyenne (\pm écart-type) du sol (en pourcentage) de As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn pour les différents sites étudiés (de G0 à G6 ; points du transect, S3 : référence)
- Tableau 3.7** : Valeurs de corrélation (test de Pearson $p<0,05$) entre les paramètres physico-chimiques du sol (CEC, Carbonique organique, pH) et les concentrations pseudo-totales, échangeables et mobilisables de As, Pb, Sb et Zn. (ns : corrélations non significatives)

- Tableau 3.8** : valeurs des facteurs de bioconcentration moyens (\pm écart-type) des parties aériennes de romarin, ($[M_{\text{parties aériennes}}]/[M_{\text{sol pseudo-total}}]$) pour As, Pb, Sb et Zn sur les sites étudiés. De G0 à G6 ; points du transect, S3 : référence)
- Tableau 3.9** : concentrations moyennes (\pm écart-type) en As et Pb ($\mu\text{g/g}$) dans les feuilles des différents sites (de G0 à G6 ; points du transect, S3 : référence), comparé aux valeurs réglementaires concernant les herbes médicinales.
- Tableau 3.10** : concentrations (en $\mu\text{g/L}$) moyennes (\pm écart-type) en As, Cu, Pb, Sb et Zn dans les infusions de romarins de G0 et S3, et valeurs réglementaires concernant les eaux de boisson. Pour un même colonne, les valeurs suivies de la même lettre ne présentent pas de différence significative (test de Wilcoxon, $p < 0,05$)
- Tableau 3.11** : taux de transfert moyens (en pourcentage) (\pm écart-type) des ETMM dans les infusions.
- Tableau 3.12** : quantités minimales de feuilles de romarin (g de MS) de chacun des sites étudiés (de G0 à G6 ; points du transect, S3 : référence) à consommer pour atteindre les doses journalières admissibles (DJA) de As, Cu, Pb et Sb (pas de valeurs pour Zn)
- Tableau 3.13** : quantités minimales d'infusion de romarin (en L) de G0 et S3, à consommer pour atteindre les doses journalières admissibles (DJA) de As, Cu, Pb et Sb (pas de valeurs disponibles pour Zn)
- Tableau 4.1** : concentrations moyennes en nmol/g MF (\pm écart type) d'histidine, glycine, cystéine et glutathion mesurées dans les feuilles, tiges et racines des romarins prélevés sur les sites étudiés. De G0 à G6 : points du transect, S3 : référence.
- Tableau 4.2** : coefficients de corrélation (test de Pearson, $p < 0,05$) entre les concentrations en acide aminé dans les parties aériennes et dans les racines
- Tableau 4.3** : Composition chimique moyenne, exprimée en pourcentage, des huiles essentielles pour chaque population de romarin des sites G0 et S3. Les composés majeurs sont en gras.
- Tableau 5.1** : valeurs des coefficients de corrélation de Pearson ($p < 0,05$) entre les concentrations pseudo-totales, mobilisables et échangeables des sols, et les concentrations racinaires des romarins pour As, Pb, Sb et Zn au niveau des différents sites du transect et de S3.
- Tableau 5.2** : facteurs de bioconcentration racinaire moyens \pm écart-type calculés avec les concentrations en ETMM mobilisables et échangeables dans les sols pour As, Pb, Sb et Zn sur tous les sites étudiés.
- Tableau 6.1** : concentration en Pb pseudo-total, mobilisable et échangeable (en mg/kg) et pH des sols utilisés pour les rhizotrons, après 5 mois de stabilisation
- Tableau 6.2** : fraction mobilisable (en pourcentage) d'As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn dans les sols des rhizotrons en fin d'expérimentation. Rhizotrons 1 et 2 : sol témoin, rhizotrons 3 et 4 : contamination 1, rhizotrons 5 et 6 : contamination 2, rhizotrons 7 et 8 : multi-contamination. Les rhizotrons avec un chiffre pair ont reçu un ajout de cystéine.
- Tableau 6.3** : Biomasses sèches moyennes et teneurs en eau moyennes (\pm écart-type) pour les racines et les parties aériennes des romarins des rhizotrons en fin d'expérimentation. Rhizotrons 1 et 2 : sol témoin, rhizotrons 3 et 4 : contamination 1, rhizotrons 5 et 6 : contamination 2, rhizotrons 7 et 8 : multi-contamination. Les rhizotrons avec un chiffre pair ont reçu un ajout de cystéine. Pour une même colonne, les valeurs ne présentant pas de différence significative sont suivies d'une même lettre (test Wilcoxon, $p < 0,05$).

- Tableau 6.4** : valeurs des facteurs de bioconcentration (BCF_{pa}) moyennes (\pm écart-type) dans les parties aériennes de romarin ($[M_{parties\ aériennes}]/[M_{sol\ pseudo-total}]$) pour As, Pb, Sb et Zn dans les rhizotrons en fin d'expérimentation. Rhizotrons 1 et 2 : sol témoin, rhizotrons 3 et 4 : contamination 1, rhizotrons 5 et 6 : contamination 2, rhizotrons 7 et 8 : multi-contamination. Les rhizotrons avec un chiffre pair ont reçu un ajout de cystéine.
- Tableau 6.5** : Valeurs des facteurs de bioconcentration racinaire (BCF_r) moyennes (\pm écart-type) dans les romarins ($[M_{racines}]/[M_{sol\ pseudo-total}]$) pour As, Pb, Sb et Zn dans les rhizotrons en fin d'expérimentation. Rhizotrons 1 et 2 : sol témoin, rhizotrons 3 et 4 : contamination 1, rhizotrons 5 et 6 : contamination 2, rhizotrons 7 et 8 : multi-contamination. Les rhizotrons avec un chiffre pair ont reçu un ajout de cystéine.
- Tableau 6.6** : Valeurs des facteurs de translocation (TF) moyennes (\pm écart-type) dans les romarins ($[M_{parties\ aériennes}]/[M_{racine}]$) pour As, Pb, Sb et Zn dans les rhizotrons en fin d'expérimentation. Rhizotrons 1 et 2 : sol témoin, rhizotrons 3 et 4 : contamination 1, rhizotrons 5 et 6 : contamination 2, rhizotrons 7 et 8 : multi-contamination. Les rhizotrons avec un chiffre pair ont reçu un ajout de cystéine.
- Tableau 6.7** : masses moyennes (\pm écart-type) de As, Pb, Sb et Zn (en μg) accumulées dans les romarins entiers et dans les parties racinaires, au bout de 6 mois de croissance dans les rhizotrons. Rhizotrons 1 et 2 : sol témoin, rhizotrons 3 et 4 : contamination 1, rhizotrons 5 et 6 : contamination 2, rhizotrons 7 et 8 : multi-contamination. Les rhizotrons avec un chiffre pair ont reçu un ajout de cystéine.
- Tableau 6.8** : estimation de la quantité d'acides organiques exsudés par les racines des romarins soumis aux différentes conditions de contamination. Témoin : sol de G6, contamination 1 : sol de G6 + 10 $\mu g/g$ Pb, contamination 2 : sol de G6 + 100 $\mu g/g$ Pb, multi-contamination : sol de G0.

Introduction

Les éléments traces métalliques et métalloïdes (ETMM) sont naturellement présents dans l'environnement du fait de leur existence dans la croûte terrestre. Cependant, dans le contexte de raréfaction des terres arables, ils deviennent un problème environnemental majeur puisque des concentrations élevées dans les sols (en comparaison à la contamination de fond) sont détectées dans les zones agricoles et industrielles. Selon leur spéciation, qui influence leur mobilité et leur biodisponibilité (Kabata-Pendias, 2004), les ETMM peuvent potentiellement affecter la santé humaine soit directement, par inhalation et ingestion (mains sales à la bouche, consommation de légumes non lavés exposés aux poussières de sites contaminés), soit indirectement via le réseau trophique (Intawongse and Dean, 2006) puisque ces éléments peuvent être assimilés et bio-accumulés par les plantes (Zheng et al., 2007) et les animaux (Reglero et al., 2008; Zhuang et al., 2009) avec parfois des phénomènes de bioamplification (Mann et al., 2011).

Dans l'agglomération de Marseille (sud-est de la France), de nombreuses ruines et friches industrielles sont visibles, faisant suite à l'activité industrielle passée (19^{ème} siècle, début 20^{ème} siècle). Localement, la métallurgie fut l'activité principale, avec pour conséquence des anciens sites industriels pollués par les ETMM et abandonnés (Daumalin and Raveux, 2005). C'est le cas de l'ancienne usine de l'Escalette, située dans le cœur de l'actuel Parc National des Calanques, qui transformait la galène en plomb et dont les vestiges sont encore présents (contamination des sols sur tout le site et des milliers de m³ de scories et autres dépôts) (Raveux, 2002). Cependant, les études menées dans le cadre du projet ANR Marséco (Marséco, 2012) ont montré que cette contamination ne se limite pas à l'enceinte de l'ancienne usine. En effet, les dépôts atmosphériques, notamment, sont à l'origine d'une pollution diffuse touchant les collines environnantes. Du fait de la localisation dans le Parc National des Calanques, une réflexion pour la remédiation de cette zone semble nécessaire. Cependant, le contexte particulier ainsi que l'ampleur de la contamination excluent le recours à des méthodes de dépollution conventionnelles sur l'ensemble du territoire concerné. Une démarche de restauration écologique semble la solution la plus adaptée, dans ce contexte particulier, concernant la pollution diffuse. La phytoremédiation, et particulièrement la phytostabilisation, réalisée à l'aide d'une espèce autochtone, permettrait d'aller dans ce sens. En effet, malgré la forte contamination, de nombreuses espèces végétales natives, caractéristiques de la végétation de type matorral, dont *Rosmarinus officinalis*, *Cistus albidus*, *Quercus coccifera* et *Pistacia lentiscus*, ont colonisé la zone. Parmi ces espèces, le romarin (*Rosmarinus officinalis*), dont le caractère pérenne et le

réseau racinaire dense en font un candidat intéressant pour la phytostabilisation, a montré une tolérance à des niveaux de contamination extrêmes en ETMM (Testiati, 2012). De plus, des études récentes suggèrent son potentiel pour la phytostabilisation de sols contaminés par les ETMM (Madejon et al., 2009). Cependant, avant de mettre en place un tel processus, plusieurs études sont nécessaires, concernant notamment la capacité d'accumulation des ETMM par l'espèce considérée, ainsi que les phénomènes impliqués dans sa tolérance aussi bien au niveau rhizosphérique qu'au niveau cellulaire. De plus, le romarin étant une espèce comestible, prisée dans la cuisine méditerranéenne et en phytothérapie pour ses propriétés aromatiques et médicinales, l'évaluation des risques pour la santé, en cas de consommation de romarin provenant de sites contaminés, est indispensable.

Ainsi, cette étude se propose de déterminer l'ampleur et l'étendue de la contamination diffuse en ETMM liée à l'activité de l'ancienne usine de l'Escalette au niveau des sols et le risque de transfert à un segment de la chaîne trophique, représenté ici par le romarin. Elle a également pour ambition d'élucider les capacités d'accumulation des ETMM par le romarin, d'estimer les risques pour la santé des consommateurs et d'approcher les mécanismes de tolérance mis en place par cette espèce. Enfin, les effets et implications de la rhizosphère (symbioses racinaires, biomasse microbienne) dans les phénomènes de tolérance et d'accumulation seront examinés.

Chapitre 1 :

Etude bibliographique et objectifs de l'étude

*"Comme tout le Monde le sait, la bibliographie se fait après et non avant d'aborder un sujet de
recherche..."*

Jean Perrin

La question des contaminations liées aux activités métallurgiques, à la fois au niveau des exploitations minières ou des usines de fonderies métalliques, peut être cruciale pour l'environnement et la santé, et ceci d'autant plus lorsque les sites pollués sont dits orphelins c'est à dire à responsabilité défaillante. Il apparaît donc important de faire des recherches bibliographiques afin de mieux circonscrire la nature et l'étendue des contaminations liées aux activités métallurgiques. Sachant que ces sites, et en particuliers leurs sols, présentent en général des teneurs élevées en éléments traces métalliques et métalloïdes (ETMM), il s'avère intéressant dans un premier temps de dresser un bilan sur le comportement de ces composés dans les sols. Puis, afin d'aborder la tolérance des plantes aux ETMM, une synthèse bibliographique sur les mécanismes de transfert des ETMM aux plantes ainsi que sur les mécanismes de tolérance et les conditions de phytoremédiation, sera développée. Une analyse des dangers et risques pour la santé humaine, liés à la présence des ETMM dans les plantes, viendra compléter le point précédent. Enfin, concernant notre site d'étude, une synthèse sur l'historique des activités de l'Escalette ainsi qu'un bilan sur l'état des connaissances concernant les pollutions sur le site et dans le massif des calanques, semblent nécessaires. Ce chapitre se conclura alors par un bilan bibliographique et la présentation des objectifs généraux et spécifiques de ces travaux de thèse.

1.1. Contamination des sols par les éléments traces métalliques et métalloïdes (ETMM)

1.1.1. Sources de contamination

A très faibles concentrations et en équilibre les uns avec les autres, certains métaux (cobalt, nickel, cuivre ou zinc, etc) sont indispensables aux organismes vivants : ce sont les oligoéléments. Le cobalt est par exemple un régulateur du système neurovégétatif tandis que le cuivre est un anti-infectieux et un anti-inflammatoire. D'autres ETMM sont toujours toxiques : même à faibles concentrations, le plomb ou le mercure provoquent des troubles neurologiques quelle que soit leur forme chimique. Par contre, seuls les composés organiques de l'étain ou les composés inorganiques de l'arsenic sont toxiques (Bril and Bollinger, 2006).

Le terme "éléments traces" possède différents sens suivant le domaine dans lequel il est utilisé. Par exemple, en science de la terre, les éléments traces sont les éléments qui ne font pas partie des huit éléments que l'on retrouve le plus abondamment dans les roches (O, Si, Al, Fe, Ca, Na, K, Mn et Mg). D'un point de vue géochimique, le terme "éléments traces" est utilisé pour les

éléments présents dans la croûte terrestre à des concentrations inférieures à 1000 mg/kg (0,1%). Cependant, en général, les éléments traces font référence aux éléments présents naturellement en faible quantité dans les environnements naturels et perturbés, et qui, lorsqu'ils sont présents à des concentrations bio-accumulables excessives, sont toxiques pour les organismes vivants (Blum et al., 2009). C'est le cas notamment de l'arsenic, du cadmium, du cuivre, du plomb, de l'antimoine et du zinc.

Tous les sols contiennent naturellement des éléments trace métalliques provenant à la fois de processus naturels, contribuant ainsi au fond géochimique, et d'activités humaines. Le fond géochimique est par définition "la teneur naturelle ou originelle en éléments traces dans un sol en absence de tout processus d'apport ou d'exportation vers ou hors d'un site considéré" (Baize, 1997). Cette teneur dépend donc de la teneur de la roche mère (tableau 1.1) et des processus pédogénétiques qui ont conduit à la formation du sol. Les ETMM proviennent en partie de la dégradation de la roche mère constituée d'une large variété de minéraux dans lesquels ils sont présents (He et al., 2005). L'abondance de certains métaux et ETMM dans la croûte terrestre et leurs concentrations moyennes dans les sols mondiaux sont présentés dans le tableau 1.1.

Plusieurs types de groupements peuvent être faits à partir de cette liste d'éléments trace. Chimiquement, il est possible de distinguer les métaux (Cu, Pb, Zn, Ni, Cr, etc) et les métalloïdes (As et Sb) qui ne possèdent pas les mêmes caractéristiques physico-chimiques. Au niveau biologique, les oligo-éléments (Cu, Ni, Zn, etc), essentiels au fonctionnement des organismes vivants à faibles doses, et toxiques à très fortes doses, sont distingués des xénobiotiques (As, Cd, Hg, Pb, Sb) qui ne jouent aucun rôle dans le métabolisme, et sont toxiques à fortes doses.

Qu'ils soient d'origine naturelle ou anthropique, les ETMM se présentent de manière concentrée (fortes teneurs sur des volumes restreints et une source bien identifiée) dans le cas de sources ponctuelles comme les gisements de métaux, les zones industrielles ou les villes, ou bien de manière diffuse (faibles teneurs sur de grands volumes) pour les anomalies géochimiques naturelles ou les pollutions d'origine agricole.

Tableau 1.1 : Abondance des métaux et métalloïdes (MM) dans la roche mère (gamme) et les sols (moyenne) (mg/kg). (Kabata-Pendias, 2011)

Eléments	Roche mère	Sols
	mg/kg	mg/kg
As	1,8 – 2,5	6,83
Cu	25 – 27	38,9
Fe	45000 – 50000	35000
Mn	716 – 1400	488
Pb	14 – 15	27
Sb	0,2 – 0,9	0,67
Zn	52 - 80	70

La présence d'ETMM dans les sols pouvant être source de contamination de la chaîne trophique, il est essentiel de connaître l'étendue des contaminations, ainsi que leur source.

Ces sources peuvent être naturelles (Bril and Bollinger, 2006) :

- Anomalies géochimiques : les gisements de métaux (plomb, zinc, or, uranium...) ont été formés naturellement par la circulation de fluides chauds dans des fractures de la croûte terrestre qui ont mis en solution une partie des ETMM rencontrés sur leur trajet, les ont concentrés puis déposés à des kilomètres de leur point de départ : dans un gisement de plomb à 3 % (30 000 ppm), cet élément est 1 700 fois plus concentré que dans la moyenne de la croûte terrestre.
- Les volcans : chaque année, une soixantaine de volcans entrent en éruption. Ils émettent des quantités considérables d'ETMM : en Sicile, l'Etna rejette annuellement 1 100 t de zinc, 130 t de plomb et 40 t d'arsenic sous forme gazeuse. Les ETMM se trouvent également dans les magmas qui donnent les roches volcaniques : avec des teneurs moyennes de 200 mg/kg de nickel, une coulée de basalte de 10 km de long, 10 m de large et 10 m de haut contient 600 t de ce métal.

Ces sources sont aussi et surtout d'origine anthropique. La pollution des milieux par les ETMM s'est dramatiquement accélérée depuis le début de la révolution industrielle. Les principales sources de pollution en ETMM sont la combustion du pétrole, les exploitations minières et les

fonderies de minerai métallifère, les déchets ménagers, les engrais, les pesticides et les eaux usées (Memon and Schroder, 2009).

- **Les mines** : les exploitations minières laissent des terrils de déchets appelés abusivement « stériles » qui contiennent des milliers de tonnes de métaux et de substances connexes (Bril and Bollinger, 2006). Ainsi, l'arsenic est un déchet des gisements d'or et d'uranium : un minerai aurifère contient environ 1 kg d'arsenic pour 1 g d'or. Les travaux miniers laissent aussi des galeries souterraines et des carrières remplies de déchets miniers.

- **L'industrie** : les industries de transformation sont à l'origine de nombreuses pollutions métalliques. Comme les terrils miniers, chaque crassier industriel contient des centaines de milliers de tonnes de déchets renfermant des ETMM à des teneurs de plusieurs %. Les fumées des centres industriels ou des centrales thermiques sont riches en métaux et en soufre : en 2002, 18 t d'arsenic ont été émises de cette manière en France ; dispersées par le vent, les microparticules solides des fumées se déposent sur les sols avoisinants jusqu'à plusieurs kilomètres de la cheminée émettrice. Les traitements anticorrosion (traitements de surface) sont également des sources de métaux; leurs déchets sont des solutions acides, très polluantes.

- **Les villes** : l'incinération des déchets ménagers qui paraît intéressante, produit cependant des « résidus de fumées d'incinération » (REFIOM), représentant environ 4 % des déchets brûlés. Les 123 incinérateurs français produisent en outre 4 millions de tonnes annuelles de mâchefers d'incinération (MIOM), soit 25 % de la masse des déchets brûlés. Ces résidus sont des phases solides cristallisées, peu stables dans les conditions atmosphériques, qui concentrent les ETMM et d'autres substances indésirables. Ils doivent donc être stockés après solidification et stabilisation dans des décharges très imperméabilisées (dites de classe I) ou inertés (enrobés ou vitrifiés) avant réutilisation. D'autre part, la richesse en éléments fertilisants des boues produites par les stations d'épuration des eaux domestiques est un argument fort pour leur utilisation en agriculture. Malheureusement, ces boues contiennent aussi des ETMM (en moyenne plus de 1 000 mg/kg de Cr + Cu + Ni + Pb + Zn) qui sont retenus dans le sol, utilisés par le métabolisme

des plantes ou entraînés vers les rivières, ce qui les rend disponibles pour la suite de la chaîne alimentaire.

- **Les transports** : jusqu'à la généralisation de l'essence sans plomb (en 1995), les transports terrestres étaient responsables de plus de 80 % des émissions de plomb. On leur doit encore le relargage à proximité des axes routiers, de zinc et de cadmium (présents dans les pneus), et de plomb (additif des disques de freins). Exportés lors du lessivage des revêtements routiers par la pluie, ces polluants gagnent à terme sols environnants, cours d'eau et océans. Ainsi, les émissions des automobiles utilisant du carburant enrichi en Pb ont causé une augmentation de la concentration en Pb dans les sols situés au bord des routes et autoroutes (Nakayama et al., 2011; Yang et al., 2011)
- **L'agriculture** : les pollutions par les ETMM d'origine agricole sont localisées à proximité de certaines cultures spécifiques : traitement des vignes à la bouillie bordelaise (cuivre), utilisation des déjections d'animaux ayant consommé des aliments enrichis en ETMM. Au niveau des apports liés à l'activité agricole, ce sont les fongicides, pesticides et herbicides contenant du Cu, Zn, Fe, Mn et As qui sont mis en cause. D'autres ETMM comme Cd et Pb (arséniate de plomb...) peuvent être présents dans certains engrais, notamment des composts (He et al., 2005). En raison de la présence naturelle de cadmium dans les principales roches à partir desquelles sont fabriqués les engrais phosphatés (1 à 600 mg Cd/kg P₂O₅), leur épandage contribue à la dissémination de ce métal : on peut ainsi calculer que, pour une teneur moyenne de 58 g Cd/t d'engrais, on dissémine 2,6 g Cd/ha/an (Bril and Bollinger, 2006).

1.1.2. Contamination des sols liée à l'industrie métallurgique

Extraits du sous-sol dans les mines ou les carrières, les ETMM interviennent dans de multiples activités industrielles, de la métallurgie à la fabrication de peintures, d'engrais, de piles, ou à la mise au point de composants électroniques. L'industrie métallurgique, de l'exploitation des mines aux fonderies, est et a été dans de nombreux pays une source de contamination des agro-écosystèmes en ETMM (Wuana and Okieimen, 2011).

La fonderie est un procédé destiné à la production de métal "pur" à partir de minerai métallique. En effet, bien que les minerais extraits contiennent des niveaux élevés de métaux d'intérêt, ils contiennent également de grandes quantités de matériaux non métalliques et de métaux ou métalloïdes toxiques indésirables (As, Cd par exemple). Chaque opération des étapes d'enrichissement produit des déchets, appelés "résidus" (ELAW, 2012). Les productions de Cu, Pb et Zn sont à l'origine des plus importantes dégradations de l'environnement en rejetant des gaz (CO₂, SO₂, NO_x, etc) mais aussi de fines particules en suspension et des eaux usées. Ces dépôts secs et humides contribuent à des apports variables d'ETMM aux sols, en fonction de la nature et de la distance de la source de contamination. En effets, des études ont mis en évidence que la contamination en Cu et Ni dans les sols à proximité d'une fonderie augmentait exponentiellement avec la diminution de la distance de la fonderie (Freedman and Hutchinson, 1981). Cette contamination provient du dépôt d'importantes quantités de particules atmosphériques, contenant des éléments traces (As, Cd, Cu, Hg, Ni, Pb) et d'autres éléments toxiques, rejetées au niveau des cheminées. L'étendue de la contamination est fonction de la hauteur de la cheminée : plus la cheminée est haute, plus la dispersion est importante (Yateem et al., 2011). Des déchets solides, principalement des scories, sont également issus des fonderies métalliques. Ces scories sont généralement entassées et dispersées sur les sites de fonderie (Yang et al., 2006) et contiennent des teneurs élevées en métaux potentiellement toxiques qui peuvent être lessivés vers les sols et les sédiments par les eaux de ruissellement, par l'érosion ou par des phénomènes liés à l'activité humaine (Piatak et al., 2004).

La croissance des industries métallurgiques s'est accentuée avec les besoins des marchés mondiaux, entraînant des pollutions environnementales. En 2005, 25 usines de métallurgie et de raffinerie métallique étaient recensées en Europe, 23 en Amérique du nord et 18 en Chine, représentant les 2/3 de la production mondiale (Fobi, 2007). Dans le cas de la métallurgie du plomb, la population mondiale soumise à des risques est estimée à environ 1,9 million de personnes (figure 1.1), situées aux alentours des 53 sites connus dans le monde (Harris and McCartor, 2011). En Europe aujourd'hui, quelques mines sont encore en activité. Cependant, la majorité des sites métallifères sont actuellement abandonnés. Dans le cadre des lois Européennes, l'accent est donc principalement porté sur le contrôle des impacts environnementaux et la remédiation des héritages historiques miniers et métallurgiques (Wolkersdorfer et al., 2012). Par exemple, la ville de Mitrovica, dans le nord du Kosovo, a été le cadre du plus important

complexe minier et métallurgique en Europe, appelé « Trepca ». Ce dernier a débuté ses activités en 1939 avec l'extraction du plomb, du zinc et du cadmium. Une énorme fonderie de plomb existait dans ce complexe. Les hautes concentrations et le large éventail de polluants relâchés par cette industrie ont généré des problèmes de santé pour toute la population environnante, en particulier pour les enfants et les femmes enceintes. Ce complexe a fermé ses portes en 2000, mais le plomb et d'autres éléments traces et métalloïdes (Cd, Ni, As et Zn) issus des sites abandonnés et des sols contaminés par les dizaines d'années d'activité des mines et fonderies, sont encore présents et constituent une menace pour la santé des populations (Tahirukaj et al., 2005).

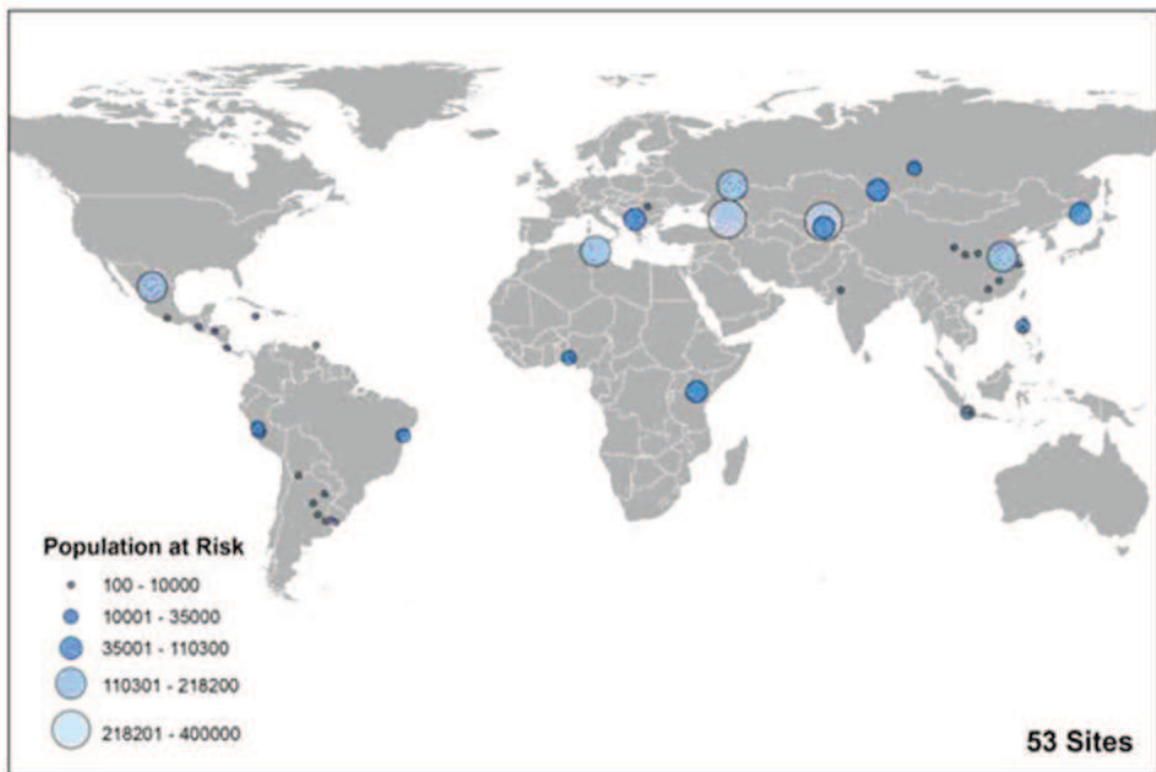


Figure 1.1 : Populations soumises aux risques liés aux industries de la métallurgie du plomb (Harris and McCartor, 2011)

En France, d'après la base de données (BASOL 2012) (base de données du Ministère de l'Écologie et du Développement Durable recensant les sites et les sols pollués sur le territoire français nécessitant une action des autorités nationales), le nombre total de sites pollués par les ETMM est de 4495. Dans 58 % des cas (soit 2617 sites) une pollution des sols et des eaux souterraines est avérée. En terme de présence de contamination, les principaux ETMM ont été identifiés et leur représentation en % des sites référencés a été calculée (tableau 1.2).

Les sites français correspondant à des industries métallurgiques et des fonderies sont situés dans différentes régions, et principalement en Auvergne (mine d'Ouche), en Champagne-Ardenne (Métal Blanc et les Tréfileries Jacquemin Cornibert), en Provence Alpes Côte d'Azur (PACA) (l'Escalette, Legré Mante, Figueroa), et dans le Nord Pas de Calais (Umicore). Ce sont des sites industriels anciens ou encore en activité, qui n'ont jusqu'à présent fait l'objet d'aucun traitement. Ils présentent des taux significatifs en Pb et As. Par exemple pour le site Métal Blanc, unité de deuxième fusion de plomb et d'affinage, où une contamination en Pb des sols environnants l'usine a été révélée et des valeurs entre 212 et 945 mg.kg⁻¹ de matières sèches ont été mesurées dans les 10 premiers centimètres des sols (BASOL, 2012).

Tableau 1.2 : Pourcentage représentatif des sites pollués par les métaux en France (BASOL, 2012)

Métal	Pourcentage représentatif des sites pollués par le métal donné
As	13.99
Ba	3.09
Cd	6.94
Co	0.85
Cr	16.44
Cu	15.91
Hg	4.89
Mo	0.67
Ni	11.50
Pb	19.47
Se	0.47
Zn	11.08

Ces contaminations représentent un risque sanitaire par ingestion directe de sol par voie orale et respiratoire, ou indirectement, puisque les ETMM peuvent se retrouver dans la chaîne alimentaire, notamment suite à leur absorption par les végétaux présents sur les sites pollués.

1.1.3 Comportement des ETMM dans les sols

Dans l'environnement, les éléments traces métalliques sont ubiquistes, persistants et non biodégradables. Ils se retrouvent dans tous les compartiments de l'environnement, issus d'altérations physiques et chimiques des bassins versants mais aussi d'apports anthropiques divers. Le devenir des ETMM étant parfois incertain, leur utilisation comporte des risques qui sont fonction des quantités, de la mobilité potentielle de chaque élément dans des conditions données, et de la toxicité, directe (ingestion accidentelle, inhalation) ou indirecte par le biais de la chaîne alimentaire. Ils sont souvent associés au soufre (exemple : la galène PbS pour le plomb), mais ils se présentent aussi sous forme de carbonates, de sulfates et dans des centaines d'autres minéraux. De manière générale, on parle de spéciation chimique pour rendre compte de la forme atomique (degré d'oxydation) ou moléculaire (complexant) sous laquelle se trouve un élément. Chaque phase solide se forme dans un milieu spécifique : les sulfures apparaissent en milieu réducteur et souvent en profondeur ; les sulfates ou les oxydes se forment dans des milieux oxydants, plus superficiels, etc. Ainsi, différents processus tels que l'érosion des sols ou leur lessivage, les réactions d'oxydo-réduction ou de précipitation peuvent entraîner la redistribution des éléments trace métalliques dans les sols et leur transfert vers les compartiments aquatiques et atmosphériques.

1.1.3.1. Equilibres dynamiques dans les sols

La disponibilité environnementale des ETMM dépend de leur spéciation et de leur répartition entre la phase solide et la solution du sol. Elle va donc dépendre des processus (adsorption/désorption, précipitation/dissolution, complexation/dissociation de complexes) et des propriétés chimiques du sol et de la solution du sol (pH, contenu en carbone organique dissous, en matières organiques solides et en phases porteuses minérales) qui gouvernent la spéciation et la répartition des métaux entre la phase solide et la solution du sol (Peijnenburg et al., 2007; Sauvé et al., 2000).

La manière dont les diverses réactions dans les sols sont interdépendantes, est représentée graphiquement dans la figure 1.2 (Lindsay, 1972). La solution du sol est le point focal dans ce diagramme. Elle constitue la phase liquide qui entoure les particules de sol et les surfaces

racinaires, et est le continuum à partir duquel les plantes absorbent leurs nutriments (réactions 1 et 2). Dans la solution du sol, les éléments en solution sont en équilibre avec ceux adsorbés à la surface du sol ou maintenus par des sites d'échange (réactions 3 et 4). La suppression d'un ion dans la solution provoque la désorption des ions formant un complexe d'échange.

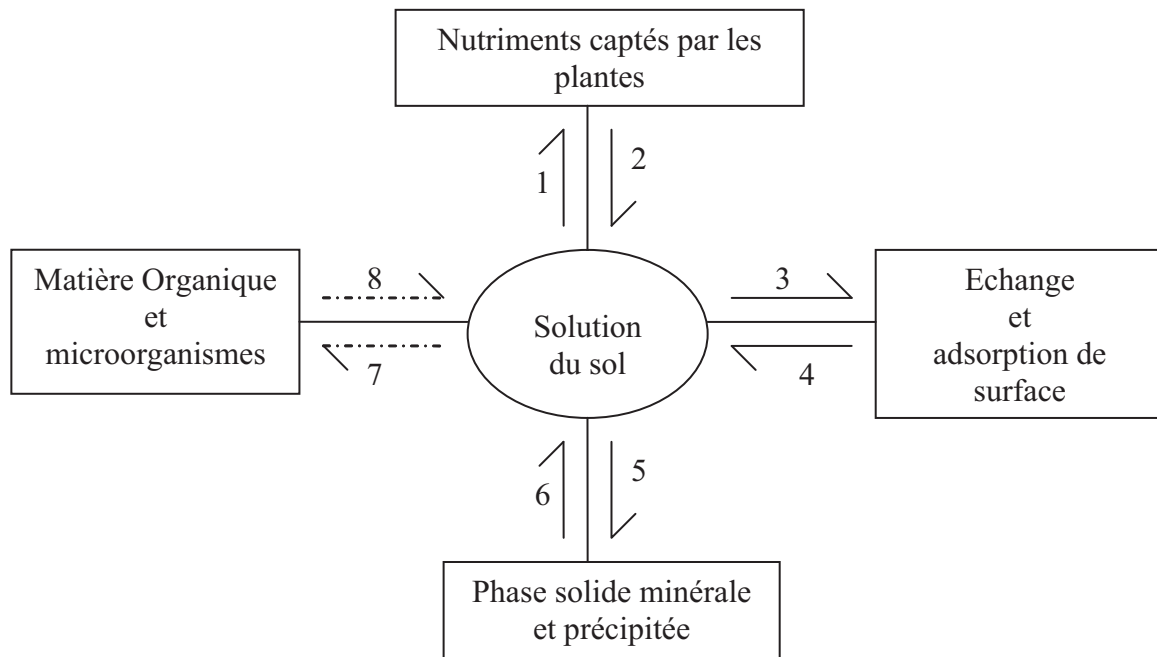


Figure 1.2 : Schéma de l'équilibre dynamique se produisant dans les sols (Lindsay, 1972). Les flèches représentent les processus de réactions (discussion dans le texte).

Le sol contient également de nombreux minéraux, dont certains sont cristallins ou amorphes. Ces minéraux peuvent influencer sur la composition de la solution du sol. Si la solution du sol devient sursaturée à l'égard d'un minéral, ce minéral peut précipiter (réaction 5); de même, si la solution du sol devient sous-saturée par rapport à un minéral présent dans le sol, ce minéral commence à se dissoudre (réaction 6). La matière organique et les micro-organismes constituent également une partie importante des sols. Les organismes vivants peuvent prélever les éléments nutritifs de la solution et les intégrer dans leurs tissus (réaction 7). De même, les éléments nutritifs sont libérés lors de la décomposition des matières organiques. Les réactions 7 et 8 sont présentées avec des lignes pointillées pour indiquer que les relations d'équilibre sont souvent modifiées par l'interaction de l'énergie métabolique des micro-organismes. La solution du sol est affectée par toutes les réactions qui se produisent dans les sols. Les transferts des ETMM entre les phases du sol peuvent être considérés comme les principaux processus qui contrôlent leur réaction de

complexation. La phase aqueuse du sol (solution du sol) est composée d'eau avec une suspension colloïdale, des substances libres et/ou complexées, y compris des complexes bio-organiques (Kabata-Pendias, 2004). Les concentrations des ETMM dans la solution du sol sont étroitement corrélées avec leur mobilité et leur disponibilité. Cependant, les phases solides et liquides sont en constante et rapide évolution en ce qui concerne à la fois la composition chimique et les teneurs, ceci étant du aux interfaces très diversifiées de la phase solide du sol et à l'absorption d'ions et d'eau par les racines des plantes.

- Réactions de sorption et désorption des métaux

Le terme générique de sorption peut désigner différentes réactions (dont l'adsorption, l'absorption...) lorsque seule l'existence d'une réaction entre un élément (ou une molécule) et une surface est connue, sans plus de détails (Atteia, 2005). La sorption peut être considérée comme un processus majeur contrôlant le partage des métaux entre les phases aqueuse et solide dans les sols. Elle peut représenter à la fois l'échange d'ions, l'adsorption non spécifique et spécifique, la complexation de surface, et la (co)précipitation sur le transfert des ions de la phase aqueuse à la phase solide. Les réactions entre les ions métalliques d'adsorption et les particules du sol peuvent être représentées comme un réseau de processus de sorption dépendant de deux paramètres, le temps et la surface (Sposito, 2004). Les complexes de surface (c'est-à-dire les complexes d'adsorption) sont les produits attendus de ces réactions dans des échelles de temps suffisamment courts et sur une surface suffisamment faible. Ils sont plus rapidement adsorbés que les structures polymères en solution aqueuse et issus par exemples de la matière organique du sol.

- Précipitation et dissolution

La dissolution et la précipitation des phases solides minérales cristallisées jouent un rôle déterminant dans la composition de la phase liquide particulièrement pour la régulation de la concentration des solutés majeurs comme Al et Fe. Ces réactions sont généralement plus lentes que les réactions entre les espèces dissoutes, mais il est assez difficile de généraliser sur les rapports de vitesses de précipitation et de dissolution (Stumm and Morgan, 1996). La solubilité des minéraux présents dans le sol détermine les concentrations possibles en éléments dissous dans la phase liquide. Lorsque la concentration des métaux est suffisamment élevée dans un sol, les précipitations peuvent se produire dans un environnement phosphaté, par exemple. La précipitation des métaux avec les sulfures peut aussi avoir un rôle important dans la transformation des métaux dans des environnements réduits où la concentration des sulfures en

solution est suffisamment élevée pour satisfaire les constantes des produits de solubilité des sulfures métalliques (Robert and Berthelin, 1986).

- Réactions de complexation des métaux

Les substances humiques contiennent un grand nombre de sites de complexation par molécule et peuvent, par conséquent, se comporter comme des agents complexants naturels multi-dentés (Buffle et al., 1988). Les principales caractéristiques moléculaires qui gouvernent la capacité de complexation des substances humiques sont la polyfonctionnalité, le caractère polyélectrolyte, l'hydrophobie et la capacité à former des associations intermoléculaires et à changer de conformation moléculaire. Les principaux groupements fonctionnels dans les substances humiques qui peuvent se lier aux ions métalliques, sont des groupements O⁻, notamment carboxyliques, phénoliques, alcooliques (Senesi and Loffredo, 2005). Les groupements amino⁻, S⁻ et P⁻ sont également impliqués dans la fixation des métaux. Deux principaux types de complexes peuvent se former entre des ions métalliques et les substances humiques : (1) les complexes à sphère interne qui conduisent à la formation de liaisons covalentes entre le(s) atome(s) du ligand et l'ion métallique, tous deux complètement ou partiellement déshydratés, et (2) les complexes à sphère externe, qui se traduisent par l'attraction électrostatique entre le(s) ligand(s) et l'ion métallique qui reste complètement hydraté. L'environnement électronique et stérique du ligand du site, tels que son réseau chimique, la géométrie et la conformation, et les caractéristiques physico-chimiques du milieu environnant tels le pH, la force ionique et la concentration du métal peuvent exercer une influence marquée sur l'interaction globale du processus (Buffle, 1988).

Les réactions de complexation dans la solution du sol affectent la transformation et le transport des métaux dans les sols, en particulier dans la rhizosphère (Gobran and Huang, 2005). Elles jouent un rôle important dans le contrôle de la réactivité chimique, la biodisponibilité et la toxicité des métaux dans l'environnement du sol. Les groupements fonctionnels complexants les plus importants de la matière organique du sol peuvent être classés en fonction de leur affinité pour les métaux (Buffle, 1988). Par exemple, pour Cd²⁺, Pb²⁺, Hg²⁺, l'ordre d'affinité de l'atome donneur est S > N > O ; l'ordre inverse est vrai pour des cations alcalino-terreux (Ca²⁺ et Mg²⁺). Les cations tels que Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, ont des propriétés intermédiaires et présentent ainsi une affinité appréciable pour tous types de ligands en solution. Les biomolécules sont présentes dans les sols, surtout dans la rhizosphère, en raison des exsudats racinaires et des métabolites

microbiens (Marschner, 1998). Ainsi, compte tenu des constantes de stabilité de leurs ligands avec des métaux, une fraction importante des ions métalliques solubles dans la solution du sol peut être complexée avec une série de biomolécules souvent présentes dans les métabolites microbiens et les exsudats racinaires.

- Réactions d'oxydoréduction des métaux

Le degré d'oxydation des métaux peut varier en fonction de l'état redox de l'environnement. Les réactions d'oxydoréduction sont donc importantes pour influencer sur la spéciation chimique d'un certain nombre de métaux, notamment Hg, As, Se, Cr, Pu, Co, Pb, Ni et Cu (Sparks, 2003). Les réactions d'oxydoréduction exercent aussi une grande influence sur la transformation et la réactivité des oxydes de fer et de manganèse dans les sols qui ont une grande capacité d'adsorption de métaux (Huang and Germida, 2001). En outre, la réduction du sulfate en sulfure dans un environnement anaérobie affecte également la transformation, la solubilité et la biodisponibilité de ces polluants à travers la formation de sulfures métalliques fortement insolubles. Masscheleyn and Patrick (1994) ont montré que la production de biomolécules par exsudation racinaire et le métabolisme microbien dans la rhizosphère influence le potentiel redox. D'un point de vue thermodynamique, la complexation de ligands avec des métaux sur les phases solide et liquide a un effet important sur les potentiels redox (Stumm and Morgan, 1996).

1.1.3.2. Phytodisponibilité des ETMM du sol

La biodisponibilité est l'aptitude d'un élément à être transféré d'un compartiment quelconque du sol vers un organisme vivant (Juste, 1988). L'évaluation de la biodisponibilité peut permettre d'évaluer à la fois le danger et le risque (Peijnenburg et al., 2007). Ainsi, seule une fraction dite phytodisponible des ETMM présents dans le sol sera capable d'être absorbée par les plantes. En effet, les ETMM présents dans le sol peuvent être divisés en différentes fractions (figure 1.3) : une fraction bio-disponible constituée des ETMM solubles à l'eau et échangeables (faiblement adsorbés), une fraction potentiellement bio-disponible constitué des ETMM liés aux oxydes, aux carbonates et à la matière organique (qui peut être accessible aux racines du fait de leur passage dans la solution du sol pendant la période de croissance de la plante), et une fraction non disponible retenue dans les minéraux (métaux incorporés dans les structures cristallines des minéraux primaires et secondaires) (He et al., 2005). La part de chacune de ces fractions est

dépendante du type de sol. Plusieurs paramètres influencent les processus de sorption et désorption des ETMM. Outre leur origine dans le sol (roche-mère ou apport anthropique) d'autres paramètres sont important comme le pH (figure 1.4), le potentiel redox, la teneur en matière organique et en argile, la quantité et la forme des oxydes, principalement de fer, de manganèse et d'aluminium (Kabata-Pendias, 2004), ainsi que la capacité d'échange cationique et anionique, les carbonates, et la composition minérale (Fageria et al., 2002).

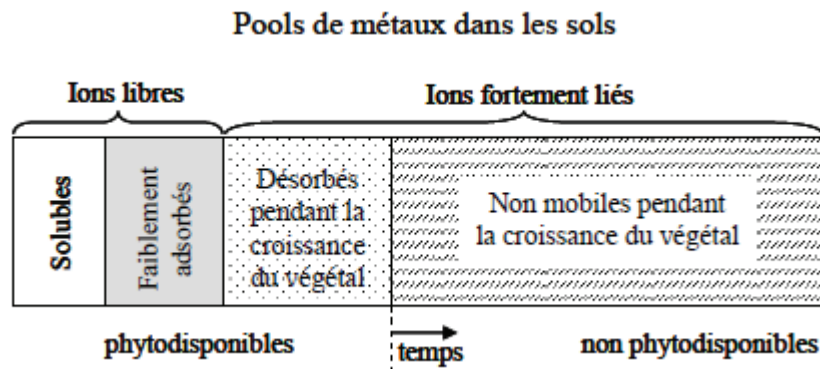


Figure 1.3 : Répartition des métaux dans les sols selon leur phytodisponibilité (d'après Morel, 1997).

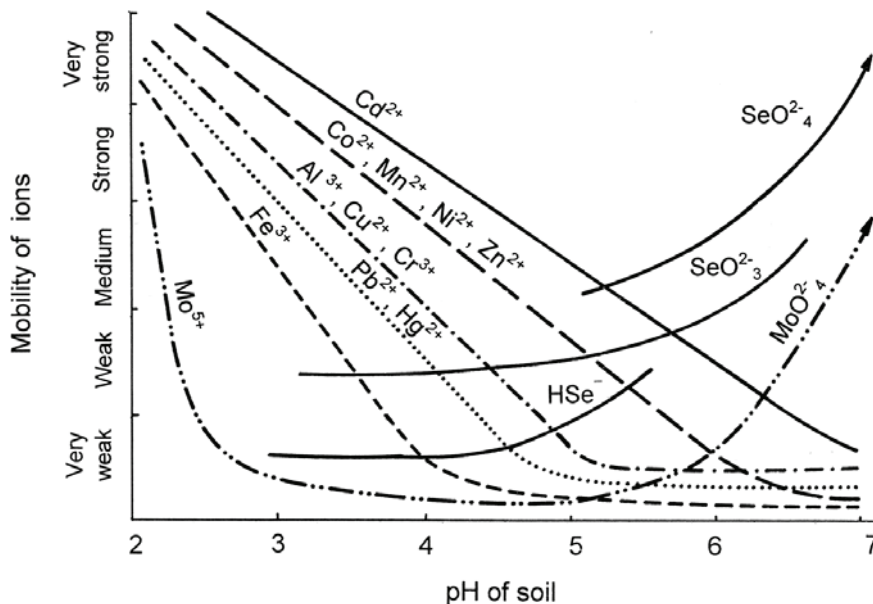


Figure 1.4 : Mobilité des ETM en fonction du pH du sol (données pour un sol faiblement minéralisé) d'après Kabata-Pendias, 2000.

Plusieurs processus chimiques sont impliqués dans les équilibres des ETMM entre la phase solide et liquide du sol, qui déterminent leur bio-disponibilité. Ces équilibres peuvent changer significativement en l'espace de quelques centimètres (Kabata-Pendias, 2000).

- Influence du pH et de Eh

Un pH faible augmente la disponibilité et la mobilité des ETMM puisque les ions H^+ ont une plus forte affinité pour les charges négatives des colloïdes, et entrent ainsi en compétition avec les ions métalliques présents sur ces sites (Greger, 2004). Le potentiel d'oxydo-réduction (redox) varie suivant le degré d'oxygénation du sol, lui conférant soit des conditions réductrices (Eh faible), soit des conditions oxydantes (Eh élevé). Le plus souvent, la mobilité des ETMM, principalement de Cd, Cu, Cr et Zn, augmente dans les sols peu aérés (stade d'oxydation faible, Eh < 100 mV). Cependant, étant donné le nombre de facteur intervenant, il est difficile de dégager de grandes tendances. En effet, outre des actions directes sur les ions métalliques, le potentiel redox agit également de façon indirecte, notamment par ses actions sur les oxydes de fer (Kabata-Pendias, 2000).

- Influence de la capacité d'échange cationique

La capacité d'échange cationique correspond à la quantité de charges positives portées par les cations susceptibles d'être fixés, de façon réversible sur les sites chargés négativement de certains constituants du sol. Plus la CEC est élevée, plus les cations métalliques pourront être adsorbés (Kabata-Pendias, 2000), les rendant moins disponibles pour les plantes. Les matières organiques et les argiles influencent fortement la valeur de la CEC. Ainsi, les sols composés de beaucoup de matière organique, et avec une granulométrie de type argileuse, peuvent présenter une capacité importante de fixation des ETMM. Les argiles minérales, de fine granulométrie, possèdent une surface d'échange importante. Les valeurs de CEC varient en fonction du type d'argile présent, selon l'ordre suivant : montmorillonite, vermiculite > illite, chlorite > kaolinite > halloysite (Kabata-Pendias, 2000).

- Influence de la matière organique

Les interactions des minéraux du sol avec la matière organique exercent un rôle fondamental dans la formation d'oxydes métalliques, de substances humiques, d'agrégats, de la structure et de la porosité des sols. Elles contrôlent ainsi la transformation, le transport, le devenir et la toxicité

des métaux dans l'environnement (Ondo, 2011). Une teneur importante en matière organique signifie une grande capacité de liaison des ETMM grâce aux acides fulviques et humiques. En effet, les substances humiques contiennent un grand nombre de sites de complexation puisqu'elles possèdent naturellement un système complexant multiligand. La stabilité de ces complexes augmente avec l'augmentation du pH et la diminution de la force ionique (Violante et al., 2010). Les substances humiques, les biomolécules présentes dans les exsudats racinaires, les métabolites microbiens et les produits de décomposition des tissus biologiques jouent un rôle très important dans la formation et la transformation des oxydes métalliques et sur leurs propriétés de surface relatifs à la spéciation, au transport, au devenir et à la toxicité des métaux dans le sol (Huang, 2004; Violante et al., 2010).

- Estimation de la phytodisponibilité des ETMM

Ainsi, prédire la mobilité des ETMM dans le sol est rendu compliqué par le grand nombre de paramètres et de processus impliqués. Pourtant, il est essentiel de connaître la part d'ETMM phyto-disponible afin de mieux appréhender le comportement des plantes exposées à ces contaminations et de déterminer le risque de transfert à la chaîne alimentaire. Pour cela, des méthodes d'extractions ont été développées. Les extractions séquentielles permettent de mettre en évidence la répartition des ETMM dans les différentes fractions du sol : une fraction soluble et donc facilement phytodisponible, une fraction échangeable, une fraction liée à la matière organique pouvant être mobilisée et une fraction dite résiduelle, fortement retenue par le sol et non disponible pour les végétaux (Quevauviller et al., 1997). Pour cela, différents extractants sont utilisés successivement (figure 1.5).

Pour l'évaluation de la biodisponibilité, différentes procédures d'extraction en une seule étape sont également fréquemment utilisées. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour évaluer la biodisponibilité des éléments traces dans les sols qui sont fondées principalement sur l'extraction par des solutions différentes: (a) des solutions acides : acides minéraux à des concentrations différentes (HCl par exemple) ; (b) des solutions d'agents chélatants, par exemple, l'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA) ou l'acide diéthylène triamine pentaacétique (DTPA) ; (c) des solutions de sels tamponnées, par exemple NH_4OAc ; (d) des solutions de sels neutres CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, NH_4NO_3 (Gupta and Sinha, 2007).

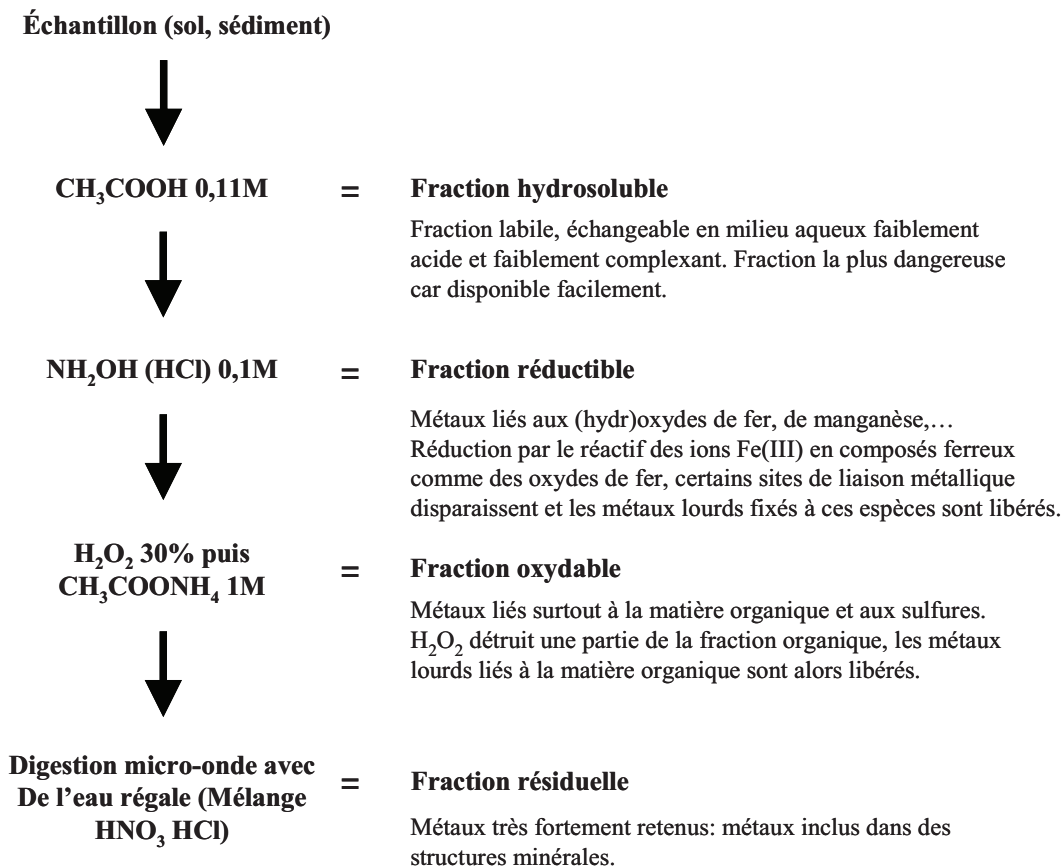


Figure 1.5 : méthode d'extraction séquentielle BCR (Quevauviller, 1997)

Des extractions uniques avec des complexants tels EDTA ou le DTPA sont estimées déterminer la fraction mobilisable des ETMM (b). Des extractants moins forts comme des solutions de nitrate de sodium ou d'acétate d'ammonium (formes échangeables) semblent plus appropriés, car ils offrent une bonne corrélation entre la concentration d'ETMM extrait du sol et la concentration en ETMM dans la plante (Chojnacka et al., 2005).

- Métaux échangeables

Les ions chargés positivement, tels que ceux formés par les métaux, peuvent être adsorbés sur les composants du sol chargés négativement. Ces éléments sont soumis à des réactions d'échanges de cations, et peuvent facilement reconstituer les niveaux de la solution du sol (Meers et al., 2007). Les métaux faiblement adsorbés sont considérés comme labiles et disponibles pour les végétaux. Une grande variété de solutions d'extraction a été proposée pour déterminer le caractère échangeable des métaux. Les paramètres de la concentration molaire de l'agent d'extraction et d'équilibre sont importants dans l'utilisation d'agent d'extraction. Des solutions salines non

tamponnées (par exemple CaCl_2 , NaNO_3 , NH_4NO_3) sont largement utilisées pour l'extraction des métaux échangeables. Ces solutions sont souvent appelées agents d'extraction doux ou moyens et dissolvent essentiellement la fraction « cation échangeable », bien que dans certains cas, la capacité de complexation de l'anion peut jouer un certain rôle (Pueyo et al., 2004). Dans plusieurs pays d'Europe, l'utilisation de solution unique d'extraction pour les métaux échangeables est en cours de standardisation. Par exemple, les Pays-Bas avec la solution de 0,01 M en CaCl_2 , qui a été proposée par Pueyo et al. (2004), semble être la méthode la plus appropriée pour la détermination de la mobilité dans ces sols de Cd, Cu, Pb, Zn. Menzies et al. (2007) ont également utilisé un protocole d'évaluation de la disponibilité des métaux pour les plantes, aboutissant également à l'utilisation de CaCl_2 à 0,01 M et qui pouvait fournir des indications utiles pour la phytodisponibilité des métaux (Cd, Zn, Ni, Cu et Pb). Dans la législation Suisse, l'utilisation d'une procédure d'extraction avec une solution 0,1 M de NaNO_3 est prescrite. Gupta et Sinha (2007) ont trouvé une capacité d'extraction inférieure pour Cu, Co, Ni, Cd, Zn et Pb, lors de l'utilisation d'une solution de NaNO_3 à 0,1 M par rapport à celle à 1 M de NH_4NO_3 ou celle à 0,01 M de CaCl_2 . Ceci est principalement dû à la compétitivité de divers cations pour l'adsorption sur le sol, et ainsi à la concurrence de libération de cations, tels que le Cd, de la matrice du sol (Meers et al., 2007). En comparaison avec les bases échangeables divalentes telles que Ca, les cations monovalents NH_4 , K et Na sont moins compétitifs pour la désorption des métaux lourds de la matrice des sols. En outre, les nitrates utilisés comme contre-ions ne causent pas de complexation supplémentaire, comme c'est le cas pour les extractants à base de chlorures, et d'autre part, dans le protocole d'extraction avec NH_4NO_3 , NH_3 peut aussi complexer des métaux et induire une libération supplémentaire (Pueyo et al., 2004). En règle générale, l'ordre suivant de compétitivité des cations échangeables utilisés dans des procédures d'extraction unique, a été observé: $\text{Ba} > \text{Ca} > \text{Mg} > \text{NH}_4 > \text{K} > \text{Na}$ (Gomomy et al., 1998).

- Métaux mobilisables (extractibles par complexation)

Les métaux mobilisables sont constitués par une partie des ETMM liés aux matières organiques et une fraction de ceux adsorbés ou co-précipités avec les oxydes de fer et de manganèse (Baize et al., 2006; Quevauviller, 1998). Les métaux et métalloïdes forment facilement des complexes avec les ligands d'origine anthropique tels que l'EDTA, qui sont couramment utilisés comme chélatants. Cependant, ce type d'extraction semble avoir tendance à surestimer les ETMM réellement phytodisponibles. L'EDTA est le plus couramment utilisé comme chélate en science

du sol, à des fins différentes telles que la prédiction de la biodisponibilité des métaux lourds (Alvarez et al., 2006). L'EDTA peut non seulement former des complexes solubles avec les métaux, mais aussi influencer sur la répartition des métaux dans les fractions en déplaçant des métaux des fractions moins solubles dans l'eau vers des fractions plus solubles. La capacité de l'EDTA à se lier avec des ions métalliques en formant des complexes extrêmement stables, peut être utilisée pour la désorption des ions adsorbés et pour la dissolution des composés métalliques insolubles. Ainsi, des mesures communautaires et un programme de test (anciennement BCR) a organisé une étude inter-laboratoire, suivie d'une campagne de certification pour les teneurs en métaux traces extractibles avec EDTA, et pour la validation des méthodes d'extraction utilisées et des techniques d'analyse. Ceci a été complété par une étude inter-laboratoire sur les systèmes d'extraction à l'EDTA et au DTPA appliquées à un matériau de référence : un sol calcaire (Quevauviller et al., 1996).

1.2. Passage dans les racines et effet des symbioses racinaires

Les échanges sol-plante ont lieu dans la rhizosphère, correspondant au sol sous influence de la plante, situé dans une zone de 1 mm autour des racines. Dans cette zone, la plante excrète une grande variété de composés organiques pouvant servir de source de carbone aux champignons et bactéries hétérotrophes présents. De plus, ces composés peuvent favoriser la phyto-disponibilité des ETMM (Pilon-Smits, 2005).

1.2.1. Mécanismes de transferts

Les ions présents dans la solution du sol peuvent être transportés dans les compartiments végétaux par deux processus majeurs. Le premier est la diffusion, qui fait intervenir la formation d'un gradient de concentration à la surface des racines, induisant les mouvements des ions. Le deuxième processus est l'advection, provoquée par la transpiration de la plante. Une partie des ions peut également être immobilisée par les charges négatives des polymères pariétaux, en particulier les acides polygalacturoniques, qui sont des pectines, capables d'agir comme des échangeurs d'ions (Hall, 2002).

Avant d'être absorbés par les cellules, les ions peuvent circuler librement dans les espaces intercellulaires du cortex. Ainsi, on distingue deux voies parallèles de transport dans les tissus racinaires. La première, la voie apoplastique emprunte l'apoplasme c'est à dire le continuum extra-cellulaire formé par les parois cellulosesiques et les espaces vides entre les cellules. La seconde, appelée voie symplastique, emprunte le symplasma, c'est-à-dire le continuum intracellulaire formé par les cellules végétales liées entre elles par les plasmodesmes (figure 1.6).

Ainsi, les ions pourront être transportés à travers l'épiderme, le cortex et jusqu'à l'endoderme, qui est la couche cellulaire la plus profonde du cortex. Au niveau de l'endoderme, la bande de Caspary, une zone hydrophobe constituée d'une rangée de cellules partiellement subérifiées, constitue une barrière à l'entrée de la stèle, empêchant ainsi l'entrée passive de certains ions dans les tissus vasculaires chez les plantes appartenant à la classe des dicotylédones. Dans la plante le plomb est, par exemple, essentiellement localisé dans les racines puisque son entrée est rarement suivie d'une translocation vers les parties aériennes. En effet, dans les racines, la plus grande partie du plomb se lie aux sites d'échange d'ions de la paroi cellulaire ou précipite dans les espaces extracellulaires sous forme de phosphate et carbonate (Pb_3PO_4 , $Pb_3(CO_3)_2(OH)_2$). Le plomb non lié se déplace à travers les canaux de calcium et s'accumule à proximité de l'endoderme dont la bande de Caspary, en présence de faibles concentrations, constitue une barrière au passage de ce métal dans le cylindre central. A plus forte concentration, le plomb passe dans le xylème puis est transporté vers les parties aériennes sous forme de Pb-acétate, Pb-nitrate et Pb-sulfide (Peralta-Videa et al., 2009). Pourtant, les ETMM sont aussi absorbés activement, via les protéines de transport membranaire, dont le fonctionnement requiert de l'énergie et se fait contre un gradient chimique (Kabata-Pendias, 2000). Plusieurs familles de protéines sont impliquées dans le transport actif des ETMM dans les plantes. Chaque protéine de transport régule généralement, avec des affinités différentes, le transport de plusieurs ions. Les métaux non essentiels comme Cd et Pb sont importés dans la plante par des transporteurs peu sélectifs, ne discernant pas les micronutriments et les ions non essentiels et toxiques. Par exemple, Cd^{2+} entre dans la plante par les transporteurs de Fe^{2+} , Zn^{2+} et Ca^{2+} et des canaux à large spécificité de substrat. Ainsi, il existe de nombreuses interactions entre les différents ions du sol. Il a en effet été démontré que Cd interagit avec les nutriments, en interférant avec leur consommation et leur distribution au niveau de la plante, ce qui est à l'origine de déficiences nutritives. Inversement, dans le cas de plantes cultivées sur des sols carencés en fer, la

consommation et l'accumulation de Cd est plus importante. En effet, le transporteur de fer, qui peut aussi faire passer d'autres ions comme Mn^{2+} , Zn^{2+} et Cd^{2+} , sera surexprimé entraînant l'augmentation de ces ions dans la plante (Verkleij et al., 2009).

Un autre exemple d'interaction concerne un métalloïde : l'arsenic. En effet, la consommation d'arséniate (AsO_4^{3-}) est reliée à la nutrition d'un nutriment essentiel à la croissance végétale, le phosphate. L'influx de cet oxyanion toxique se fait par les transporteurs de phosphate, dont c'est un analogue. Ainsi, la concentration de phosphore diminue dans la plante avec l'apport d'arsenic. La toxicité de ce métalloïde peut être partiellement expliquée par la substitution du phosphore par l'arsenic dans certains processus biochimiques (Abedin et al., 2002; Moreno-Jimenez et al., 2008).

Un grand nombre de transporteurs est impliqué dans le processus de transport actif rendant impossible la modélisation de l'absorption des ETMM, d'autant plus que leur abondance varie en fonction de l'espèce et des conditions environnementales (Pilon-Smits, 2005).

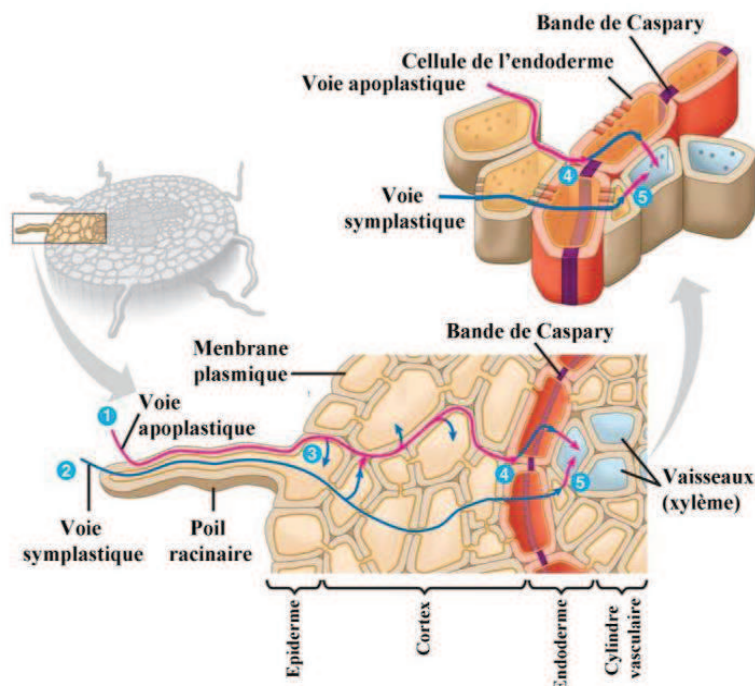


Figure 1.6: Voies de transport apoplastique et symplastique (Campbell and Reece, 2005)

1.2.2. Effet des exsudats racinaires sur le transfert des ETMM

Les exsudats racinaires incluent l'ensemble des substances libérées par les racines dans les sols (Rovira, 1969). La composition et la quantité des exsudats varient en fonction de l'espèce végétale, de son stade physiologique, des conditions environnementales (sol, climat) et des facteurs macroscopiques comme l'architecture des racines (Mench and Martin, 1991). Les composés libérés sont nombreux et variés puisqu'il s'agit d'ions (H^+ , OH^- , HCO_3^-), de gaz (CO_2 , O_2 , C_2H_4), de composés organiques solubles (acides organiques, phénols, acides aminés, sucres) et de matières organiques particulières (mucilages, résidus cellulaires) (Rovira et al., 1979; Dakora and Phillips, 2002). Ces composés vont modifier les caractéristiques du sol au niveau de la rhizosphère par des phénomènes d'acidification/alcalinisation, par modification du potentiel redox et l'exsudation de chélateurs métalliques et de ligands organiques qui vont entrer en compétition avec les espèces anioniques (Wenzel, 2009). Le pH va être modifié par l'excrétion de protons ou de HCO_3^- pour le maintien de l'électroneutralité dans la cellule lors de l'absorption d'ions. La mobilisation des métaux dans la rhizosphère peut également être favorisée par les acides aminés, les acides organiques, les phytosidérophores et des phénols (Badri and Vivanco, 2009), capables de complexer les métaux et de diminuer leur toxicité. La formation de ces complexes perturbe l'équilibre ionique de la rhizosphère, les faisant ainsi passer dans la solution du sol. En effet, les acides organiques jouent un rôle particulièrement important dans la nutrition de la plante. Ils sont excrétés en plus grande quantité lorsque la plante est exposée à une carence en fer et phosphore. Ces composés, tels que l'acide citrique, oxalique et malique ont des propriétés complexantes et jouent un rôle significatif dans la solubilité des ETMM et la mobilisation des nutriments (Evangelou et al., 2007).

Les exsudats racinaires constituent également une source de carbone importante au niveau de la rhizosphère, favorable au développement bactérien et fongique (Badri and Vivanco, 2009; Kozdroj and van Elsas, 2000). Les interactions plante-microorganismes peuvent améliorer la croissance végétale et la tolérance aux stress biotiques et abiotiques. Ainsi, les sucres et les acides aminés excrétés dans la rhizosphère stimulent la chimiotaxie des bactéries dites bactéries promotrices de croissance des plantes (PGPB) (Gray and Smith, 2005), et influencent aussi dans certains cas la mobilité flagellaire de certaines bactéries rhizosphériques. Il semblerait également que les plantes soient capables d'exsuder des facteurs facilitant les symbioses mycorhiziennes, en

induisant la germination des spores et/ou la croissance des hyphes des champignons endomycorhiziens à arbuscules. Grâce à ce type de symbiose, l'absorption de nutriments et la santé des plantes sont améliorés (Dakora and Phillips, 2002), tandis que les champignons utilisent les lipides et les sucres présents dans les racines de leur hôte (Bais et al., 2006).

1.2.3. Effets des symbioses racinaires

1.2.3.1. Bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPB)

Les rhizobactéries sont des partenaires symbiotiques très présents dans la rhizosphère, et sont considérées comme des bactéries favorisant la croissance végétale. La présence d'ETMM a un effet négatif sur la viabilité, l'activité et la densité bactérienne. Cependant, certaines populations bactériennes peuvent s'adapter à ce type de contamination du sol, entraînant un changement dans la communauté microbienne (Gray and Smith, 2005). Plusieurs genres tels *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* ainsi que *Streptomyces* spp sont connus pour avoir des effets bénéfiques sur des plantes se développant dans un environnement contaminé en ETMM (Ma et al., 2011). Elles peuvent agir directement sur la croissance de la plante en produisant des phytohormones tels que les auxines et les cytokinines, en facilitant la fixation de l'azote atmosphérique ou l'absorption des nutriments comme le fer et le phosphore (Gamalero et al., 2009). En effet, les PGPB excrètent des sidérophores qui sont de puissants chélateurs du fer(III), favorisant son absorption par les plantes sur les sites contaminés (Denton, 2007). Les carences en fer jouant en partie dans la toxicité de certains ETMM, les sidérophores permettent d'améliorer la tolérance des plantes aux ETMM. Cependant, ils rendent également assimilable les formes insolubles d'ETMM bivalents en les complexant. Ainsi, *Pseudomonas aeruginosa* peut mettre en solution dans le sol d'importantes quantités de Cd et Pb.

Les ETMM peuvent également être immobilisés par l'action des bactéries symbiotiques. Ainsi, la présence de *Magnaporthe oryzae* et *Burkholderia* sp dans le sol peut améliorer la croissance végétale de la tomate, tout en réduisant la disponibilité de Ni et Cu dans le sol, limitant ainsi leur accumulation dans les racines et parties aériennes de la plante. Ceci est lié à l'augmentation de la biosorption et de la bioaccumulation des ETMM dans ces deux souches. Les bactéries sont également capables de transformer les ETMM via des processus de méthylation, déméthylation, volatilisation, d'oxydation, de réduction, etc (Ma et al., 2011) (figure 1.7).

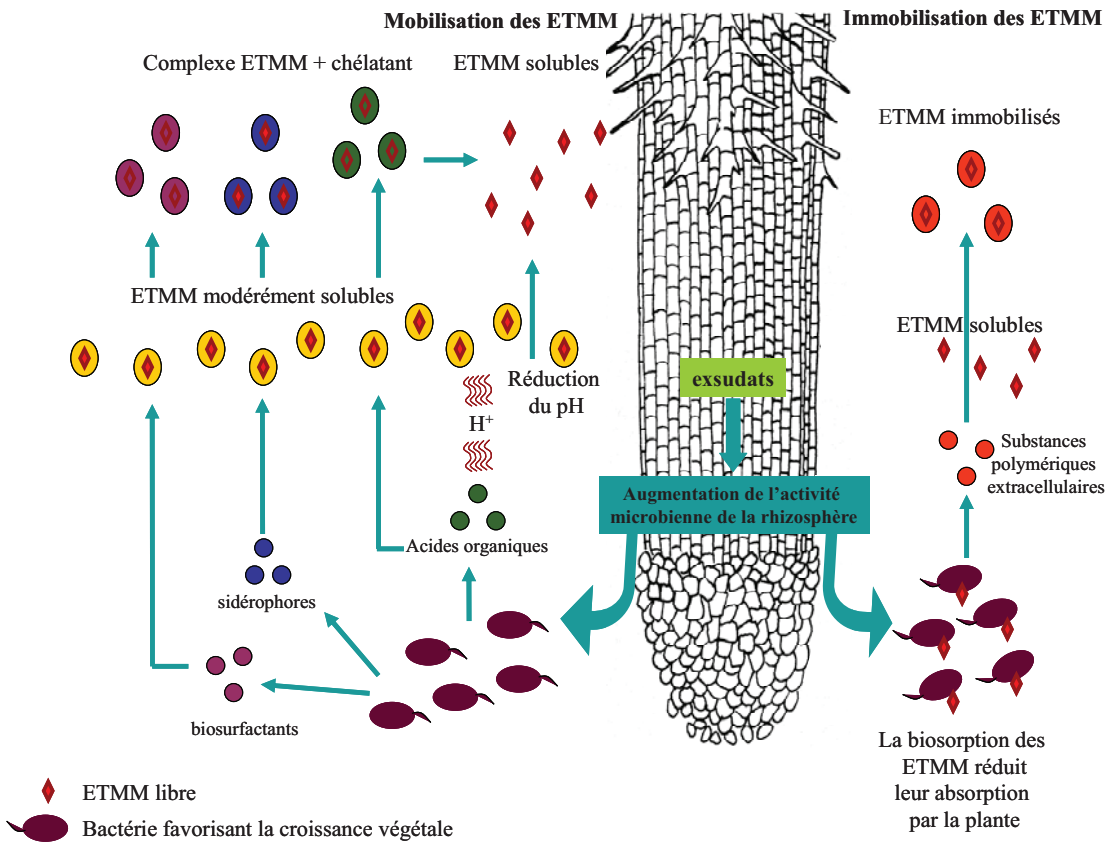


Figure 1.7 : Schéma récapitulatif des actions des bactéries favorisant la croissance des plantes, sur la mobilité des ETMM dans la rhizosphère (d'après Rajkumar et al., 2012)

1.2.3.2. Champignons endomycorhiziens à arbuscules

Les champignons endomycorhiziens à arbuscules forment des symbioses au niveau racinaire. Leurs hyphes s'infiltrant dans les espaces intercellulaires et à l'intérieur des cellules du cortex racinaire. A l'intérieur des cellules, les hyphes se différencient en structures caractéristiques permettant les échanges : les arbuscules, ou le stockage : les vésicules (figure 1.8).

Les champignons endomycorhiziens à arbuscules (CMA) sont présents dans le sol de la plupart des écosystèmes, y compris les sols contaminés en ETMM. Les CMA du phylum *Glomeromycota* interagissent sont présents dans plus de 80% des plantes terrestres et peuvent être considérés comme une extension fonctionnelle des racines végétales en augmentant considérablement le volume de sol prospecté par la plante pour l'absorption de nutriments (Harrison, 1999).

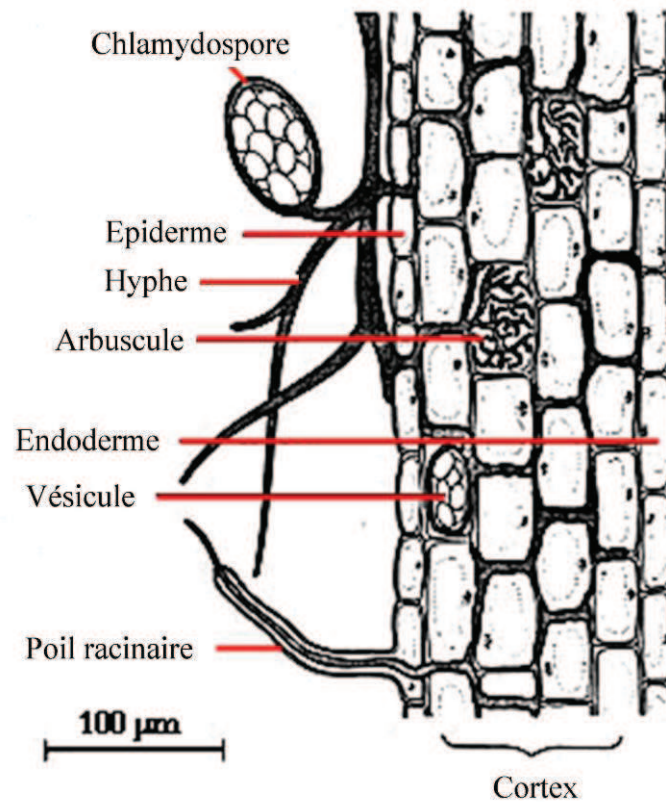


Figure 1.8 : Schéma d'endomycorhize à arbuscule et à vésicule (<http://palaeos.com/plants/glossary/glossaryD.html>)

En délivrant une partie du phosphate, des micronutriments et de l'eau acquises à la plante, les CMA améliorent son statut nutritionnel. Les symbioses avec les CMA créent un environnement plus équilibré qui permet aux racines de faire face à des concentrations élevées en ETMM (Gohre and Paszkowski, 2006). Deux antithèses ont été proposées quant au rôle des symbioses endomycorhiziennes dans le cas de sols contaminés par les ETMM : l'augmentation de l'absorption des ETMM via une zone d'exploration plus importante, et l'augmentation de la tolérance des plantes par la réduction de la phytodisponibilité des ETMM (Audet and Charest, 2007). En réalité les deux phénomènes sont possibles. Les interactions liées aux CMA sont dynamiques, puisqu'elles varient en fonction du niveau de contamination du sol. Audet et Charest (2007) ont modélisé cette dynamique (figure 1.9).

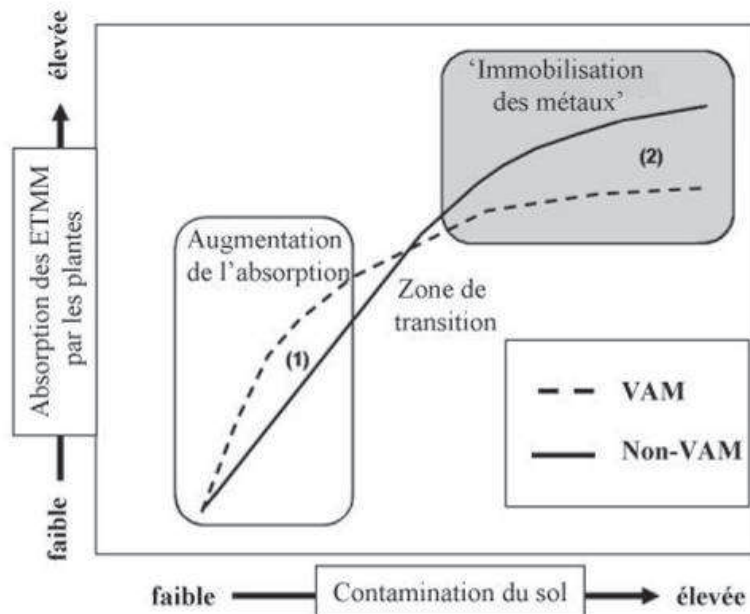


Figure 1.9 : Modèle conceptuel de l'absorption des ETMM par les plantes en relation avec la concentration en ETMM du sol. Les zones désignées "immobilisation des métaux" et "augmentation de l'absorption" montrent une meilleure absorption des ETMM pour les plantes colonisées par les CMA que les plantes non colonisées lorsque la concentration du sol est faible (1), et une absorption moindre dans le cas de sol fortement contaminé (2). La zone de transition entre "augmentation de l'absorption" et "immobilisation des métaux" ne montre pas de différence détectable entre les plantes colonisées ou non (d'après Audet and Charest, 2007)

Ils montrent que l'absorption des ETMM par les plantes colonisées est plus importante dans le cas de contaminations faibles, du fait de l'augmentation de la surface de sol prospectée. Au contraire, lorsque les niveaux de contamination du sol sont plus élevés, les plantes colonisées absorbent dans l'ensemble moins d'ETMM, puisque les CMA permettent leur immobilisation.

Les champignons endomycorhiziens possèdent à l'interface hyphe-sol des transporteurs ayant une forte affinité pour le phosphore inorganique. Ainsi, la nutrition en phosphate des plantes colonisées est améliorée, favorisant la croissance végétale (Harrison et al., 2002) et la tolérance des plantes aux ETMM (figure 1.10). Ce phénomène peut simultanément augmenter la mobilisation, l'acquisition et le dépôt d'arsenic dans les parties aériennes puisque l'arséniate, forme de l'arsenic absorbée par les plantes, est un analogue du phosphate.

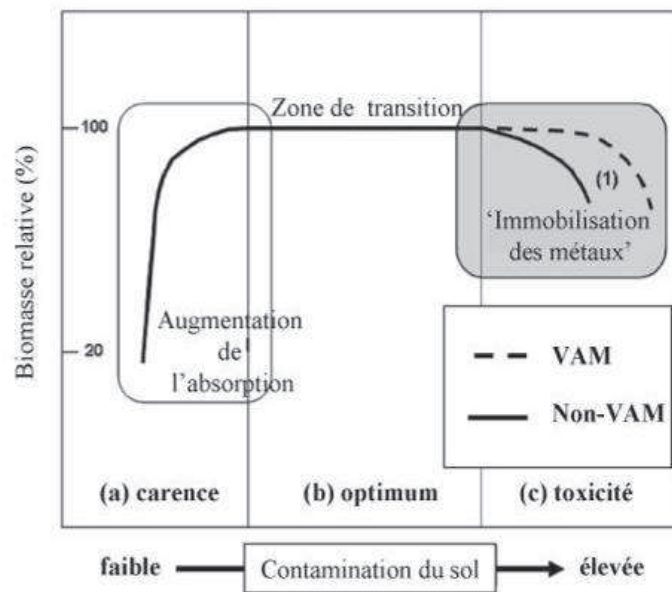


Figure 1.10 : Modèle conceptuel de la biomasse relative (%) en relation avec la concentration en ETMM du sol. Les zones de carence (a) pour les sols pauvres en ETMM, optimales (b) pour les sols à teneur en ETMM intermédiaire, et toxicité (c) pour les sols contenant de fortes concentrations en ETMM, sont indiquées. La zone désignée "immobilisation des métaux" met en évidence une biomasse plus importante pour les plantes colonisées par les CMA pour des concentration en ETMM du sol élevées (1), et pas de réponse associée à la colonisation dans les zone de transition et "augmentation de l'absorption" où les teneurs en ETMM dans les sols sont respectivement intermédiaires et faibles (d'après Audet and Charest, 2007)

Pour l'immobilisation des ETMM dans les sols, les CMA utilisent les mêmes stratégies que leur hôte. Parmi elles, la sécrétion de composés qui précipitent en présence d'ETMM, comme la glomaline qui agit sur la stabilisation des agrégats du sol (Wright and Upadhyaya, 1998) et l'adsorption sur les parois cellulaires fongiques. La glomaline, est une glycoprotéine qui chélate les ETMM. Une corrélation existe entre la quantité de glomaline dans le sol et la quantité d'ETMM liés. En effet, Gonzalez-Chavez et al. (2004) ont mis en évidence que ce composé est capable de lier d'importantes quantités d'ETMM. Ainsi, un gramme de glomaline permet d'extraire plus de 4,3 mg de Cu, et 1,12 mg de Pb d'un sol contaminé. Au niveau de l'adsorption, les ETMM peuvent être immobilisés sur la chitine constituant la paroi fongique, réduisant leur concentration localement. Les hyphes représentent un important réservoir d'ETMM du fait de leur volume importante dans le sol. De plus, les champignons tolérants aux métaux présentent une plus grande affinité pour les ETMM (2,4 fois plus que les racines) (Gohre and Paszkowski, 2006). Un autre mécanisme de détoxification mis en place par les CMA est le stockage des éléments toxiques dans les vésicules fongiques. Ainsi, des études Chen et al. (2005) ont mis en

évidence une corrélation entre le nombre de vésicules fongiques et l'augmentation de l'absorption racinaire et de l'immobilisation du Pb.

1.2.4. Translocation vers les parties aériennes

Les métaux qui ne sont pas séquestrés dans la vacuole ou adsorbés sur la paroi cellulaire des racines peuvent être transportés vers les parties aériennes via les vaisseaux du xylème, c'est la translocation. Ce processus est majoritairement réalisé par le xylème (sève brute) dont la montée est favorisée par poussée racinaire et par appel foliaire lors de la transpiration (Briat and Lebrun, 1999). Trois processus régulent le mouvement des ETMM des racines vers le xylème : (1) la séquestration des ETMM dans les cellules racinaires, (2) le transport symplastique dans la stèle et (3) le relargage dans le xylème (Clemens et al., 2002). Le transport des ETMM des racines vers les parties aériennes est également « élément dépendant ». En règle générale, les ETMM facilement transportés sont Ag, B, Li, Mo et Se ; ceux modérément mobiles sont Mn, Ni, Cd et Zn ; et ceux fortement liés aux cellules racinaires sont Co, Cu, Cr, Pb, Hg et Fe (Kabata-Pendias, 2000).

Dans les racines, les ETMM sont préférentiellement transportés par la voie apoplastique dans le cortex. Pour passer dans le xylème et être transportés vers les parties aériennes, ils doivent traverser la bande de Caspary. Ainsi, en général, les ETMM qui entrent dans le xylème sont transportés par la voie symplastique (Clemens et al., 2002), excepté au niveau des parties racinaires jeunes, où la bande de Caspary n'est pas encore formée (Greger, 2004). Le transport des ions dans le xylème est un processus très contrôlé, grâce à des protéines membranaires de transport. Dans le xylème, les ETMM sont transportés, au moins dans une certaine mesure, sous forme complexée à des acides organiques (principalement le citrate), des acides aminés ou des peptides selon l'élément impliqué. Le Zn peut être transporté sous forme complexée à des acides organiques, alors que le Cd est certainement transporté sous forme d'ion divalent. Concernant le Cu, il est presque exclusivement transporté sous forme complexée (> 99%), et sa présence entraîne une modification de la composition de la sève brute dont la teneur en certains acides aminés augmente de façon importante (2,4 à 7 fois plus) chez la tomate et la chicorée. Il s'agit notamment de la nicotianamine (un dérivé de la méthionine) et de l'histidine (Liao et al., 2000). L'histidine libre est également connue pour favoriser le transport du Ni dans les parties aériennes

(Briat and Lebrun, 1999; Clemens et al., 2002). Le transport des ETMM peut être ralenti par un phénomène d'échange d'ions au niveau des charges négatives des parois des vaisseaux du xylème. Ainsi, les vaisseaux du xylème agissent comme une colonne échangeuse d'ions, ralentissant le mouvement des ETMM vers les parties aériennes (Greger, 2004).

La mobilité des ETMM des feuilles vers les racines ou les graines est possible grâce à un transport via le phloème. Cependant, ce type de transport, même s'il est peu documenté, paraît difficile. En effet, le phloème est constitué de cellules vivantes contenant des substances et des ions permettant la fixation des ions métalliques (Greger, 2004). Cependant, il a été démontré que la sève élaborée contient du fer, du cuivre, du zinc et du manganèse. La nicotianamine, qui possède des propriétés de chélation des ETMM, semble être un médiateur privilégié pour le transport des métaux dans le phloème et dans la prévention de la précipitation des ETMM dans l'environnement alcalin de la sève élaborée. D'autres composés, non identifiés, de masse moléculaire supérieure à la nicotianamine, et capables de chélater des ETMM semblent être impliqués dans ce transport (Briat and Lebrun, 1999).

Par ailleurs, un transfert latéral au niveau racinaire entre phloème et xylème a été précédemment rapporté chez diverses espèces végétales (Marschner, 1995; Mesjasz-Przybyłowicz et al., 2007; Page and Feller, 2005; Riesen and Feller, 2005; Rabier et al., 2008). Le mécanisme possible est le transport radial par les cellules de transfert ou indirectement via les feuilles (Raven et al., 1999).

1.3. Tolérance des plantes aux ETMM

1.3.1. Phytotoxicité des ETMM

Les plantes sont capables de tolérer les ETMM et ainsi de se développer sur des sols très contaminés. Cependant, leur présence n'est généralement pas sans conséquence sur le métabolisme des plantes. Certains ETMM sont essentiels au fonctionnement des espèces végétales, mais leur absorption en excès peut avoir des effets toxiques. C'est le cas de Cu, Fe, Mn et Zn qui sont impliqués dans les réactions d'oxydo-réduction et dans le fonctionnement de certaines enzymes. D'autres ne jouent aucun rôle connu dans la plante, mais sont absorbés malgré tout, et peuvent engendrer une toxicité même à de faibles concentrations (figure 1.11). C'est le cas de Cd, Pb, As, Sb, Hg qui sont des éléments dits xénobiotiques (Nagajyoti et al., 2010). La

phytotoxicité se révèle généralement par une réduction de la croissance et de symptômes foliaires comme des chloroses et des nécroses (Nagajyoti et al., 2010; Reichman, 2002). L'action des ETMM au niveau physiologique touche en particulier la photosynthèse, la nutrition, la transpiration et le bilan hydrique. Ils sont également à l'origine d'un stress oxydatif conduisant à la formation d'espèces réactives à l'oxygène (ERO).

La photosynthèse est diminuée en présence d'ETMM par plusieurs mécanismes. Cela peut être le fait de la réduction de la biosynthèse de chlorophylles et de la modification du rapport chlorophylles a et b (Clijsters and Assche, 1985). Les modifications de l'accumulation de chlorophylle induite par les ETMM dépendent fortement du stade de croissance et de la tolérance des plantes. Ainsi, en présence d'un excès de Cu, le niveau de chlorophylles augmentera chez un épinard Cu-tolérant et diminuera chez un épinard Cu-sensible. Certains ETMM comme Pb, Cd et Zn sont des inhibiteurs du transfert d'électrons. Ils peuvent agir au niveau des photosystèmes (surtout le photosystème II), dès les premières étapes de la chaîne réactionnelle, en inhibant le transfert d'électrons. Ils agissent également sur les enzymes du système photosynthétique affectant les trois étapes clés du cycle de Calvin (carboxylation, réduction, régénération) (Singh, 2005).

Les plantes exposées à un excès d'ETMM augmentent leur résistance stomatique et diminuent la transpiration, induisant un stress hydrique. Le Cd limite généralement la tolérance au stress hydrique des plantes causant une perte de turgescence et une diminution du potentiel hydrique foliaire (Prasad, 2004). La transpiration et la teneur relative en eau montrent également une diminution dans le cas de concentrations excessives en Pb, Cu et Zn dans les tournesols (Kastori et al., 1992), alors que le bilan hydrique du trèfle et de la luzerne ne semble pas affecté par la présence de Pb, malgré une importante fermeture stomatique (Prasad, 2004). Les ETMM influencent également la relation plante-eau en inhibant la formation de poils racinaires, réduisant la capacité des plantes à explorer le sol pour l'absorption d'eau et de nutriments. Une autre conséquence de la présence d'ETMM est l'augmentation de la résistance au flux hydrique dans le système racinaire. En effet, la perméabilité des membranes est réduite par un renforcement de la subérisation et de la lignification (Menon, 2006). Concernant le transfert de l'eau vers les parties aériennes, il est limité par la réduction du nombre et du diamètre des faisceaux vasculaires (Pal et al., 2006).

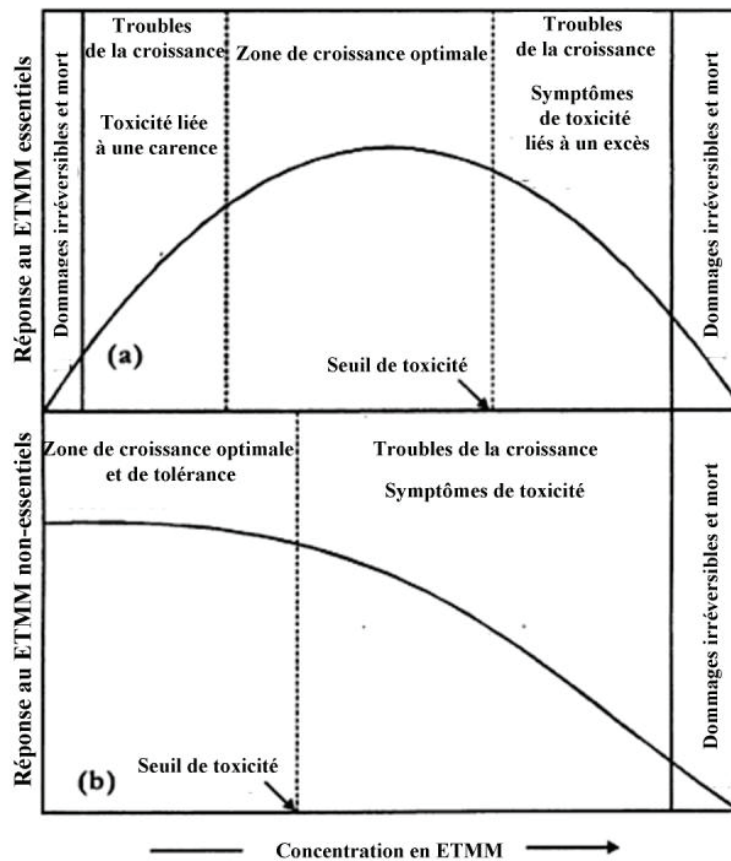


Figure 1.11 : Courbe dose réponse montrant l'effet des ETMM essentiels et non essentiels sur la croissance des plantes (d'après Berry et Wallace, 1981).

En plus de l'altération du niveau de nutriments et d'eau dans la plante et de la diminution de la photosynthèse, la phytotoxicité des ETMM résulte de l'accumulation d'ERO) (Gamalero et al., 2009). En effet, les métaux de transition ont généralement des électrons non appariés capables de catalyser la réduction de l'oxygène dont résulte la formation de radicaux hydroxyles ($\cdot\text{OH}$), responsables d'une grande partie des dommages oxydatifs dans les systèmes biologiques. Ces radicaux peuvent oxyder des molécules entraînant des dommages cellulaires, conduisant à la mort de la cellule. Ils peuvent également être responsables de modifications de l'ADN, d'acides aminés et de protéines. Enfin, ils sont impliqués dans la peroxydation des lipides, auxquelles les membranes, principalement constituées d'acides gras polyinsaturés, sont extrêmement sensibles (Briat and Lebrun, 1999).

1.3.2. Phytométabolites liés aux mécanismes de tolérance

Les plantes peuvent augmenter leur tolérance aux ETMM soit en luttant contre les causes, soit en luttant contre les conséquences. Dans ce dernier cas par exemple, en réponse au stress oxydant, les cellules peuvent synthétiser des enzymes antioxydantes comme la superoxyde-dismutase (SOD), les catalases et les peroxydases mais également des métabolites aux propriétés antioxydantes comme les phénols et le glutathion et les terpènes. Les phénols, en plus d'être capables de chélater les ETMM, peuvent inhiber la peroxydation des lipides en piégeant les lipides alkoxyles (Michalak, 2006). Le glutathion réduit (GSH), un tripeptide thiolé, est impliqué dans un grand nombre de processus cellulaires chez les plantes, incluant la défense contre les ERO, la séquestration des ETMM et la détoxification des xénobiotiques. Il agit comme un antioxydant et est directement impliqué dans la réduction des ERO générés durant un stress puisqu'il participe, entre autre, au contrôle du niveau du peroxyde d'hydrogène dans les cellules. Sa complexation avec les ETMM via la glutathion S-transferase, permet leur détoxification et leur transport dans la vacuole. Ainsi, l'utilisation massive de GSH lors d'un stress lié aux ETMM entraîne, au moins transitoirement, une diminution du GSH cytosolique. Pour faire face au stress hydrique pouvant être lié à une contamination en ETMM, les plantes synthétisent un acide aminé, la proline. Chez les végétaux, elle est considérée comme une molécule osmoprotectrice, c'est-à-dire une molécule permettant de rétablir l'équilibre hydrique des cellules en cas de manque d'eau, de salinité trop élevée, de gel ou de forte chaleur (Sharma et al., 1998). Une accumulation dose-dépendante de proline a été observée dans les parties aériennes et les racines de plusieurs espèces exposées aux métaux lourds (Tamas et al., 2008). Il est peu probable que le rôle de la proline dans la tolérance des végétaux aux contaminations par les ETMM soit lié à sa capacité à former des complexes non toxiques avec eux. En effet, les complexes proline-métal ne sont pas suffisamment stables pour empêcher l'interaction des métaux avec les enzymes. Il semblerait donc que la principale fonction de la proline induite en présence de métaux lourds soit l'osmorégulation et la protection des enzymes contre la déshydratation et les radicaux libres, plutôt que la séquestration des métaux (Sharma et al., 1998).

Lorsque les ETMM entrent dans la cellule, les plantes mettent également en place des processus ayant pour but d'éviter les effets indésirables, dont les principaux sont le transport, la chélation et la séquestration. La régulation de ces activités assure la distribution appropriée des ETMM au

niveau de la cellule et de l'organisme, résultant en un niveau de tolérance de base aux ETMM. La perte d'un de ces processus peut entraîner une hypersensibilité aux ETMM (Clemens, 2001). La chélation contribue fortement à la détoxification des ETMM, en stabilisant leur concentration dans le cytoplasme. Dans les plantes, les principaux chélatants connus sont les phytochélatines, les métallothionéines, ainsi que certains acides organiques et aminés (figure 1.12).

1.3.2.1. Les phytochélatines (PCs)

Les phytochélatines (PCs) sont des polypeptides dont la chaîne principale possède une répétition dipeptidique γ -Glutamyl-Cystéine (γ Glu-Cys) suivi par le terminal Glycine (Gly) (figure 1.13). Elles ne sont retrouvées que dans le règne végétal. La structure de base des phytochélatines est $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, avec n variant entre 2 et 11 (Grill et al., 1985) mais des variantes sont observées *in vivo*. Ainsi, la glycine peut être remplacée par de l'alanine (homophytochélatine), de la sérine (hydroxyméthyl phytochélatine) ou du glutamate (iso-phytochélatine (Glu)) (Clemens, 2001). Ces peptides ne sont pas directement transcrits d'un gène, mais produits à partir d'une voie de biosynthèse qui fait intervenir une enzyme, la γ -glutamylcystéine dipeptidyl transpeptidase, ou phytochélatine synthase, qui utilise le glutathion réduit (GSH) comme substrat (Grill et al., 1989). Cette enzyme est activée par la présence d'une concentration importante d'ETMM incluant, par ordre d'intensité $\text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Sb}^{3+} > \text{Ag}^+ > \text{Ni}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{AsO}_4^{2-} > \text{Cu}^{2+} > \text{Sn}^{2+} > \text{SeO}_3^{2-} > \text{Au}^{3+}, \text{Bi}^{3+}$ (Simmons et al., 2009) alors que $\text{Al}^{3+}, \text{Ca}^{2+}, \text{Co}^{2+}, \text{Cr}^{2+}, \text{Cs}^+, \text{K}^+, \text{Mg}^{2+}, \text{Mn}^{2+}, \text{MoO}_4^{2-}, \text{Na}^+$ et Va^{2+} n'induisent pas la production de phytochélatine (Grill et al., 1987). Les complexes PCs-ETMM sont majoritairement transportés dans la vacuole via des transporteurs localisés sur le tonoplaste (Briat and Lebrun, 1999). Les ETMM ainsi séquestrés dans la vacuole sont exclus des sites cellulaires où se déroulent des processus tels que la division cellulaire ou la respiration procurant ainsi un effet protecteur (Hall, 2002).

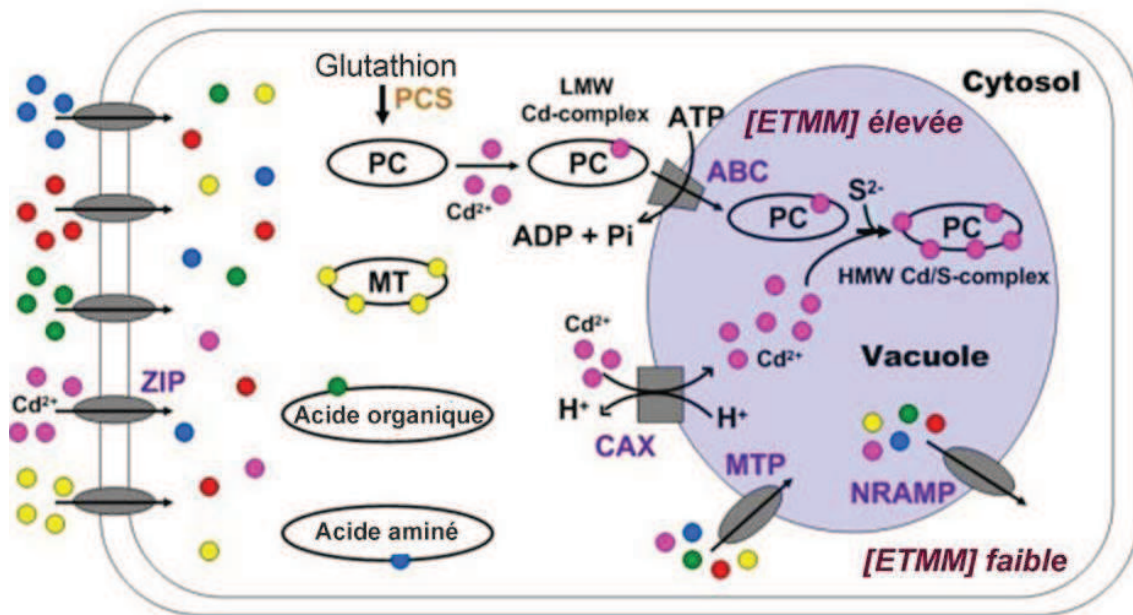


Figure 1.12 : Séquestration vacuolaire des ETMM dans la cellule végétale. Après entrée dans la cellule par les transporteurs de la famille ZIP, les ETMM, comme Cd^{2+} se retrouvent dans le cytosol où ils stimulent la phytochélatine synthase (PCS) qui synthétise les phytochélatines (PC) à partir de glutathion. Les complexes PCs-Cd^{2+} formés dans le cytosol sont de faible poids moléculaire (LMW) et sont transportés dans la vacuole par des transporteur localisés sur le tonoplaste : les ATP-binding-cassette (ABC). Dans la vacuole, les complexes de faible poids moléculaire (LMW) deviennent des complexes de haut poids moléculaire (HMW) en accumulant plus de Cd^{2+} , entré dans la vacuole via un échangeur cation/proton (CAX) localisé dans le tonoplaste. Les transporteurs du tonoplaste, MTPs (protéine de tolérance aux métaux) et NRAMPs (protéine de résistance naturelle associée aux macrophages), régule le passage des ions métalliques pour la compartimentation ou la remobilisation. D'autres chélatants incluant les métallothionéines (MTs), les acides organiques et aminés aident à tamponner la concentration en métal du cytosol (d'après Zhao and Chengcai, 2011).

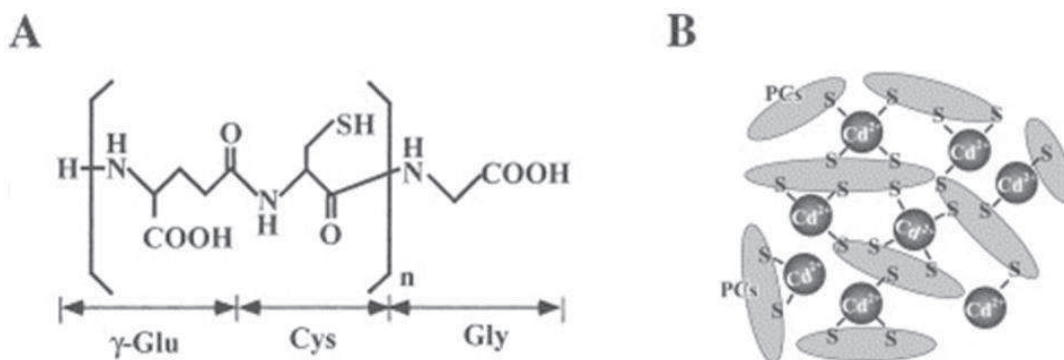


Figure 1.13 : Structure primaire des phytochélatines (A) et d'un complexe phytochélatine-Cd (B). La structure des phytochélatines est généralement connue comme $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, où $n = 2$ à 11. Les ions métalliques, comme le Cd peuvent être liés à un, deux, trois ou à la capacité maximum, c'est à dire quatre atomes de soufre d'une ou plusieurs molécules de phytochélatines, résultant en des complexes amorphes (d'après Hirata et al., 2005).

1.3.2.2. Les métallothionéines (MTs)

Ce sont des protéines riches en cystéine, de faible poids moléculaire, identifiées initialement dans le règne animal pour leur capacité à protéger les organismes contre la toxicité du cadmium (en particulier). Il s'avère qu'il s'agit d'une protéine ubiquiste retrouvée chez de nombreux procaryotes et chez la plupart des eucaryotes. Les métallothionéines (MTs) ont été groupées en 4 classes, qui chez les végétaux peuvent s'exprimer spécifiquement dans certains tissus (Grennan, 2011). Les phytochélatines sont décrites comme la troisième classe des MTs. Les MTs sont capables de former des liaisons mercaptides entre les nombreux résidus cystéine présents dans la protéine, et les ETMM. Au niveau fonctionnel, les MTs sont équivalents aux PCs mais leur fonction exacte dans les plantes n'est pas encore élucidée. Les données existantes laissent supposer un rôle dans l'homéostasie des ETMM dans la plante. Les fonctions proposées sont la détoxification des ETMM (principalement le Cu), le tamponnage du Zn dans le cytoplasme, la récupération des ETMM durant la sénescence des feuilles et une implication dans la sécrétion des ETMM dans les trichomes (Clemens, 2001).

1.3.2.3. Les acides organiques et les acides aminés

Du fait de leur réactivité face aux ions métalliques, liée à la présence d'atome de soufre, d'oxygène et d'azote, les acides organiques et acides aminés tels que l'acide citrique, malique et l'histidine sont de potentiels ligands pour les ETMM, jouant ainsi un rôle dans la tolérance et la détoxification. Ils sont impliqués dans des processus incluant le transport des ETMM dans le xylème et leur séquestration dans les vacuoles (Clemens, 2001). La présence de cystéine, précurseur du glutathion réduit, lui-même précurseur des PCs, semble également être importante dans la tolérance aux ETMM des plantes. En effet, Kawashima et al. (2004) ont montré que des plants de tabac surexprimant la cystéine synthase, enzyme qui catalyse la dernière étape de biosynthèse de la L-cystéine, avaient une tolérance plus importante au Cd, Se et Ni. La cystéine est le produit final de l'assimilation du soufre et constitue le facteur limitant de la production du GSH (Singh Gill and Tuteja, 2011).

1.4. Utilisation des plantes tolérantes aux ETMM en phytoremédiation

Les plantes partagent plusieurs mécanismes communs de tolérance aux ETMM et bien qu'une tolérance basique aux ETMM est ubiquiste dans le monde végétal, certaines espèces ou génotypes sont capables de se développer sur des sols contenant, naturellement ou non, d'importantes concentrations en ETMM (Clemens, 2001). Plusieurs stratégies de réponse à la présence des ETMM ont été mises en évidence. Ainsi, on distingue des plantes dites accumulatrices qui concentrent les ETMM dans leurs parties aériennes quel que soit le niveau de contamination du sol, des plantes indicatrices dont la concentration interne reflète le niveau de contamination du sol, et des plantes excluantes où la concentration dans les parties aériennes est maintenue basse pour une gamme de contamination du sol étendue (Baker, 1981). Cependant, certaines espèces, en plus de tolérer des concentrations élevées en ETMM, peuvent les accumuler en grande quantité, on parle alors de plantes hyperaccumulatrices (Baker and Brooks, 1989) (figure 1.14).

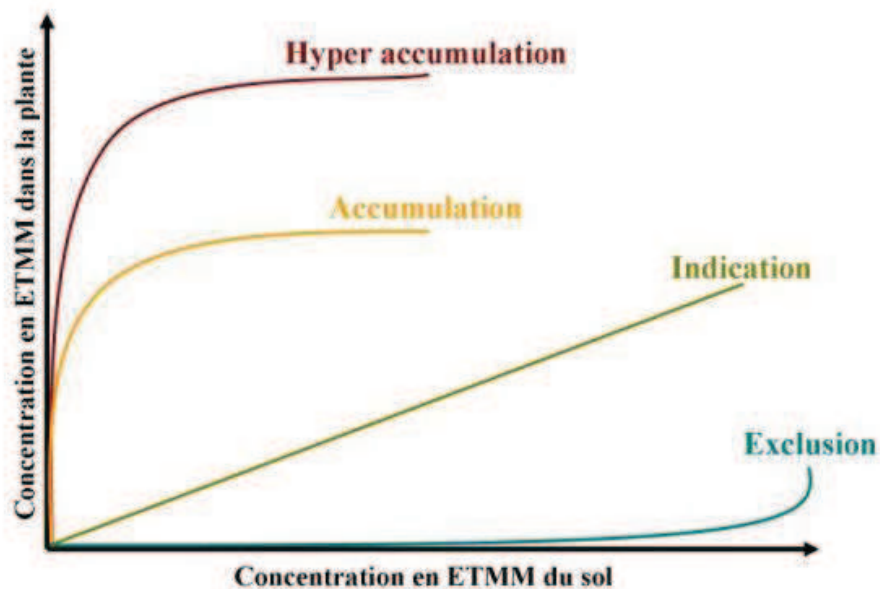


Figure 1.14 : Les différentes stratégies de réponse des plantes face à l'accroissement de la concentration en ETMM dans le sol (d'après Baker, 1981).

Généralement, les sols contaminés en ETMM sont traités par des méthodes physico-chimiques telles que le lessivage acide ou la séparation des contaminants par des techniques électrochimiques, *in situ* ou après excavation. Leur coût peut être important suivant la technique choisie et le type de contamination. De plus, ces techniques sont généralement lourdes à mettre en œuvre et peuvent détériorer les constituants biologiques du sol, elles ne sont donc pas adaptées à des pollutions diffuses et étendues (Garbisu and Alkorta, 2001). Ainsi, des techniques de dépollution alternatives des sols contaminés, et notamment la phytoremédiation ont fait l'objet de nombreuses études. La phytoremédiation n'est pas un concept nouveau puisque les filtres plantés et les roselières sont des traitements communs pour les eaux usées depuis de nombreuses années. Cependant, les recherches actuelles se focalisent plus sur l'utilisation des plantes pour la décontamination des sols (Cunningham et al., 1995).

La phytoremédiation est considérée comme une alternative respectueuse de l'environnement et du sol, esthétique, efficace et peu coûteuse. Elle reste malgré tout critiquable sur certains points. En effet, ces techniques sont adaptées essentiellement aux sites peu contaminés et sont relativement lentes puisque des calculs suggèrent que pour réussir une décontamination d'un sol modérément contaminé, il faudrait un taux d'élimination de 200-1000 kg de métal par hectare et par an sur une période de 20 ans (Cunningham et al., 1995). Elles sont également dépendantes du climat et des saisons, et leur efficacité peut être diminuée par des maladies ou des nuisibles touchant la végétation utilisée. De plus, leur effet est limité en profondeur puisqu'il dépend de la profondeur des racines, et est fortement dépendant de la solubilité des contaminants (Alkorta et al., 2004).

La notion de phytoremédiation regroupe plusieurs variantes (figure 1.15) :

- La phytoextraction qui consiste à utiliser les plantes pour extraire du sol les polluants et les concentrer dans leurs organes qui sont ensuite récoltés.
- La rhizofiltration qui consiste à utiliser les racines pour absorber et accumuler les polluants des eaux usées.
- La phytostabilisation qui consiste à utiliser les plantes pour limiter l'érosion et immobiliser les polluants dans les couches superficielles, évitant ainsi leur lessivage vers les eaux souterraines.
- La phytovolatilisation qui consiste à utiliser les plantes pour extraire les polluants du sol et les transformer en composés volatils.

- La phytodégradation qui consiste à utiliser l'association plante-microorganismes pour dégrader les polluants organiques du sol (Jemal and Ghorbal, 2002; et al., 1995a; Pilon-Smits, 2005).

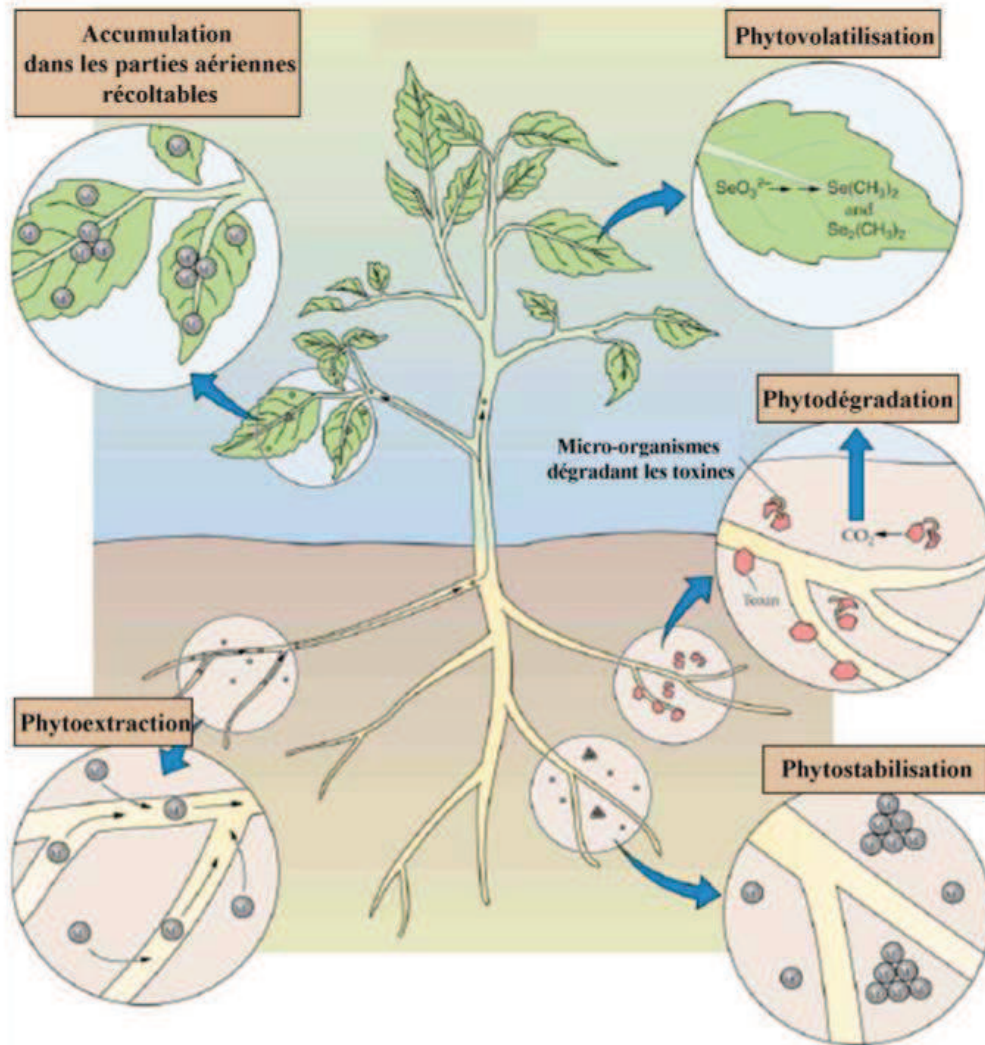


Figure 1.15 : Les différents types de phytoremédiation : la phytoextraction où les ETMM du sol sont accumulés dans les parties aériennes de la plante, la phytostabilisation où la mobilité des ETMM dans le sol est réduite au niveau des racines, la phytodégradation où les polluants sont dégradés à l'aide d'enzymes, et enfin la phytovolatilisation où les éléments toxiques comme le sélénium, par exemple, sont transformés en éléments volatils moins toxiques (d'après Buchanan et al., 2002)

La phytoextraction et la phytostabilisation sont les variantes les plus adaptées dans le cas de sols pollués par les ETMM.

1.4.1. La phytoextraction

Il s'agit de la meilleure approche pour éliminer les contaminants du sol sans détruire la structure du sol et diminuer sa fertilité. Les plantes absorbent, concentrent et précipitent dans la biomasse les ETMM des sols contaminés (figure 1.16). Cette méthode est particulièrement adaptée à la remédiation de sites à pollution diffuse, où la contamination est faible et superficielle (Ghosh and Singh, 2005).

Les critères de sélections des espèces utilisées pour la phytoextraction sont (1) la tolérance à des niveaux de contamination en ETMM élevés, (2) l'accumulation de concentration d'ETMM relativement importantes, (3) une croissance rapide, (4) une production de biomasse importante et (5) un système racinaire étendu. De plus, afin d'éviter tout passage dans la chaîne alimentaire, et tout risque de contamination humaine, le choix d'une espèce non comestible semble préférable. Cette technique utilise généralement des végétaux capables d'accumuler des teneurs en métaux, non essentiels et souvent toxiques dans leurs tiges et feuilles à des concentrations allant jusqu'à 1,5 % de la matière sèche de la plante. On parle alors de plantes hyperaccumulatrices. Les parties aériennes contenant les métaux sont récoltées, stockées et incinérées.

Environ 400 espèces végétales différentes, appartenant à 22 familles botaniques, ont été décrites comme hyperaccumulatrices (tableau 1.3). La famille des Brassicacées présente un grand nombre d'espèces hyperaccumulatrices. Elles ont été identifiées après la collecte d'individus sur des sites fortement contaminés (Ghosh and Singh, 2005). Le terme "plante hyperaccumulatrice" fait référence à des plantes capables de contenir plus de 10000 mg/kg de Zn et Mn (soit 1 %), 1000 mg/kg de Co, Cu, Ni, As, Se et Pb (soit 0,1 %) et 100 mg/kg de Cd (soit 0,01 %) (McGrath and Zhao, 2003). En règle générale, les concentrations dans les espèces hyperaccumulatrices sont de 10 à 100 fois plus élevées que celles trouvées dans les plantes non hyperaccumulatrices se développant dans les mêmes conditions (McGrath et al., 2002). Un autre caractère particulier des plantes hyperaccumulatrices, est le transport efficace des ETMM des racines vers les parties aériennes, alors que chez les non-hyperaccumulatrices, ils ont plutôt tendance à être concentrés dans les racines. Ainsi, ces plantes présentent un rapport de concentration partie aérienne / racine, supérieur à 1 (Baker, 1981).

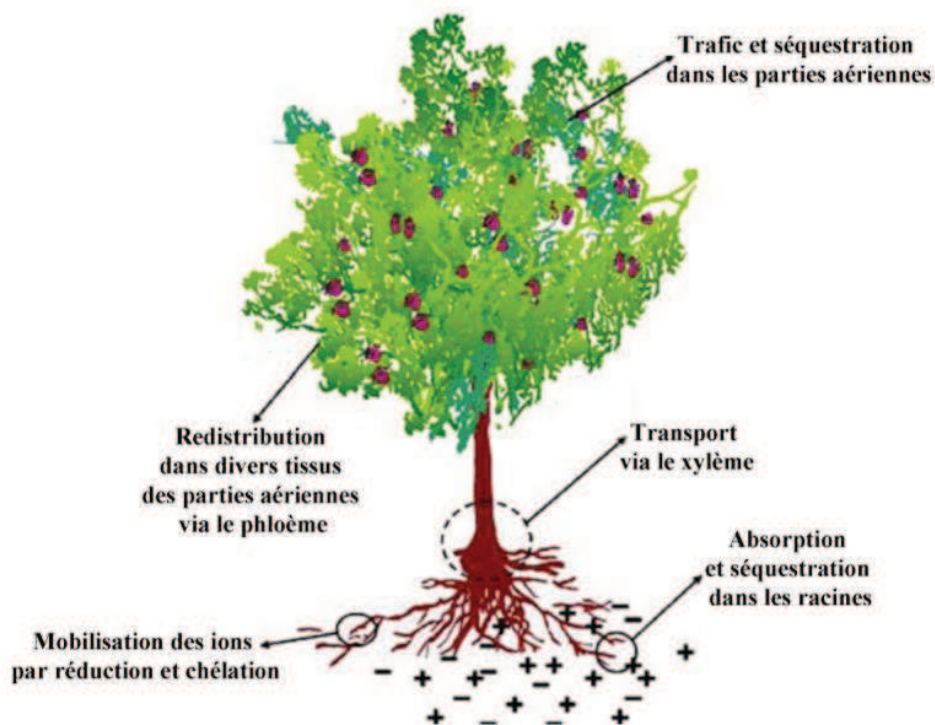


Figure 1.16 : Principe de la phytoextraction (d'après Padmavathiamma and Li, 2007)

Tableau 1.3 : Exemples d'espèces accumultrices (d'après Padmavathiamma and Li, 2007)

Elément hyperaccumulé	Espèce hyperaccumultrice	Famille botanique
Zinc	<i>Thalspi caerulescens</i>	Brassicacées
Cadmium	<i>Thalspi caerulescens</i>	Brassicacées
Nickel	<i>Berkheya coddii</i>	Astéracées
Sélénium	<i>Astragalus racemosus</i>	Fabacées
Thallium	<i>Iberis intermedia</i>	Brassicacées
Cuivre	<i>Ipomoea alpina</i>	Convolvulacées
Cobalt	<i>Haumaniastrum robertii</i>	Lamiacées
Arsenic	<i>Pteris vittata</i>	Ptéridacées

La plupart des plantes décrites jusqu'à présent sont métal-spécifiques, c'est-à-dire qu'elles ne peuvent accumuler qu'un seul métal. D'autres limitations sont pointées par rapport à l'utilisation de ces espèces en phytoextraction puisqu'elles produisent généralement une faible biomasse, ont une croissance lente et extraient ainsi moins de métaux que certaines espèces ligneuses, non-

hyperaccumulatrices mais tolérantes comme les saules (Cunningham et al., 1995). De plus, leur culture à grande échelle est rarement maîtrisée (Garbisu and Alkorta, 2001).

Plusieurs stratégies de phytoextraction ont été développées : la phytoextraction continue où l'élimination des ETMM dépend des capacités naturelles de la plante, et la phytoextraction assistée par apport de chélatants où des chélatants synthétiques ou naturels sont apportés afin d'augmenter la mobilité des ETMM du sol, améliorant leur absorption par les plantes (Ghosh and Singh, 2005). En effet, l'amélioration du transfert des métaux du sol vers les plantes passe par l'augmentation de leur biodisponibilité souvent limitée, qui dépend des propriétés du sol. Pour cela, une solution peut être l'apport de molécules capables de complexer les éléments traces métalliques. Ces chélatants vont désorber le métal de la matrice du sol, permettant ainsi son déplacement de la rhizosphère vers les racines. Plusieurs types de molécules ont déjà été testées avec des résultats plus ou moins concluants. Les chélatants ayant une efficacité différente suivant les métaux à traiter, l'application simultanée de deux chélatants afin de diminuer la compétition avec les autres métaux du sol est envisageable. Une autre option consisterait à appliquer, en plus du chélatant, un produit chimique capable de détruire la structure de la racine afin de faciliter l'absorption directe du métal lié (Lestan et al., 2008). En effet, la théorie suggère que seuls les ions métalliques libres sont absorbés par les racines, le transfert directe dans les plantes des chélates formés est donc peu probable du fait de leur grande taille. Or, des complexes EDTA-Pb ont été observés dans des feuilles de *Phaseolus vulgaris*. L'entrée de ces grosses molécules polaires par diffusion à travers la membrane étant largement limitée, il est généralement admis que leur absorption a lieu au niveau des cellules dont la subérisation n'est pas encore complète, ou au niveau de brèches formées dans l'endoderme et la bande de Caspary des racines. Ces dommages peuvent être causés par certains produits chimiques, par les métaux lourds ou les chélatants, eux même souvent phytotoxiques (Lestan et al., 2008).

- Phytoextraction assistée par des chélatants synthétiques

Parmi ces molécules, les acides aminopolycarboxyliques synthétiques, et particulièrement l'EDTA qui reste à l'heure actuelle le chélatant le plus efficace, ont montré des résultats intéressants. Cependant plusieurs problèmes se posent. En effet, ces molécules présentent une phytotoxicité à des doses relativement faibles (inférieures à la dose nécessaire à une phytoextraction assistée efficace), avec pour conséquence une diminution de la biomasse des

végétaux, ce qui n'est pas souhaitable dans un processus de phytoremédiation. De plus, elles ne sont pas biodégradables. Leurs effets phytotoxiques resteront donc pendant une longue période dans le sol, et la mobilité des métaux sera toujours importante, favorisant d'éventuels problèmes de lessivage et de pollution des eaux souterraines par les métaux (Evangelou et al., 2007).

- Phytoextraction assistée par des chélatants d'origine naturelle

Afin de contrer les problèmes de phytotoxicité, d'autres chélatants synthétiques ont été testés. Une alternative suscitant de plus en plus d'intérêt est l'utilisation d'acides aminopolycarboxyliques naturels comme l'acide nitriloacétique (NTA) et le [S-S']-éthylènediamine disuccinique (EDDS). Ces molécules sont biodégradables (vitesse de dégradation variable en fonction de isomères optiques de l'EDDS) et il n'a pas été observé d'effets phytotoxiques. L'efficacité de l'EDDS pour l'absorption de Cu, Ni et Zn est plus élevée qu'avec l'EDTA. Le NTA, lui, est plus efficace que plusieurs acides aminopolycarboxyliques synthétiques pour l'extraction d'As et de Zn (Evangelou et al., 2007). Cependant, le problème de risque de lessivage reste présent avec ces molécules. Des molécules dont la dégradation dans le sol est plus rapide ont donc été testées. C'est le cas des acides organiques de faible poids moléculaire (Natural Low Molecular Weight Organic Acid, NLMWOA). Les NLMWOA sont naturellement excrétés par les racines. Ils sont biodégradables et ont des propriétés complexantes. Ainsi, leur ajout dans un sol à dépolluer devrait augmenter la biodisponibilité des métaux et donc leur absorption par les plantes. Parmi les NLMWOA, l'acide citrique présente la meilleure efficacité. Une phytotoxicité des NLMWOA est observée à des doses beaucoup plus importantes que pour l'EDTA. Cependant, les concentrations nécessaires à l'obtention d'une augmentation significative de la phytoextraction sont plus importantes qu'avec l'EDTA (avec une concentration 250 fois plus élevée de NLMWOA, l'effet reste inférieur à celui de l'EDTA pour la mobilisation du Cu et du Pb). De plus, l'usage de ces molécules en plein champs risque d'échouer puisque les NLMWOA sont rapidement dégradés dans le sol et que leur dégradation entraîne l'augmentation du pH du sol et donc une mobilité des métaux moins importante. De plus, à la vue des quantités à appliquer, l'utilisation des NLMWOA semble une solution coûteuse, pour des résultats moindres.

Récemment, Vadas and Ahner (2009) ont utilisé la cystéine et le glutathion (GSH) comme chélatant, puisque les thiols sont impliqués dans le transport des ETMM au sein des plantes. Les résultats montrent que *Z. mays* absorbe plus de Pb lorsqu'il est lié à la cystéine ou au GSH que

lorsqu'il est libre. Leurs expériences ont également mis en évidence le fait que ces deux thiols sont probablement absorbés grâce à des transporteurs spécifiques puisque l'ajout de penicillamine, une molécule contenant une fonction thiol et de structure proche de la cystéine, n'engendre pas d'augmentation de l'absorption de Pb. Ainsi ces deux composés, cystéine et GSH, pourraient être intéressants dans un processus de phytoremédiation assistée.

- Phytoextraction assistée par bioaugmentation

Des méthodes alternatives faisant intervenir les micro-organismes du sol sont également étudiées. Ces organismes sécrètent des molécules capables d'augmenter la biodisponibilité des métaux et, dans certains cas, d'augmenter la biomasse de la plante : c'est la phytoextraction assistée par bioaugmentation. Deux principaux types de micro-organismes peuvent être utilisés : les PGPB (Bactéries promotrices de la croissance des Plantes) et les CMA (Champignons mycorhiziens à arbuscules). Pour que l'extraction des métaux par les plantes soit améliorée significativement, le choix de l'association plante – micro-organisme doit être pertinente : survie de l'inoculum, plante adaptée et capable d'extraire le métal considéré, etc (Lebeau et al., 2008). Enfin, des études récentes cherchent à exploiter l'influence des exsudats racinaires sur la disponibilité des métaux. Deux méthodes sont reportées dans la littérature. La première consiste à appliquer sur le sol contaminé, mis en culture avec *Echinochloa crus-galli*, les exsudats racinaires de *Brassica chinensis* obtenus par immersion de racines fraîches dans de l'eau pendant 48h (Kim et al., 2010). L'autre méthode consiste à cultiver successivement sur un même sol, une espèce métallicole (*Pinus pinaster*, *Plantago lanceolata* ou *Silene paradoxa*) et une espèce possédant des capacités d'extraction des métaux (*Brassica carinata*) (Quartacci et al., 2009). Ces deux techniques montrent des résultats positifs puisque l'extraction est améliorée. De plus, la présence de ces exsudats, soit appliqués, soit présents dans le sol suite à la culture d'une espèce métallicole, n'ont pas d'effets phytotoxiques, au contraire, ils ont un effet positif sur la biomasse. En effet, ils limitent la perte de biomasse liée à la présence de métaux dans le sol. Une partie du succès de la culture préalable d'espèces métallicoles est liée à la diminution du pH du sol, l'autre partie est liée à l'exsudation de ligands organiques spécifiques. Ces deux actions permettent une augmentation de la concentration des métaux présents dans la solution du sol, et donc disponibles pour la plante, grâce à un mélange d'acides organiques, d'acides phénoliques et de flavonoïdes obtenus naturellement par des espèces adaptées et capables de se développer sur des sols riches en métaux, mais incapables de les accumuler de façon suffisamment importante.

- Devenir des sous-produits de phytoextraction

La biomasse produite lors d'un processus de phytoextraction est contaminée et doit souvent être traitée comme un déchet dangereux (Alkorta et al., 2004). Ces sous-produits constituent un frein au développement de la phytoextraction, qui consiste à répéter la culture de plantes sur un site contaminé jusqu'à ce que la concentration en ETMM du sol se situe sous un niveau acceptable. Ainsi, une quantité très importante de déchet végétal contaminé est produite. Plusieurs options ont été proposées pour éliminer, réduire ou valoriser ces déchets. Le compostage et la compaction de la biomasse ont été envisagés. Des études ont montré que le compostage pouvait réduire significativement le volume de la biomasse récoltée. Toutefois, pendant le compostage, des composés organiques solubles sont formés, augmentant la solubilité des ETMM. Concernant la compaction, la diminution de volume engendrée est avantageuse, puisqu'elle réduit les coûts de transport et de stockage de la biomasse contaminée. Pour ces deux méthodes, le lixiviat doit être collecté et traité de façon approprié.

Une solution prometteuse pour l'utilisation des sous-produits de la phytoextraction est la conversion thermochimique. Ce procédé permettrait même de tirer profit des déchets produits comme source d'énergie. De plus, les cendres produites pourraient être utilisées comme "minéral biologique". La combustion et la gazéification sont envisagées afin de produire de l'énergie électrique et thermique rendant la phytoextraction plus rentable économiquement. La combustion réduit le volume à 2 à 5 %, mais doit être contrôlée puisque les gaz et particules rejetées dans l'environnement peuvent être néfastes. La récupération des résidus d'ETMM présent dans les cendres est possible, mais le coût d'un tel procédé n'est pas estimé. La gazéification permet, à partir de la biomasse, d'obtenir un gaz combustible générant de l'énergie thermique et électrique. Enfin, la pyrolyse, qui consiste à décomposer les matériaux en condition déficitaire en O₂, est intéressante puisqu'elle engendre peu d'émission dans l'air. Les ETMM restent dans le coke (charbon) formé lors de ce procédé, qui peut être utilisé dans les fonderies ou les cimenteries. Cependant, le coût élevé de l'installation et de l'opération peut être un facteur limitant à l'utilisation de la pyrolyse (Ghosh and Singh, 2005).

1.4.2. La phytostabilisation

Cette technique est très efficace lorsqu'une immobilisation rapide est recherchée pour préserver les eaux souterraines et de surface (Jadia and Fulekar, 2009). Le but de la phytostabilisation n'est pas d'éliminer la contamination, mais de la stabiliser afin de limiter les risques pour l'environnement et la santé humaine (Prasad and Freitas, 2003) en réduisant la dissémination des ETMM dans l'environnement, ainsi que leur lessivage (Gohre and Paszkowski, 2006). Le processus de phytostabilisation passe par des phénomènes de sorption, précipitation, complexation ou de réduction de la valence des ETMM (figure 1.17). L'objectif principal des plantes, dans ce cas, est la diminution, grâce aux racines, de la quantité d'eau qui percole à travers le sol pouvant créer des lixiviats dangereux, et la prévention de l'érosion et de la dispersion éolienne grâce au couvert végétal (Mendez and Maier, 2008). En effet, un réseau racinaire dense stabilise les sols et prévient l'érosion. Dans le cas de la phytostabilisation, les contaminants restent dans le sol et nécessitent un suivi régulier (Ghosh and Singh, 2005). Cependant, l'avantage par rapport à la phytoextraction est que, du fait la limitation de l'absorption et de la translocation des ETMM par les plantes utilisées, l'élimination de la biomasse contaminée n'est pas nécessaire et le risque de passage dans la chaîne alimentaire est restreint (Cunningham et al., 1995).

Ainsi, les espèces intéressantes pour la phytostabilisation doivent produire une biomasse racinaire importante capable d'immobiliser les contaminants (Padmavathiamma and Li, 2007). Leur capacité à tolérer les ETMM, à les accumuler dans les racines (facteur de bioaccumulation élevé, c'est-à-dire le rapport de [ETMM racinaire] / [ETMM sol]) doivent être importants, elles doivent peu transloquer les ETMM vers les parties aériennes (facteur de translocation faible, c'est-à-dire le rapport de [ETMM parties aériennes] / [ETMM racinaire], idéalement inférieur à 1), et leur caractère pérenne sont à prendre en compte (Yoon et al., 2006; Mendez and Maier, 2008). L'utilisation à la fois d'herbacées, d'arbustes et d'arbres est conseillée. En effet, les herbes permettent une couverture rapide et limitent temporairement la dispersion éolienne, alors que les arbustes et arbres fournissent un couvert large et possèdent un réseau racinaire plus étendu, prévenant l'érosion sur le long terme (Mendez and Maier, 2008). Enfin, il est intéressant de choisir des espèces natives colonisant naturellement les sites contaminés, puisqu'elles sont plus adaptées à l'écologie du site que des espèces introduites qui pourraient en plus devenir invasives (Padmavathiamma and Li, 2007; Mendez and Maier, 2008). Dans le cas de sites contaminés dans

les zones arides et semi-arides, cette adaptation est d'autant plus importante, puisque les plantes utilisées doivent, en plus des ETMM, tolérer la sécheresse et parfois en plus la salinité de surcroît (Mendez and Maier, 2008).

La végétalisation des sites contaminés par les espèces choisies pour la phytostabilisation, peut être réalisée soit par ensemencement, soit par transplantation. L'ensemencement engendre un couvert végétal plus inégal que la transplantation. Cependant, malgré les meilleurs résultats obtenus, cette dernière approche nécessite un travail plus important, à prendre en considération suivant le contexte du site (Mendez and Maier, 2008).

La phytostabilisation est particulièrement adaptée dans les cas où la phytoextraction n'est économiquement pas faisable et/ou demanderait une période de plusieurs décennies, voire plus. Il s'agit des sites contaminés de façon importante et par une multi-pollution, ou de sites à la contamination très étendue nécessitant une élimination de la contamination à grande échelle (de-Bashan et al., 2012). La phytostabilisation est particulièrement utilisée pour le confinement de résidus miniers (Mendez and Maier, 2008). Cependant, dans ces situations, le substrat est souvent hostile et un "pseudo-sol" doit être créé par ajout de compost, de biosolides et d'eau (de-Bashan et al., 2012). L'apport d'amendements ne se limite cependant pas aux cas des résidus miniers puisqu'en favorisant la formation de complexes métalliques insolubles, ils jouent un rôle important dans la stabilisation rapide des ETMM. Ainsi, l'addition de matière organique humifiée comme du compost, des boues d'épuration ou des copeaux de bois, sont des pratiques communes pour l'immobilisation des ETMM. Ils constituent en plus des fertilisants à libération lente, améliorant la structure du sol et la croissance végétale (Mendez and Maier, 2008; Padmavathiamma and Li, 2007). De la chaux peut également être apportée afin d'élever le pH, et de limiter la mobilité des ETMM. Une autre solution est l'altération des propriétés physico-chimiques du sol en introduisant des anions multifonctionnels comme les phosphates qui augmentent l'adsorption et la précipitation des métaux par l'induction de charges négatives. Ces apports peuvent représenter un coût important s'ils sont effectués à grande échelle.

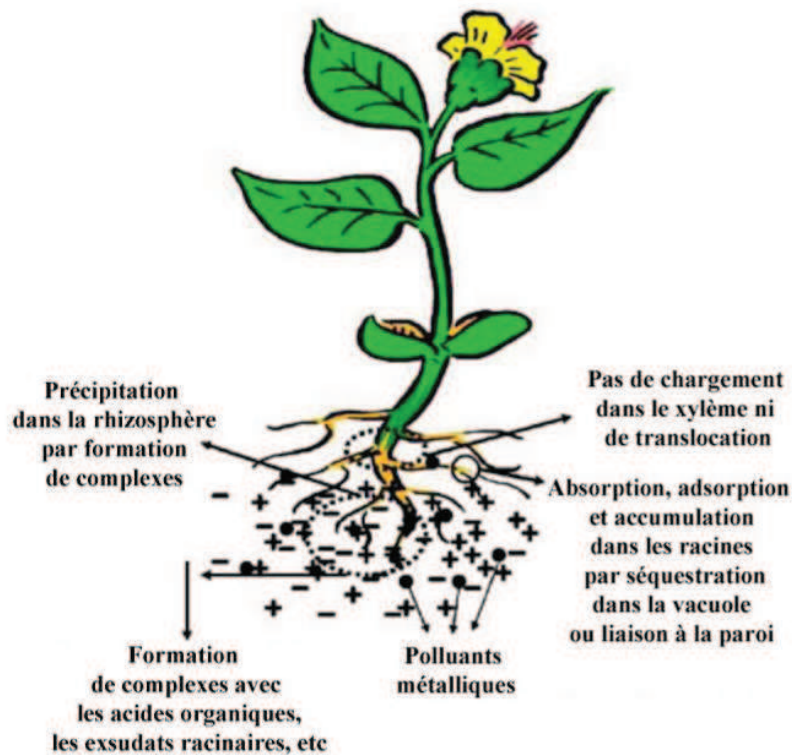


Figure 1.17 : Principe de la phytostabilisation (d'après Padmavathiamma and Li, 2007)

Ainsi, l'inoculation de souches bactériennes de type PGPB et de champignons endomycorrhiziens a été proposée pour favoriser la croissance des plantes sur des sites contaminés et limiter l'apport d'amendements. Les souches microbiennes, préférentiellement natives, et donc métal-tolérantes, peuvent augmenter la résistance des plantes aux stress abiotiques, améliorer la nutrition malgré la présence des ETMM et de ce fait favoriser la croissance racinaire des plantes (de-Bashan et al., 2012).

1.4.3. Risques pour la santé humaine

Parmi les ETMM, certains sont essentiels au métabolisme des animaux à faibles doses. Ces éléments, tels que Cu, Fe, Mn et Zn, sont appelés oligo-éléments. Pour ces éléments, une carence ou un excès peuvent entraîner des anomalies structurelles et physiologiques. D'autres éléments appelés xénobiotiques, comme As, Pb et Sb, sont des substances étrangères à toutes ou à une grande majeure partie des organismes vivants. La présence, même à de faibles concentrations de ces métaux dans les tissus vivants, peut être toxique.

Tous ces ETMM ont des réactivités différentes et leurs effets sur la santé sont donc variables. Ils peuvent pénétrer dans l'organisme par voies digestive (voie de pénétration principale du Cu et du Pb) ou pulmonaire. Le contact de certains ETMM avec la peau peut également être à l'origine de lésions cutanées, ainsi des dermatites sont fréquemment observées dans le cas d'intoxication chronique à As, à Sb et Cu (INERIS, 2005a, 2010, 2007). En cas d'ingestion, les ETMM sont distribués dans l'organisme et leur répartition influencera leurs effets. De nombreux types cellulaires, tissus et organes peuvent être les cibles et être touchés : peau, foie, hématies, squelette, reins, cerveau, etc. Ainsi, des effets hépatiques pouvant avoir pour conséquence l'apparition de cirrhoses sont constatés lors d'ingestion d'As et d'un excès de Cu. L'anémie est une conséquence fréquente d'empoisonnement aux ETMM. Ils peuvent agir directement sur les cellules sanguines en provoquant leur lyse (As, Cu) et/ou indirectement en inhibant l'érythropoïèse (As, Pb) (INERIS, 2005b; a, 2003, 2007, 2010). Il n'est pas rare que le système nerveux soit atteint, conduisant par exemple dans le cas de Pb et de l'As à des pertes de mémoire et une grande irritabilité. Les intoxications au Pb présentent en plus des effets sur le développement psychomoteur ou intellectuel. Des études ont montré une baisse du QI de 4 à 7 points pour des enfants de 6 à 12 ans exposés au Pb (INERIS, 2010, 2003). Le développement et le fonctionnement du système reproductif peuvent également être atteints. Ainsi, la présence d'As et de Sb dans le sang sont à l'origine, entre autre, d'avortements spontanés et de prématurité (INERIS, 2010, 2007). Le Pb quant à lui diminue la fertilité en réduisant la production de spermatozoïdes et la fécondité des femmes. Enfin, dans le cas de substances cancérigènes tel que le Pb et l'As inorganique, une intoxication peut augmenter le risque de développer un cancer (INERIS, 2003, 2010).

La relation entre la spéciation du Pb dans la plante et son aptitude à être transféré puis métabolisé tout au long de la chaîne alimentaire n'est pas encore totalement élucidée. En effet, la toxicité du Pb dépend de sa forme chimique ou spéciation: le Pb organique peut être plus toxique que le Pb inorganique parce qu'il est absorbé plus facilement (Peralta-Videa et al., 2009). Ce que l'on sait, c'est que 5 à 10 % du Pb absorbé s'accumulera dans les tissus mous dont principalement les reins, le foie, la rate mais aussi le cerveau. Cette part représente la quasi-totalité du Pb biologiquement actif (Lasalle, 2005). Sa fixation est due à des protéines ou des polypeptides ayant une forte affinité pour le plomb comme la thymosine et la protéine de liaison acyl-coA (Peralta-Videa et al, 2009). Concernant le reste, 1 à 2 % est retrouvé dans le sang et environ 90%

sont stockés dans les os (Lasalle, 2007). Ainsi, en se référant aux données proposées par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), la DJA (Dose Journalière Admissible, correspondant à une concentration limite ingérée par voie orale au-delà de laquelle des risques toxicologiques sont possibles pour l'homme) pour le Pb est de $3,5 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (Baars et al., 2001).

Comme nous l'avons déjà vu, la toxicité, la mobilité dans l'environnement et la biodisponibilité de l'As dépendent de sa spéciation : les formes arsénite, As (III), sont plus toxiques mais moins mobiles que les formes arséniate As (V) ou organoarséniales (Peralta-Videa et al, 2009). L'As assimilé par les végétaux peut être transloqué à hauteur de 75 % vers les parties aériennes pour les plantes tolérantes, contre seulement 50 % pour les plantes non tolérantes. Ainsi, dans le cas de l'As, le transport du contaminant des racines vers les tiges par le xylème constitue un mécanisme de détoxification et donc de tolérance (Willey, 2007). L'étude de la spéciation de l'As dans les végétaux montre que l'espèce chimique stockée de façon prédominante dans les parties aériennes est la forme As(III), alors que dans les racines les deux états d'oxydations sont présents. Cette réduction est réalisée grâce à une enzyme, présente dans les racines: l'arséniate reductase (Peralta-Videa et al, 2009). L'As présent dans les plantes peut être transmis au maillon suivant de la chaîne alimentaire, notamment aux herbivores invertébrés (escargots, limaces). De plus, dans les plantes la détoxification de l'arsénite inorganique passe par un phénomène de méthylation. Les molécules alors obtenues (acide monométhylarsinique (MMA), acide diméthylarsinique (DMA) et triméthylarsine) sont fortement métabolisables par les humains (Peralta-Videa et al., 2009). Ainsi, l'As présent dans le sol se retrouve dans la chaîne alimentaire, et la consommation de plantes issues d'un terrain contaminé peut directement ou indirectement (via un maillon supérieur de la chaîne trophique) être à l'origine de problèmes sanitaires et de santé. Ainsi, en se référant aux données proposées par l'OMS, la DJA pour As est de $2 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (Baars et al, 2001).

Les formes hydrosolubles de Sb sont capables d'être absorbées et accumulées facilement par les végétaux. Mais généralement les formes phytodisponibles ne sont pas majoritaires dans les sols pollués, et l'accumulation de Sb par les plantes est donc faible (Hammel et al., 2000). Cependant, ces dernières sont capables de l'accumuler lorsqu'il est soluble. Une comparaison de sa distribution dans les différentes espèces végétales étudiées montre qu'il est essentiellement accumulé dans les feuilles et les tiges, alors que les organes de stockage, les graines et les fruits

en contiennent très peu. Cette présence dans les parties aériennes indique que Sb est transporté depuis les racines par le xylème, mais qu'une barrière de transport existe pour les parties génératives (Hammel et al, 2000). Chez l'Homme, Sb est faiblement absorbé par la voie digestive. Par voie respiratoire, l'absorption va dépendre de la taille des particules, mais la majorité sera éliminée par le tapis mucociliaire. Comme pour l'arsenic, la toxicité de l'antimoine dépend de sa spéciation. Ainsi, en se référant aux données proposées par l'OMS, la DJA pour Sb est de $6 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (WHO, 2006).

1.5. Problématique de la contamination issue du site de l'Escalette

1.5.1. Le site de l'Escalette

En région Provence-Alpes-Côte-d'Azur (PACA), la ville de Marseille a connu une histoire industrielle liée à la métallurgie. Ainsi, il reste sur la commune 3 anciens sites abandonnés qui ont été le lieu d'activités liées à la métallurgie du plomb (figure 1.18) : le site de Figueroa en activité de 1854 à 1878, le site de Légré Mante exploité de 1857 à 1883, et le site de l'Escalette en activité entre 1851 et 1925, dont la production de plomb a été la plus importante de la ville (figure 1.19) (Conseil Général des Bouches du Rhône, 2001). L'usine de l'Escalette est située sur une zone d'environ 4 ha, en bordure de mer et adossée aux collines du massif de Marseilleveyre (BASOL, 2012). D'importantes contaminations des sols en ETMM ont déjà été relevées sur ce site, mais jusqu'à présent aucune action globale de traitement de la pollution n'a été entreprise (Lasalle, 2007; Testiati et al., 2013). De précédentes études, ainsi que celles réalisées dans le cadre du projet de recherche Marséco (2008-2013) dans lequel s'inscrit ce travail de thèse (projet ANR Marséco : "Etude des flux de contaminants et fonctionnement des écosystèmes littoraux provençaux. : transfert sol-eau-biocénose"), ont conduit à un état des lieux de la contamination du site et à un diagnostic sur les priorités des actions à mener. La friche industrielle de l'Escalette étant un site pollué à responsable défaillant et le rapport de l'INVS ayant établi que la pollution issue de ce site présentait un risque pour la santé public, l'Etat a désigné l'ADEME comme maître d'ouvrage pour la réalisation des travaux de gestion de pollution sur les zones de dépôts majeurs comprenant les crassiers et la cheminée rampante (AO-1225-1952 ouvert en juin 2012). La pollution diffuse largement dispersée sur le site comme l'a mis en évidence le projet de recherche Marséco ne sera pas inclus dans ces opérations. De plus, l'ensemble des mesures de gestion qui

vont être prises sur ce site devront prendre en considération la préservation de la biodiversité puisque depuis avril 2012, le Parc National des Calanques (PNC) a été créé et le site de l'Escalette a été inclus dans la zone de cœur du parc.

1.5.2. Historique des activités de l'usine de l'Escalette

L'Escalette fait partie des sept établissements créés entre 1848 et 1854 à Marseille destinés à l'extraction du plomb (Daumalin and Raveux, 2005). Celle-ci constituait un élément fort du dynamisme de la métallurgie marseillaise dans la deuxième moitié du XIX^{ème} siècle (figure 1.19). Son exploitation s'arrête le 26 septembre 1925 (MAEVA, 2007). L'usine de l'Escalette est fondée par Monsieur Meynier en 1851. Son activité consistait à extraire l'argent de la galène argentifère provenant principalement d'Espagne et de livrer le plomb brut au commerce français et méditerranéen. L'usine change rapidement de propriétaire en 1854. Elle est rachetée par un négociant marseillais en métaux, Monsieur Gautier. Ce dernier, après avoir obtenu l'autorisation de conserver et de tenir en activité l'usine pour la fusion du minerai de plomb et de cuivre, permet à l'usine de reprendre son activité originelle. L'usine produit plus de 3 000 tonnes de plomb brut et plus de 1 700 kg d'argent par an. En 1898, l'usine est acquise par des banquiers, et son exploitation s'arrête le 26 septembre 1925 (MAEVA, 2007; Raveux, 2002)

Le processus utilisé dans le traitement de la galène est la pyrométallurgie, qui consiste en un traitement thermique de la galène provoquant des modifications physiques et chimiques des matériaux (MAEVA, 2007; IUP environnement, CERA, 2005). La galène (sulfure de plomb) est le minerai de plomb le plus utilisé et c'est aussi l'un des principaux minerais d'argent par suite des inclusions de minéraux d'argent qu'elle contient. La galène est rencontrée dans la plupart des cas en association avec la blende (ZnS) et la pyrite (FeS₂) ainsi qu'avec la chalcopyrrite (CuFeS₂). Au cours de sa formation, la galène se combine à d'autres éléments comme l'arsenic, le baryum, le bore et l'antimoine, alors que les teneurs en plomb, cuivre, zinc, soufre, phosphore et chlore augmentent de façon spectaculaire.

Les minerais traités à l'Escalette (galène argentifère) provenaient majoritairement de mines espagnoles et dans une plus faible proportion de mines italiennes. Il ne semble pas subsister de minerais bruts sur le site, mais la galène traitée était référencée par le Chemical Abstract Service :

CAS n°12179-39-4. Palero-Fernandez and Martin-Izard (2005) ont analysé par diffraction X, plusieurs dépôts miniers dans la vallée d'Alcudia en Espagne, qui correspondait à l'une des plus importantes zones de production de galène durant les 19^{ème} et 20^{ème} siècles. Ces minerais sont riches en argent et les résultats obtenus dans l'étude précédente donnent une bonne idée de la qualité des minerais traités à l'Escalette. Ainsi pour le dépôt minier de type E (riche en argent), Palero-Fernandez et Martin-Izard (2005) ont trouvé (moyennes des résultats de pourcentages ou de concentrations de 34 dépôts, écart type entre parenthèse) : 83,4 % (1,9) de Pb ; 0,27 % (0,35) de Fe ; 235 mg/kg (557) de Zn ; 2614 mg/kg (1571) de Sb ; 812 mg/kg (1008) de Ag ; 448 mg/kg (596) de Cu ; 27 mg/kg (36) de Mn ; 32 mg/kg (54) de Ni ; 4,5 mg/kg (4,9) de Cd ; 95,1 mg/kg (103) de As et 14 mg/kg (9) de Hg. D'autre part, des analyses par diffraction X ont été réalisées sur les dépôts de scories présents sur le site de l'Escalette (Testiati, 2012). Cette détermination de la composition minéralogique des résidus du traitement de la galène a permis l'identification des principaux minéraux suivants : Calcite (CaCO_3) ; Akermanite ($\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$) ; Anglesite (PbSO_4) ; Galena (PbS) ; Hardystonite ($\text{Ca}_2\text{ZnSi}_2\text{O}_7$) ; Magnétite ($\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$) ; Petedunnite ($\text{Ca}(\text{Zn},\text{Mn}^{2+},\text{Mg},\text{Fe}^{2+})(\text{Si}_2\text{O}_6)$) ; Quartz (SiO_2) ; Willémité (Zn_2SiO_4) ; Wurtzite (ZnS), etc.

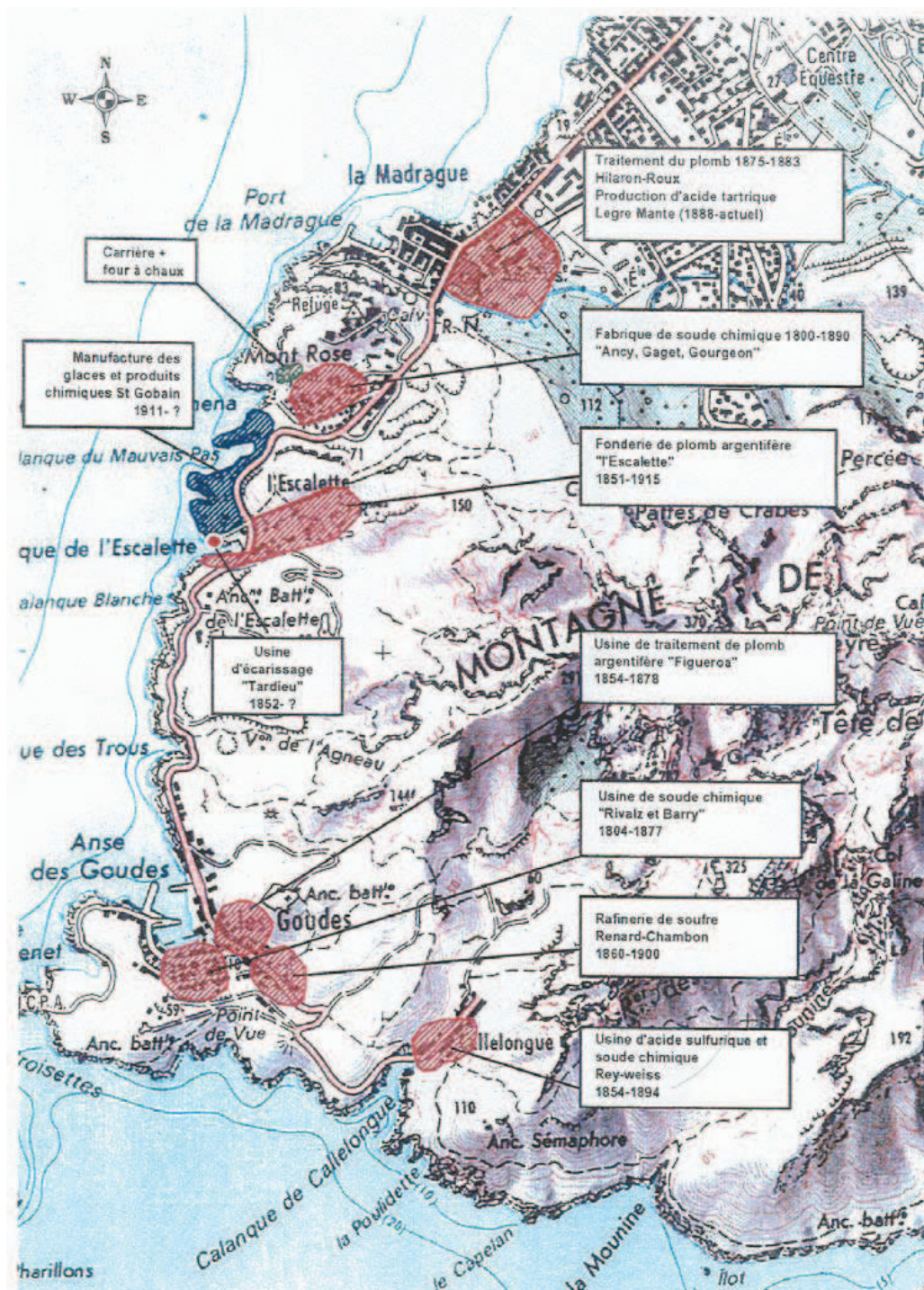


Figure 1.18 : Plan de masse des activités industrielles sur le littoral sud de Marseille au 19^{ème} siècle (Conseil Général des Bouches du Rhône, 2001)



Figure 1.19 : Situation géographique du site de l'Escalette (d'après Airmarais, 2003)

Les principaux avantages des procédés pyrométallurgiques sont la cinétique et le fait que les réactions chimiques mises en jeu soient exothermiques. Ainsi, ce procédé nécessitant des réactifs chimiques bon marché, ne nécessite aussi qu'une faible consommation de combustible.

La pyrométallurgie est composée de trois étapes (figure 1.20) : le grillage, la fusion réductrice et l'affinage

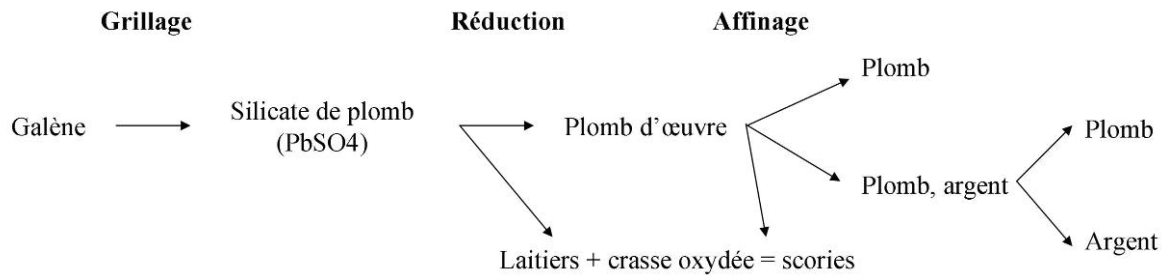


Figure 1.20 : Schéma du procédé d'extraction du plomb à partir de la galène (rapport Maeva, 2007 ; Testiati, 2012).

Au cours des différentes phases de traitements de la galène des pollutions sont émises :

- ✓ Des sulfates et oxydes de différents ETMM lors du grillage,
- ✓ De l'arsenic, du plomb et de l'antimoine, volatilisés et/ou sorbés sur des fines particules, et rejetés par la cheminée au cours de la réduction,
- ✓ Du fer, du cuivre, du zinc et de la litharge pendant la réduction et l'affinage, et lors de l'élimination des crasses.

1.5.3. Etat des connaissances actuelles sur les impacts environnementaux liés à l'ancienne usine de l'Escalette.

Après l'apparition de graves problèmes sanitaires chez les ouvriers, de longues cheminées rampantes ont été construites pour éloigner les fumées nocives du site (figure 1.21). Les cendres qui se déposaient dans ces conduits ont été régulièrement curées et probablement réutilisées dans du ciment pour consolider certaines parties du bâti (Lasalle, 2007). La plupart des déchets solides produits (laitiers, crasses, scories), désignés par le terme générique de « scories », consécutifs à l'activité de l'usine sont encore visibles sur le site. Les scories ont été déposées au niveau d'un dépôt principal appelé localement crassier, situé dans le vallon proche de l'usine et au niveau de

nombreux dépôts épars le long du littoral (source BASOL). A l'heure actuelle, les ruines de l'usine et le crassier sont toujours en place, et constituent une source de pollution concentrée sur le site, qui se diffuse également sur les zones alentour. De plus, les remblais de l'usine, riches en scories, ont fourni un matériau bon marché, notamment pour la construction de la chaussée et des avancées sur la mer sur le littoral situé entre Montredon et le port de Callelongue (SPPPI 2006, *Secrétariat Permanent pour la Prévention des Pollutions Industrielles-PACA*). Ainsi le long du littoral, une douzaine de dépôts et plus de 70 mini-dépôts ont été recensés pour un volume estimé à environ 8 500 m³. Au niveau de la zone de l'usine elle-même, deux sites particuliers ont été référencés dans la base de données BASOL et correspondent à l'ancienne fonderie sur terrain privé (≈4ha), et aux terrains du Conseil Général des Bouches-du-Rhône (≈50ha) où est situé le crassier d'un volume d'environ 10000 m³. En raison de ces quantités importantes de dépôts et crassier présents sur le site, une analyse de la composition en ETMM des scories constituant les crassiers a été entreprise par (ANTEA, 2001) et présentée par les étudiants de l'IUP environnement lors d'une étude de cas : CERA, 2005). Les ETMM considérés dans cette étude sont As, Cd, Cu, Pb, Sb et Zn. Les gammes de concentrations trouvées sont de : 0,162 à 0,764 g/kg pour As, de 0,002 à 0,006 g/kg pour Cd, de 0,554 à 1,94 g/kg pour Cu, de 6 à 38,9 g/kg pour Pb ; de 0,252 à 1,08 g/kg pour Sb et de 20 à 64,5 g/kg pour Zn. Les teneurs importantes en zinc dans ces scories peuvent être expliquées par le fait que la galène est souvent associée à la blende (ZnS). Le zinc, l'arsenic, le cuivre et l'antimoine font parti des impuretés retrouvées dans les crasses surnageantes au cours des différentes étapes du procédé de transformation de la galène. Les facteurs influençant la composition chimique des scories sont multiples : type de fourneau, charge, température, pression, pressions partielles de gaz (O₂, CO, CO₂). Ils peuvent varier fortement dans le temps, dans le même fourneau, mais aussi au cours de la même opération (IUP Environnement-CERA, 2005). Ainsi des analyses complémentaires ont été réalisées sur d'autres échantillons de scories issues du crassier principal ainsi que sur des échantillons d'encroûtement récupérés dans les ruines de la cheminée rampante (tableau 1.4, Testiati, 2012).



Figure 1.21: Vue aérienne de l'ancienne usine de l'Escalette.

Tableau 1.4 : Concentrations totales en ETMM dans les scories et les encroûtements de la cheminée rampante, sur site de l'ancienne usine de l'Escalette (en mg.kg^{-1} ou ppm) (Testiati, 2012).

Localisation	Éléments en mg/kg				
	Pb	As	Sb	Cu	Zn
Scories (4 échantillons) min-max	55 800 à 127 300	500 à 1 200	398 à 8 460	1 620 à 5 090	35 400 à 88 600
Encroûtements dans la cheminée rampante Moyenne de 2 échantillons	128 600	86 560	1 990	178	6 770

Ces pratiques ont entraîné une dispersion de la pollution sur toute la partie littorale du massif de Marseilleveyre. Ainsi, diverses études, touchant les différents compartiments abiotiques (eau, sol, air) et biotiques (plantes, animaux), ont été effectuées afin de mettre en évidence l'étendue de la contamination en ETMM sur et aux alentours du site de l'Escalette par les bureaux CEBTP et ANTEA, ainsi que par les Services Maritimes des Bouches du Rhône et l'association AIRMARAIX, par l'IUP DENTES de l'Université de Provence (mandaté par le Conseil général, nom du groupe d'étude : CERA), et par des étudiants du Master MAEVA dans le cadre de leur projet d'étude. Enfin très récemment, dans le cadre du projet de recherche Marséco (financé par

l'Agence Nationale de Recherche : programme Contaminants-Ecosystèmes-Santé, 2008-CESA-018, 2008-2013) précédemment citée une étude a été réalisée au niveau du site de l'Escalette dans le cadre des travaux de la thèse de E. Testiati (2012).

1.5.3.1. Pollution des eaux

Les analyses conduites par le CEBTP ont prouvé que la nappe n'est pas polluée. Or, les tests de lixiviation effectués par le CERA et les mesures sur le ruissellement des dépôts de scories, effectuées par le CEBTP, ont montré que le plomb et d'autres ETMM pouvaient lessiver. Ces résultats laissent supposer que ces éléments n'ont pas été entraînés en profondeur, vers la nappe, mais qu'ils ont été transportés en surface, les rendant potentiellement disponibles pour les racines des végétaux. Par ailleurs, l'Institut de Veille Sanitaire (Lasalle, 2005, 2007) a décelé une contamination en plomb des sédiments au large du port de l'Escalette, ainsi que des concentrations relativement importantes dans les oursins (environ 10 fois plus que dans les moules). La contamination semble être liée à l'ancienne usine et ses différents dépôts, mais également aux remblais utilisés pour la construction de la route des Goudes. Ces observations ont abouti à la fermeture temporaire de la plage de Saména à proximité de l'Escalette, ainsi qu'à l'interdiction de la pêche et de la consommation des oursins.

1.5.3.2. Pollution de l'air

Deux campagnes d'étude sur le transport aérien des particules polluantes ont été réalisées en hiver et en été par Airmaraix (2003) sur la fraction inhalable (PM₁₀ : particules de diamètre inférieur à 10µm), et sur une fraction sédimentable, non réglementée, susceptibles d'être ingérées et déposées dans les habitations, sur les sols et sur les végétaux. La quantité d'ETMM présente dans chacune des fractions a également été mesurée. Outre des niveaux de PM₁₀ qui ne satisfont pas aux objectifs de qualité fixés par le décret du 15 février 2002, l'association AIRMARAIX a mis en évidence une mobilité atmosphérique des ETMM supérieure l'été que l'hiver. En ce qui concerne la fraction sédimentable, seule une campagne d'été a été effectuée. Les teneurs de cette fraction en As et Pb sur les zones de prélèvement situés à proximité de l'usine, sur des zones peu couvertes, étaient jusqu'à 53 fois plus importantes que celles du témoin. De plus, au cœur des habitations proches de l'usine, des flux d'As et Pb 4 fois supérieurs à ceux mesurés au niveau du

site témoin ont été révélés. Une bonne corrélation entre le flux de particules sédimentaire et les flux d'As et de Pb a été observée. La correspondance du rapport Pb/As trouvé dans les particules avec celui trouvé dans les sols (environ 30), ne laisse aucun doute sur la provenance de ces contaminants. Ces mesures ont également mis en évidence les conditions les plus favorables à l'envol des particules, à savoir un vent de Sud-Est, tandis que le mistral semble moins pénalisant, probablement du fait du relief situé au Nord-Ouest de l'usine.

1.5.3.3. Pollution des sols

Concernant les concentrations en métaux et métalloïdes sur les sols du site de l'ancienne usine, des analyses montrent des gammes de concentration sur le site comprises entre 0,075 à 130 g/kg pour Pb, 0,21 à 66 g/kg pour Zn, 0,02 à 66 g/kg pour Cu, <0,005 à 9,03 g/kg pour Sb et <0,008 à 7,0 g/kg pour As (Testiati et al, 2013). Cette contamination est particulièrement importante autour de l'ancienne cheminée rampante, qui est éventrée. A cet endroit, les concentrations de Pb, As et Sb mesurées sont respectivement de 61 ± 42 ; $4,0 \pm 2,8$ et $4,1 \pm 2,0$ g/kg (Testiati, 2012). Pour donner une idée du niveau de contamination en Pb, la valeur mesurée autour de l'ancienne cheminée est plus de 2000 fois supérieure à la valeur de Pb moyen des sols agricoles français (Baize et al., 2008). Ces contaminations importantes ne sont cependant pas cloisonnées au site même de l'usine. En effet, comme les études des particules remises en suspension par le vent le laissaient présager, les sols alentour ont été contaminés par voie atmosphérique. Ceci a été mis en évidence dans le cadre du projet Marséco, pour lequel une cartographie de la contamination des sols des calanques a été réalisée par analyse des ETMM par XRF portable (travail collectif, présenté partiellement par Testiati, 2012). En effet, afin de connaître l'état de contamination et de dispersion des ETMM dans le massif des Calanques (de Marseille à Sormiou), une planification de prélèvements et d'analyses des sols de surface a été effectuée dans le but de produire des cartographies de concentrations de la région (travail collectif des différentes équipes de recherche participant au projet Marséco). Cette zone s'étendant sur tout le massif de Marseillevéyre, a été divisée en 250 carrés avec un maillage de 250 x 250 m chacun. Au centre de chaque carré, un échantillon du sol de surface (0-15 cm de profondeur) a été recueilli à partir d'un maillage de 1 m². Sur chacun de ces 250 échantillons, les teneurs en métaux et métalloïdes ont été déterminées grâce à un spectromètre de fluorescence X portable (Niton XLT 792, Fondis Electronic) (figure 1.22). Les résultats montrent une contamination importante en Pb, As et Zn dans un rayon de plus

de un kilomètre autour de l'ancienne usine, dans les collines du Parc National des Calanques. Ainsi, les conséquences de l'activité passée de l'usine de l'Escalette ne touchent pas que le site de l'ancienne usine, puisqu'une partie des Calanques, incluse dans une zone protégée, est également contaminée. Les représentations cartographiques (figures 1.23, 1.24 et 1.25) mettent en évidence l'impact de l'ancienne usine de l'Escalette. Les niveaux ou classes de contamination les plus élevés pour As (de 0,77 à 6,36 g.kg⁻¹), Pb (de 5,9 à 38,3 g.kg⁻¹) et Zn (de 5,2 à 11,1 g.kg⁻¹), se situent au niveau du site industriel mais une dissémination de ces ETMM est aussi très nette. Les classes de concentrations ont été déterminées par traitement statistique (par E. Dumas, 2012, publication personnelle) avec le logiciel XLSTAT, en prenant en compte la répartition du nombre d'échantillons dans les différents percentiles des gammes de concentrations pour chaque élément. Les hauts niveaux de contamination dans l'ancienne zone industrielle sont à relier à la présence de crassiers, aux émissions anciennes via la cheminée rampante mais aussi à la dégradation progressive de cette dernière, libérant dans l'environnement des matériaux fortement pollués. Les origines de la dissémination des ETMM sont diverses : déposition des contaminants émis par la cheminée au cours de la période d'activité, dispersion par envollement - redéposition sous l'influence des vents, en particulier des vents dominants, réutilisation des laitiers et scories comme matériaux de construction, en particulier comme soubassement routier de la route de l'Escalette à Callelongue. Pour l'arsenic, on note la prédominance des deux premiers mécanismes alors que pour les autres éléments (Pb et Zn), vient s'ajouter l'utilisation des scories comme matériau de remblai, utilisation particulièrement visible tout au long de la côte.

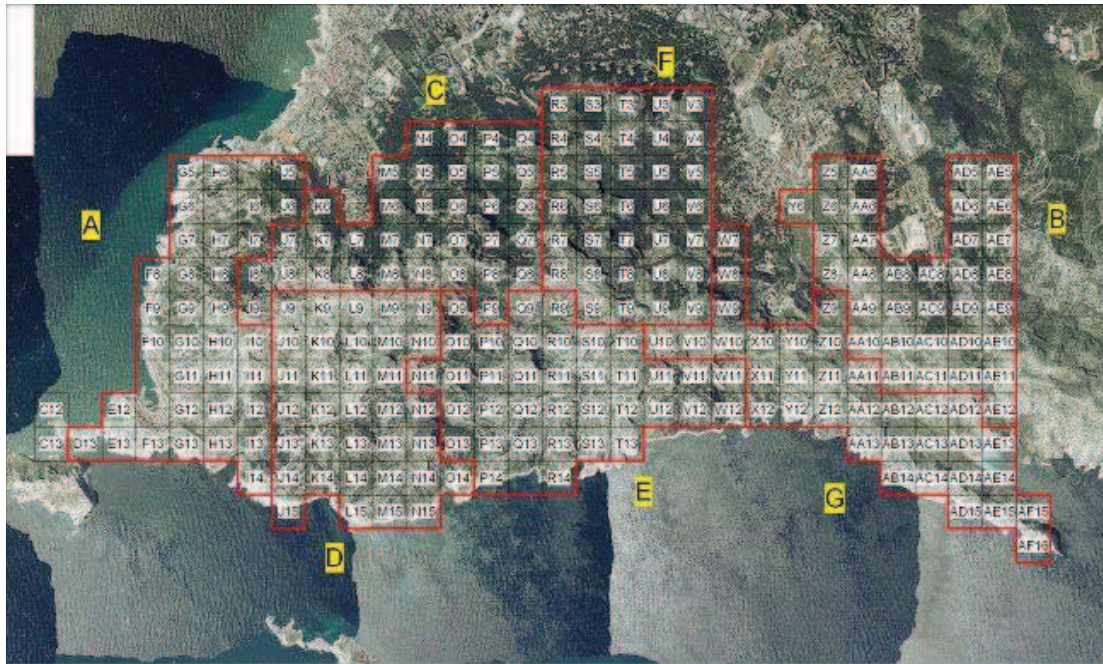


Figure 1.22 : Plan des points de prélèvements pour la cartographie des contaminations en ETMM dans le massif des Calanques (Marséco 2008, Testiati, 2012).

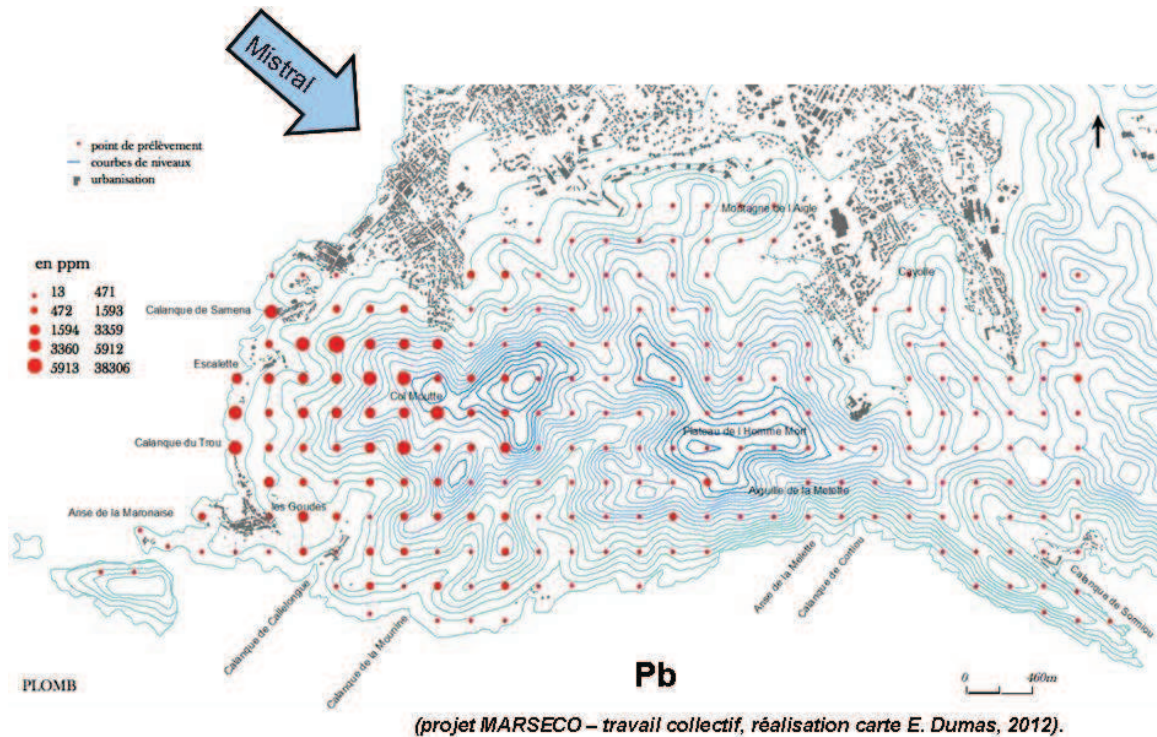
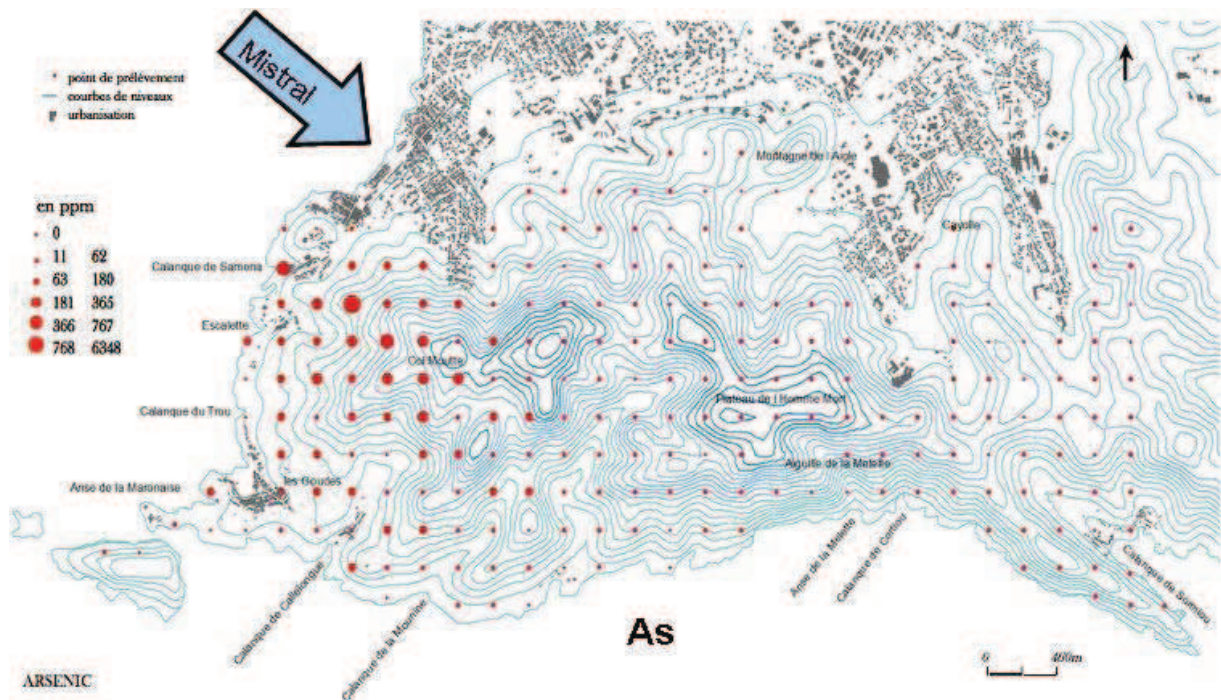
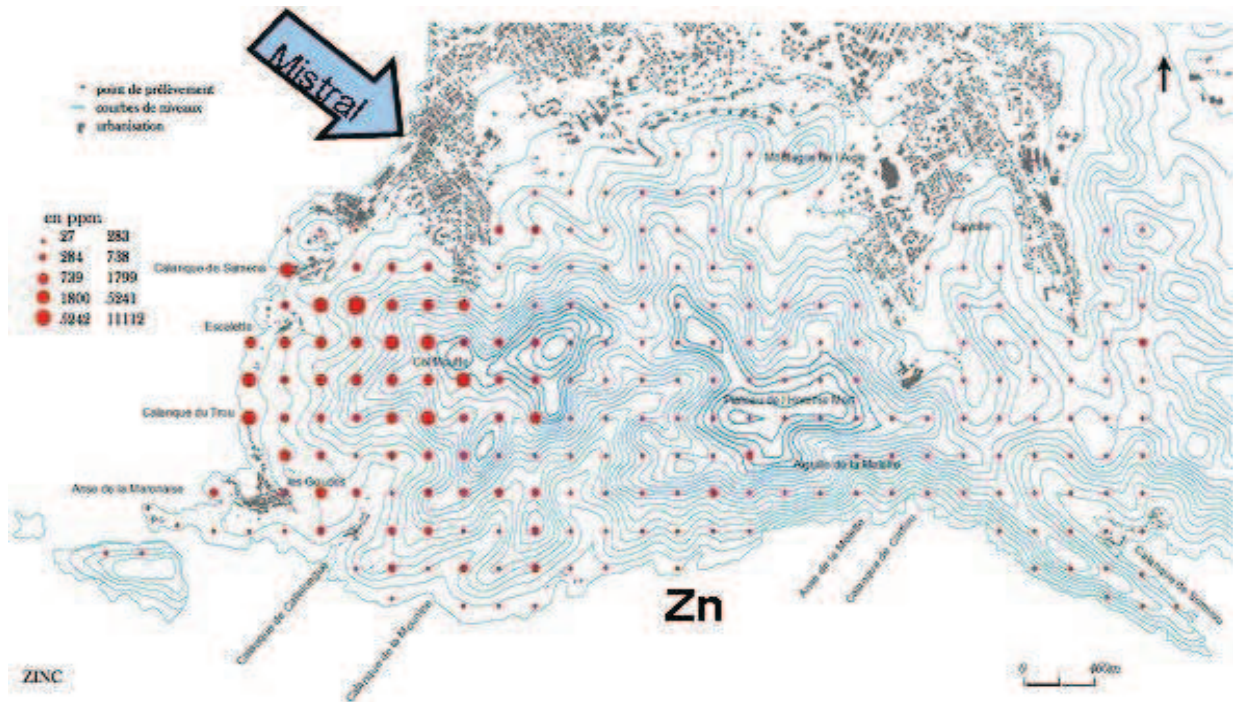


Figure 1.23 : Zone côtière des calanques de Marseille : contaminations par l'élément plomb, Pb (projet Marséco – travail collectif, réalisation carte E. Dumas, 2012)



1.5.3.4. Transfert à la biocénose et risque pour la santé

Les métaux présents dans le sol peuvent être absorbés et transloqués vers les parties aériennes de certains végétaux. Le risque est un transfert dans la chaîne alimentaire puisque ces végétaux peuvent être ingérés par des animaux et des êtres humains. Le CEBTP et le CERA ont conduit des analyses sur la pollution des végétaux cultivés dans les jardins des habitations de l'Escalette. Seules les tomates ont montré, après lavage, une réelle contamination, soulevant le problème d'un transfert sol-végétal. Un groupe de recherche MAEVA (2008) a conduit des quantifications d'ETMM sur *Lobularia maritima*, l'alyse maritime, une plante herbacée de la famille des Brassicacées présente sur tout le site. Dans l'ensemble, ils n'ont détecté que de très faibles concentrations, à part pour le plomb et le zinc. Le groupe MAEVA (2007), quant à lui, a réalisé des quantifications d'ETMM sur d'autres organismes vivants : chenilles, aiguilles de pin d'Alep, mousses. Les résultats de ces analyses ne sont pas exploitables pour le plomb, mais ils mettent en évidence des concentrations en As de 23 mg/kg environ sur les aiguilles de pin et de 208 mg/kg environ dans les chenilles. Il convient de préciser que les aiguilles de pin sont consommées par les chenilles et que ces dernières n'ont pas été lavées avant analyse. Bien qu'il soit très probable qu'une partie de la contamination des chenilles provienne de l'ingestion d'aiguilles, elles-mêmes contaminées, il ne faut pas écarter le fait qu'une autre partie de la pollution détectée puisse provenir du dépôt atmosphérique de particules contaminées.

Plus récemment, des travaux ont mis en évidence les concentrations en ETMM dans les racines et parties aériennes des espèces végétales les plus représentées sur le site de l'ancienne usine c'est à dire : *Globularia alypum*, *Juniperus phoenicea*, *Lobularia maritima*, et *Rosmarinus officinalis* (Testiati, 2012). Ces résultats montrent un recoupement intéressant entre la présence et la représentativité de *G. alypum* et *R. officinalis* et les concentrations en ETMM mesurées dans ces plantes. La concentration en ETMM dans les racines de ces deux espèces est significativement corrélée à leur concentration dans le sol (excepté pour Cu). Les résultats montrent également que les concentrations en Pb, Zn, Cu et As dans les parties aériennes de *G. alypum* et *R. officinalis* sont généralement inférieures à celle mesurées dans les racines, même si elles restent relativement importantes puisqu'il a été mesuré pour le plomb jusqu'à 1023 et 153 mg/kg et pour l'arsenic jusqu'à 33 et 180 mg/kg dans *G. alypum* et *R. officinalis* respectivement (figure 1.26). En dehors de ces quelques études, concernant le site de l'ancienne usine, aucune donnée n'existe sur la concentration des ETMM dans les espèces végétales natives sur le massif des Calanques. Or,

une contamination notable est présente dans les sols sur une zone plus étendue dans ce massif (figures 1.23 à 25).

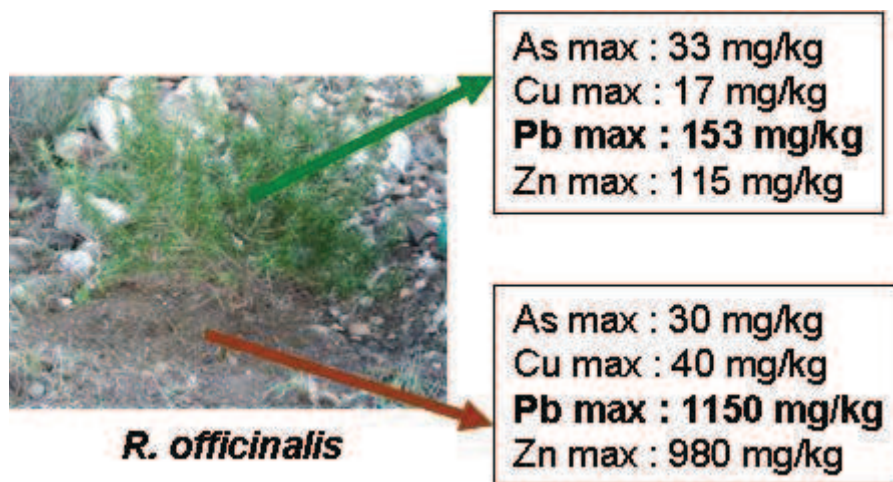


Figure 1.26 : Concentrations maximales (mg/kg) mesurées dans les parties aériennes et dans les racines de romarin sur le site de l'Escalette (Testiati, 2012).

Ainsi, la pollution de l'Escalette par les ETMM semble toucher l'ensemble des compartiments abiotiques (sol, eau, air), mais également la biocénose. L'ancienne usine continue à constituer une source de pollution qui peut se disséminer dans l'environnement. Les usagers récurrents et occasionnels du site ont plus ou moins de risques d'exposition aux polluants, notamment par inhalation les jours de fort vent ou par la consommation de coquillages et d'herbes aromatiques récoltées sur le massif (Lasalle, 2007). En effet, le travail de thèse précédent (Testiati, 2012) a montré que le romarin (*R. officinalis*), une espèce aromatique native et présente dans tout le massif, peut contenir des teneurs en Pb et As relativement importantes (figure 1.25). De plus, le site est toujours actuellement occupé par une cinquantaine d'habitants dans le quartier dit de l'Escalette occupant des maisons construites autour des bâtiments de l'ancienne industrie. Les résultats des précédentes études soulèvent des questionnements sur les risques pouvant impacter cette populations. L'INVS (Lasalle, 2005) a déterminé en 2005 que le fait de résider à l'Escalette, de fréquenter la plage de Saména et de consommer les oursins (la consommation des moules étant déjà interdite sur cette portion du littoral) pouvait être à « l'origine d'un risque sanitaire inacceptable pour la population et plus particulièrement pour les jeunes enfants ». De plus, l'INVS préconisait des actions d'ordre sanitaire (dépistage du saturnisme) et environnemental afin de réduire l'exposition de la population à la pollution. En effet, ces recommandations portaient sur la réhabilitation de tous les sites pollués pouvant présenter une source de

contamination, avec une priorité particulière pour les zones habitées et fréquentées par des usagers. Un rapport plus récent (SPPPI, 2006) détaille les actions devant être menées sur les différents terrains de l'Escalette : un projet de réhabilitation par le confinement du crassier situé sur des terrains appartenant au CG13 ; une mise en sécurité de l'ancien site industriel de l'Escalette, propriété privée, pour en limiter l'accès, ainsi qu'une information auprès des locataires incitant à ne pas consommer les produits potagers cultivés sur place ; la mise en place d'un revêtement sur les sols non recouverts de l'usine.

Cependant, la dépollution envisagée actuellement par l'Etat ne concerne que les zones présentant les dépôts de déchets les plus importants et non pas celles touchées par la pollution diffuse. Ainsi, il semble nécessaire de s'intéresser aux problèmes liés à la pollution diffuse qui affecte les terrains adjacents à l'usine et plus loin dans le massif. Dans le contexte de forte biodiversité du site, les solutions à déployer pour limiter le transfert de pollution ne doivent pas avoir d'effet écologique néfaste sur une zone dans le périmètre du Parc National des Calanques. Les techniques classiques de dépollution des sols pollués par des métaux et métalloïdes sont onéreuses, lourdes à mettre en œuvre et peuvent créer des risques secondaires pour l'environnement (Fitz and Wenzel, 2002). Les techniques de phytoremédiation plus facilement applicables à de grandes surfaces, et permettant de limiter les perturbations exercées par une dépollution du sol sur le fonctionnement et l'intégrité des écosystèmes semblent plus adaptées (Baker et al., 1994). Ainsi, afin de déterminer le potentiel de plantes natives dans des projets de phytoremédiation, il est indispensable de recenser les plantes natives sur la zone impactée et de s'intéresser à leur potentiel de phytoremédiation, et donc en particulier à leur tolérance aux pollutions.

1.5.4 Relevés floristiques sur le site de l'Escalette

Des relevés floristiques ont été réalisés au niveau de l'ancienne usine dans le cadre des travaux de thèse de Testiati (2012). Sur ce site industriel métallurgique abandonné, qui n'a jamais été remis en état, des plantes indigènes ont colonisé naturellement les ruines et dépôts. Les espèces retrouvées sont, entre autres, *Globularia alypum* L., *Lobularia maritima* (L.) Desv., *Juniperus phoenicea* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Santolina chamaecyparissus*, *Senecio cineraria*, etc. Les espèces végétales, méditerranéennes, médio-européennes ou cosmopolites, ont été déterminées à

l'aide des flores adaptées (Bournérias and Aymonin, 1998; Coste, 1937; Fournier, 1961; Jauzein, 1995; Palese and Aeschmann, 1990 ; Pialot, 1988). Des espèces végétales typiques des pelouses sèches méditerranéennes sont présentes ainsi que des espèces. « échappées des jardins » comme les iris et des espèces rudérales telles *Lobularia maritima* et *Oryzopsis miliaceae*, résultant de l'anthropisation du site. Pour une surface identique, le nombre d'espèces recensées varie de 20 à 33. Des informations sur les contraintes naturelles (roche-mère calcaire et vent dominant) et anthropiques, notamment dues à l'ancienne activité industrielle pratiquée sur le site, ont été fournies par le degré de couverture végétale, ou pourcentage de la surface recouverte par la végétation, qui varie de 30 à 70% et peut aller jusqu'à 100% en fond de vallon. Concernant la composition floristique, les familles les plus représentées sont les Poacées avec 13 espèces et les Astéracées avec 9 espèces, mais des familles botaniques typiquement méditerranéennes (Cistacées, Liliacées, Fabacées et Apiacées) sont également bien représentées.

1.5.5. Cas de *Rosmarinus officinalis* L. : le romarin

Le romarin est un arbrisseau aromatique de la famille des Lamiacées possédant des feuilles persistantes sans pétiole, coriaces, étroites, enroulées sur les bords et blanches-cotonneuses sur la face abaxiale. Il est capable de fleurir toute l'année, et plusieurs fois dans une même année. Il pousse à l'état sauvage sur le pourtour méditerranéen jusqu'à 1500 m, en particulier dans les garigues arides et rocailleuses, sur terrains calcaires. Il possède une biomasse importante, et mesure entre 0,50 m et 1,50 m. Les fleurs bleu pâle maculées intérieurement de violet, à calice court en cloche et corolle longue avec deux étamines, sont en petites grappes denses axillaires en forme d'épis (Guittonneau and Huon, 1993). Les fruits sont des tétrakènes bruns. Le romarin dégage une odeur d'encens légèrement camphrée (Cala et al, 2005).

Le romarin est une espèce pérenne, native de la zone méditerranéenne, il est donc adapté aux sols de cette région, souvent calcaires avec un pH élevé, et au climat semi-aride. Cette espèce est présente sur tout le massif des Calanques et même sur le site de l'ancienne usine de l'Escalette (Testiati et al., 2013). Globalement, peu d'études sont disponibles sur la capacité de *R. officinalis* à extraire les métaux du sol dans un but de phytoremédiation. Ainsi, les études effectuées jusqu'à présent ont cherché à déterminer si l'utilisation du romarin cultivé sur des sols pollués par les métaux lourds risquait de poser un problème de santé publique. En effet, *R. officinalis* est une

plante médicinale dont l'huile essentielle est utilisée en cosmétique, parfumerie et pour les thérapies naturelles (Cala et al., 2005; El-Rjoob et al., 2008). On retrouve cette herbe condimentaire dans la cuisine méditerranéenne, sous la forme fraîche ou séchée. Outre son utilisation fréquente en parfumerie, cette plante mellifère est réputée pour son miel. On lui attribue par ailleurs de nombreuses vertus phytothérapeutiques : stimulant nerveux, cholérétique (facilite la digestion par la sécrétion de bile) et cholagogue (facilite la digestion par l'évacuation des graisses). Son utilisation dans le cadre d'un programme de réhabilitation d'un sol pollué pourrait donc avoir un avantage non négligeable, à savoir la valorisation après récolte des parties aériennes contaminées. Il ressort des quelques études disponibles sur le romarin que la distribution des métaux dans la plante n'est pas homogène et est fonction du métal concerné. Ainsi, Pb, Cu, Zn et Cd se retrouvent en plus grande quantité dans les fleurs (fleurs > feuilles > tiges), alors que Ni et Fe sont retrouvés majoritairement dans les feuilles (feuilles > fleurs > tiges). Au contraire, les résultats obtenus par (Testiati et al., 2013) sur le site de l'ancienne usine montrent que le romarin accumule significativement plus de Pb et As dans les tiges que dans les feuilles. El-Rjoob et al (2008) observe une corrélation positive entre la concentration en ETMM dans les parties aériennes et dans le sol pour Pb, Cu, Zn et Cd, alors que Testiati et al. (2013) n'observe pas de corrélation positive que pour Pb et As. Les résultats des études réalisées sur le romarin sont unanimes : le romarin n'est pas un hyperaccumulateur. En effet, les facteurs de bioaccumulation sont généralement très inférieurs à 1 (Moreno-Jimenez et al., 2012, 2011; Madejon et al., 2009; Testiati et al., 2013). Même en cas de contamination très importante des sols, les concentrations dans les parties aériennes ne dépassent pas 1 g/kg pour Cu, Pb ou As, et 10 g/kg pour Zn (Testiati et al., 2013) et ne dépassent pas les niveaux normalement trouvés dans les plantes. Ainsi, cette espèce transloque peu les ETMM vers ses parties aériennes, ce qui en fait une espèce peu adaptée à un processus de phytoextraction. Cependant, Madejon et al., (2009) a mis en évidence l'effet positif du romarin sur la rhizosphère, puisqu'en sa présence la biomasse microbienne et l'activité arylsulphatase augmentent dans le sol. L'arylsulphatase est une enzyme extracellulaire qui catalyse l'hydrolyse des esters sulfates organiques en SO_4^{2-} disponible pour les plantes. Cette espèce semble également capable de diminuer la fraction labile d'arsenic (extraction au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (Moreno-Jimenez et al., 2012). Les résultats de ces premières études indiquent que le romarin pourrait constituer une option intéressante pour la phytostabilisation des ETMM. En effet, en plus de ne pas accumuler les ETMM dans ses parties aériennes et de favoriser la vie microbienne du sol, la présence de romarin diminue significativement

l'écoulement, l'érosion et la compaction des sols. La protection des sols par le romarin est principalement lié à la couverture de ses parties aériennes et à sa dense litière qui influence l'infiltration de l'eau en interceptant une grande partie des gouttes de pluie et en diminuant leur énergie cinétique (Zuazo et al., 2004).

Cependant, peu de données sont disponibles concernant les mécanismes de tolérance mis en place par le romarin en présence d'ETMM. Les études présentées ci-dessus portent essentiellement sur les capacités d'accumulation des ETMM par cette espèce, et concernent, hormis Testiati et al. (2013), des sites dont les niveaux de contamination en ETMM n'atteignent pas ceux retrouvés dans les collines environnant les ruines de l'ancienne usine de l'Escalette qui font l'objet de ce travail de thèse. Les premières mesures effectuées sur les plantes du site, ont mis en évidence la capacité du romarin à tolérer de fortes concentrations en ETMM (figure 1.25), et même à en accumuler certains. Son caractère pérenne, ainsi que sa biomasse importante en font un candidat potentiel pour un projet de phytoremédiation (Testiati et al., 2013).

1.6. Bilan bibliographique et objectifs de l'étude

1.6.1. Bilan bibliographique

La contamination des sols par les ETMM est un problème très important, concernant de nombreux sites sur la planète, et en particulier ceux des sites métallurgiques. A travers le monde, et également en France (sites référencés BASOL), des zones très contaminées subsistent et nécessitent des suivis complémentaires et des traitements. La décontamination de ces sites représente un enjeu majeur du fait de la capacité de ces éléments à passer dans la chaîne alimentaire et de leur toxicité pour les plantes, les animaux et les hommes. Des traitements physico-chimiques existent, mais ont pour conséquence la destruction des propriétés biologiques des sols. De plus, elles sont souvent lourdes à mettre en œuvre et coûteuses, notamment sur des zones où la contamination est étendue. Ainsi, de nombreuses recherches se sont penchées sur la capacité de certaines plantes à tolérer, voire accumuler les ETMM, développant le concept de phytoremédiation, constitué de méthodes moins chères et plus respectueuses de l'environnement. La mise en œuvre de ces techniques nécessite de choisir convenablement les espèces utilisées en fonction du but visé (extraction, stabilisation, etc...). Pour cela, il est important d'avoir une

vision globale du comportement des ETMM dans le sol, du fonctionnement des plantes et des mécanismes impliqués dans leur tolérance.

Une synthèse bibliographique sur le comportement des ETMM dans le sol a été plus particulièrement complétée par un bilan sur la phytodisponibilité des ETMM, les paramètres principaux influant ainsi que les techniques d'analyses pour estimer cette phytodisponibilité. Ainsi, il apparaît intéressant de mettre en œuvre des extractions en batch avec des solutions salines neutres afin d'approcher la fraction la plus labile des ETMM dans les sols, et/ou avec des solutions complexantes pour une estimation de leur mobilité souvent assimilée à leur biodisponibilité. D'autre part, la synthèse concernant les mécanismes de transferts des ETMM vers et dans la plante, ainsi que ceux liés aux mécanismes de tolérance développés par les plantes, a mis en évidence le rôle et l'importance des symbioses racinaires, ainsi que ceux de phytométabolites au niveau des exsudats racinaires mais aussi au sein des plantes (phytochélatines, acides aminés, etc). L'étude bibliographique sur le transfert des ETMM vers les plantes et leur potentiel de phytoremédiation, a ainsi pu révéler l'importance du choix des espèces à étudier pour les études de transfert. Ainsi, les espèces indigènes présentant des capacités de tolérances car ayant colonisé naturellement les zones contaminées, sont à prendre en considération. De plus, des critères intéressants auxquels doivent répondre les plantes pour la phytoremédiation sont la capacité d'accumulation des ETMM et donc leur tolérance, et en particulier pour la phytostabilisation, un caractère de pérennité, une faible translocation et un réseau racinaire conséquent.

A Marseille, le site de l'Escalette abrite les ruines d'une usine de plomb dont l'activité a cessé depuis les années 1925. Cette activité passée a généré une forte contamination en ETMM, notamment en As, Pb, Sb et Zn, au niveau du site industriel abandonné mais aussi une dispersion dans le massif de Marseilleveyre. La localisation de cette zone dans le Parc National des Calanques et l'étendu de la contamination exclu des méthodes de décontamination physico-chimiques en dehors du site industriel lui-même. Une restauration écologique de la zone périphérique semble ainsi plus adaptée et fait l'objet d'une thèse qui a débuté en 2012. La phytoremédiation, réalisée à l'aide d'une espèce autochtone permettrait d'aller dans ce sens. Cependant, avant de mettre en place un tel processus, la compréhension des mécanismes de tolérance aux ETMM des espèces intéressantes est essentielle. Dans un contexte de conservation de la biodiversité, seule l'utilisation d'espèces autochtones serait envisageable dans le cadre d'un

processus de phytoremédiation. Le romarin est omniprésent dans le massif des calanques, et est capable de tolérer de fortes concentrations d'ETMM puisqu'elle est retrouvée sur le site très contaminé de l'ancienne usine. Dans les critères de choix, le romarin a aussi été sélectionné car cette espèce est largement récoltée sur le site des Calanques et qu'il est nécessaire au préalable de déterminer le risque de transfert de la contamination vers l'homme via l'ingestion.

1.6.2. Objectifs des travaux de thèse

Ainsi, ce travail de thèse a pour but d'étudier les mécanismes de tolérances aux ETMM du romarin en vue de son éventuelle utilisation pour la phytostabilisation en méditerranée, et particulièrement, dans les Calanques.

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre du projet de recherche Marséco , financé par l'ANR (Agence Nationale de la Recherche) française (2008-2013). Ce projet Marséco se place dans le contexte de l'exceptionnelle richesse floristique du littoral méditerranéen, où les problèmes d'urbanisation et de pollution pèsent lourdement sur l'environnement. En effet, le littoral méditerranéen, «hotspot» de biodiversité, est également un «hotspot» de croissance démographique humaine et constitue ainsi un des exemples phares pour le suivi du devenir des espaces sensibles. Dans l'état actuel des choses, le littoral méditerranéen est bien ancré dans une situation paradoxale : les formations végétales littorales péri-urbaines, remarquables et originales, présentent un taux élevé d'endémisme et/ou de rareté, et pourtant les habitats et les espèces qui leurs sont inféodés sont soumis à des perturbations environnementales et anthropiques croissantes (Marséco, 2012). Face à la complexité de cette situation (sites post-industriels dans une zone de forte biodiversité, zone habitée et affluence touristique saisonnière), le projet Marséco s'est proposé d'étudier dans sa globalité la pollution des divers compartiments (sol, eau et biocénose), les flux des contaminants (éléments traces métalliques et polluants organiques) et la compréhension des relations entre organismes de la biocénose (notamment l'écologie microbienne et la phytocénose) dans une vision intégrative. Les résultats de ces travaux devront déboucher sur la compréhension du fonctionnement de ces écosystèmes et ouvrir vers des voies de conservation des espèces rares et de réhabilitation du site et de sites similaires multipollués. Malgré le grand nombre d'études concernant la dynamique et l'écotoxicité des polluants inorganiques, nous sommes loin d'une compréhension complète des phénomènes de contamination, de transfert et de tolérance des plantes.

Dans ce contexte, les questions qui se posent sont :

Quel est l'état de la multi-contamination diffuse en ETMM dans le massif des Calanques, issue de l'ancienne usine ?

Quels sont les risques de transfert aux plantes de ces ETMM au niveau de ces contaminations diffuses ?

Quelles sont les capacités d'accumulation du romarin aux ETMM ?

Quelles sont les mécanismes de tolérance mis en place par le romarin face à une contamination en ETMM ?

Quel pourrait être son potentiel de phytoremédiation, et en particulier de phytostabilisation, dans un tel contexte de multipollution en milieu méditerranéen ?

Objectifs spécifiques :

L'évaluation de la contamination diffuse dans le massif des Calanques nécessite des études *in situ*. Pour ce faire, un transect expérimental le long d'un gradient de pollution à été défini dans la zone environnant l'ancienne usine, ceci en s'éloignant de l'usine. Huit sites ont ainsi été sélectionnés dans ce transect afin de déterminer les niveaux de pollution dans les sols ainsi que les capacités d'accumulation du romarin dans ces différents organes (feuilles, tiges et racines) en fonction du niveau de contamination. Les parties aériennes des romarins pouvant être consommées, les teneurs en ETMM dans les feuilles et dans des infusions des romarins du transect ont été comparés aux normes existantes, afin d'estimer un risque pour la santé humaine. Concernant la compréhension des mécanismes de tolérance mis en place par le romarin, plusieurs phytométabolites habituellement impliqués dans la tolérance aux ETMM chez les plantes ont été mesurés dans les différentes parties des romarins du transect (acides aminés et peptides, notamment histidine, cystéine et glutathion, et les thiols). D'autres biomarqueurs de stress de la plante ont été étudiés notamment les chlorophylles, les anthocyanes, les phénols et les flavonols ainsi que la composition chimique des huiles essentielles de romarin. Enfin, les symbioses racinaires étant connues pour jouer un rôle très important dans la tolérance des plantes aux ETMM, la présence de symbioses fongiques de type endophytes septés foncés ou ceux formant à des endomycorhizes à arbuscules a été recherchée au niveau des racines des romarins du transect.

D'autre part, afin d'approfondir les résultats obtenus *in situ*, et pour s'affranchir des différences liées au sol et au climat, des études en conditions contrôlées, *ex situ*, ont été mises en place. Pour cela, des boutures de romarin ont été placées dans des rhizotrons, puis mises en cultures dans les mêmes conditions pendant 5 mois dans des phytotrons, sur des sols présentant des niveaux de contaminations différents en ETMM. L'utilisation de rhizotrons a permis la collecte des exsudats racinaires, impliqués dans le transfert des nutriments et des ETMM vers la plante, ainsi que la mesure de la biomasse microbienne du sol permettant d'estimer l'influence des bactéries du sol sur la tolérance du romarin aux ETMM. Enfin, la présence de certains phytométabolites ainsi que celles de symbioses racinaires, ont été recherchées dans les romarins des rhizotrons afin d'affiner l'approche des mécanismes de tolérance de cette plante.

Les études réalisées *in situ* peuvent être divisées en plusieurs volets :

- la détermination des niveaux de contamination en ETMM dans les sols du transect et leur potentiel de mobilité,
- la détermination de la capacité d'accumulation des romarins dans les différentes parties de cette plante (racines, tiges, feuilles) le long du transect,
- la détermination des risques pour la santé liés à la consommation de romarin issus des sites du transect,
- l'approche des mécanismes de tolérance par le dosage de phytométabolites indicateurs de stress dans les romarins récoltés *in situ*,
- la détermination de l'implication des symbioses racinaires dans la tolérance du romarin et leur potentiel pour un processus de phytostabilisation

Les études réalisées *ex situ* peuvent être divisées selon :

- les capacités de transfert et d'accumulation des ETMM dans les différentes parties du romarin en conditions contrôlées,
- l'implication potentielle des symbioses racinaires et des phytométabolites dans la tolérance du romarin aux ETMM,
- l'effet de la présence des ETMM sur les exsudats racinaires et l'activité microbienne des sols.

Références bibliographiques

Abedin MJ, Feldmann J, Meharg AA. Uptake kinetics of arsenic species in rice plants. *Plant Physiology* 2002;128:1120–8.

Airmaraix. Campagne de mesures temporaire. Particules et métaux lourds sur le site de l'Escalette (Marseille). 2003.

Alkorta I, Hernández-Allica J, Becerril J, Amezaga I, Albizu I, Garbisu C. Recent Findings on the Phytoremediation of Soils Contaminated with Environmentally Toxic Heavy Metals and Metalloids Such as Zinc, Cadmium, Lead, and Arsenic. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 2004;3:71–90.

Alvarez JM, Lopez-Valdivia LM, Novillo J, Obrador A, Rico MI. Comparison of EDTA and sequential extraction tests for phytoavailability prediction of manganese and zinc in agricultural alkaline soils. *Geoderma* 2006;132:450–63.

ANTEA. Diagnostic environnemental de la friche industrielle de l'Escalette. Evaluation simplifiée des risques sur les parcelles appartenant au Conseil Général 13. Société d'ingénierie; 2001.

Atteia O. Chimie et pollutions des eaux souterraines. Tec & Doc Lavoisier; 2005.

Audet P, Charest C. Dynamics of arbuscular mycorrhizal symbiosis in heavy metal phytoremediation: Meta-analytical and conceptual perspectives. *Environmental Pollution* 2007;147:609–14.

Baars A, Theelen R, Janssen P, Hesse J, Vab Apeldoorn M, Meijering M, Verdam L, Zeilmaker M. Re-evaluation of Human-toxicological Maximum Permissible Risk Levels. Rapport RIVM (Rijksinstituut voor volksgezondheid en milieu); 2001.

Badri DV, Vivanco JM. Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment* 2009;32:666–81.

Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. In: *Annual Review of Plant Biology*, vol. 57. 2006. p. 233–66.

Baize D. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). Références et stratégies d'interprétation. Programme ASPITET. INRA édition. Paris; 1997.

Baize D, Saby N, Deslais W. Teneur en huit éléments en traces (Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Zn) dans les sols agricoles en France. ADEME - INRA - GIS sol; 2008.

Baize D, Saby N, Walter C. Le cuivre extrait à l'EDTA dans les sols de France-Probabilité de carences et de toxicités selon la BDAT. *Etude et gestion des sols* 2006;13:259–68.

Baker A. Accumulators and excluders - strategies in the response of plants to heavy-metals. *Journal of Plant Nutrition* 1981;3:643–54.

Baker AJM, Brooks RR. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1989;1:81–126.

Baker AJM, McGrath SP, Sidoli CMD, Reeves RD. The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. *Resources, Conservation and Recycling* 1994;11:41–9.

de-Bashan LE, Hernandez J-P, Bashan Y. The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation - A comprehensive evaluation. *Applied Soil Ecology* 2012;61:171–89.

BASOL 2012. disponible à: <http://www.basol.environnement.gouv.fr>.

Berry W, Wallace A. Toxicity - the concept and relationship to the dose-response curve. *Journal of Plant Nutrition* 1981;3:13–9.

Blum WE., Horak O, Mentler A, Puschenreiter M. Trace elements. In: *Environmental and ecological chemistry, vol. II of III. encyclopedia of life support systems*. Aleksandar Sabljic; 2009. p. 156–65.

Bournérias M, Aymonin GG. *Les Orchidées de France, Belgique et Luxembourg*. Collection Parthénope. Editions Biotope; 1998.

Briat J-F, Lebrun M. Plant responses to metal toxicity. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 1999;322:43–54.

Bril H, Bollinger J-C. Comprendre les pollutions par les métaux. *L'actualité chimique* 2006;298:54–62.

Buchanan B, Gruissem W, Jones R. *Biochemistry & molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologist: Monona drive, Rockville, USA; 2002.

Buffle J, Chalmers RA, Masson MR, Midgley D. *Complexation reactions in aquatic systems: an analytical approach*. E. Horwood; 1988.

Cala V, Cases MA, Walter I. Biomass production and heavy metal content of *Rosmarinus officinalis* grown on organic waste-amended soil. *Journal of Arid Environments* 2005;62:401–12.

Campbell N, Reece J. *Transport in vascular plants*. Pearson education Inc publishing as Benjamin Cummings; 2005.

Chen X, Wu CH, Tang JJ, Hu SJ. Arbuscular mycorrhizae enhance metal lead uptake and growth of host plants under a sand culture experiment. *Chemosphere* 2005;60:665–71.

Chojnacka K, Chojnacki A, Górecka H, Górecki H. Bioavailability of heavy metals from polluted soils to plants. *Science of The Total Environment* 2005;337:175–82.

Clemens S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 2001;212:475–86.

Clemens S, Palmgren MG, Kramer U. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* 2002;7:309–15.

Clijsters H, Assche FV. Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynth Res* 1985;7:31–40.

Conseil Général des Bouches du Rhône. Evaluation simplifiée des risques. Site de Saména (Marseille). Rapport ANTEA n°24999/B; November 2001.

Coste H. Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse, et des contrées limitrophes. 1937.

Cunningham S, Berti W, Huang J. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in Biotechnology* 1995;13:393–7.

Dakora FD, Phillips DA. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil* 2002;245:35–47.

Daumalin X, Raveux O. Le raffinage du sucre, l'huilerie et la métallurgie : les trois branches emblématiques de la Révolution industrielle à Marseille. *MIP* 2005;15:5–7.

Denton B. Advances in phytoremediation of heavy metals using plant growth promoting bacteria and fungi. *Microbiology and molecular genetics* 2007;3:1–5.

ELAW (Environmental law alliance worldwide). Généralités sur l'exploitation minière et ses impacts. In: Guide pour l'évaluation des projets EIE du domaine minier. 2012.

El-Rjoob A-WO, Massadeh AM, Omari MN. Evaluation of Pb, Cu, Zn, Cd, Ni and Fe levels in *Rosmarinus officinalis labiatae* (Rosemary) medicinal plant and soils in selected zones in Jordan. *Environmental Monitoring and Assessment* 2008;140:61–8.

Evangelou MWH, Ebel M, Schaeffer A. Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. *Chemosphere* 2007a;68:989–1003.

Fageria N., Baligar C, Clark R. Micronutrients in crop production. In: *Advances in Agronomy*, vol. Volume 77. Academic Press; 2002. p. 185–268.

Fitz WJ, Wenzel WW. Arsenic transformations in the soil–rhizosphere–plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. *Journal of Biotechnology* 2002;99:259–78.

Fobi N. Lead smelting - International review. In: Morehouse School of Medicine, Atlanta, GA; 2007.

Fournier P. Les quatres flores de France. Editions Lechevalier. 1961.

Freedman B, Hutchinson T. Source of metal and elemental contaminants of terrestrial environments. In: Effect of heavy metal pollution on plants: metals in the environment, vol. II. Pollution monitoring Series. Applied science publisher: London and Nex Jersey; 1981. p. 35–94.

Gamalero E, Lingua G, Berta G, Glick BR. Beneficial role of plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to heavy metal stress. *Canadian Journal of Microbiology* 2009;55:501–14.

Garbisu C, Alkorta I. Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology* 2001;77:229–36.

Ghosh M, Singh S. A review on phytoremediation of heavy metal and utilization of its byproducts. *Applied ecology and environmental research* 2005;3:1–18.

Gobran GR, Huang PM. *Biogeochemistry of Trace Elements in the Rhizosphere*. Elsevier; 2005.

Gohre V, Paszkowski U. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 2006;223:1115–22.

Gommy C, Perdrix E, Galloo J-C, Guillermo R. Metal Speciation in Soil: Extraction of Exchangeable Cations from a Calcareous Soil with a Magnesium Nitrate Solution. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 1998;72:27–45.

Gonzalez-Chavez MC, Carrillo-Gonzalez R, Wright SF, Nichols KA. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution* 2004;130:317–23.

Gray EJ, Smith DL. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology & Biochemistry* 2005;37:395–412.

Greger M. Metal availability, uptake, transport and accumulation in plants. In: *Heavy metal stress in Plants. From biomolecules to ecosystems*. 2nde ed. MNV Prasad: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2004. p. 1–27.

Grennan AK. Metallothioneins, a Diverse Protein Family. *Plant Physiology* 2011;155:1750–1.

Grill E, Löffler S, Winnacker E, Zenk M. Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989;86:6838–42.

Grill E, Winnacker E, Zenk M. Phytochelatins - the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 1985;230:674–6.

Grill E, Winnacker E, Zenk M. Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987;84:439–43.

Guittonneau G-G, Huon A. *Connaitre et reconnaitre la flore et la végétation méditerranéenne*. Ouest-France: Paris; 1993.

Gupta AK, Sinha S. Assessment of single extraction methods for the prediction of bioavailability of metals to *Brassica juncea* L. Czern. (var. Vaibhav) grown on tannery waste contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 2007;149:144–50.

Hall JL. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 2002;53:1–11.

Hammel W, Debus R, Steubing L. Mobility of antimony in soil and its availability to plants. *Chemosphere* 2000;41:1791–8.

Harris J, McCartor A. The world's worst toxic pollution problems. The top ten of the toxic twenty. Blacksmith Institute's; 2011.

Harrison MJ. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 1999;50:361–89.

Harrison MJ, Dewbre GR, Liu JY. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* 2002;14:2413–29.

He ZL, Yang XE, Stoffella PJ. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2005;19:125–40.

Hirata K, Tsuji N, Miyamoto K. Biosynthetic regulation of phytochelatins, heavy metal-binding peptides. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2005;100:593–9.

Huang PM. Soil Mineral–Organic Matter--Microorganism Interactions: Fundamentals and Impacts. In: *Advances in Agronomy*, vol. Volume 82. Academic Press; 2004. p. 391–472.

Huang PM, Germida JJ. Chemical and biological processes in the rhizosphere: metal pollutants. *IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems*. Volume 8 2001:381–438. CABDirect2. CABDirect2.

INERIS. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Plomb et ses dérivés. 2003.

INERIS. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Cuivre et ses dérivés. 2005a.

INERIS. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Zinc et ses dérivés. 2005b.

INERIS. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Antimoine et ses dérivés. 2007.

INERIS. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Arsenic et ses dérivés. 2010.

IUP environnement, CERA. Réhabilitation de la zone de l'Escalette. Etude des risques. 2005.

Jadia CD, Fulekar MH. phytoremediation of heavy metals recent techniques. African journal of biotechnology 2009;8:921–8.

Jauzein P. Flore des champs cultivés. Editions INRA. 1995.

Jemal F, Ghorbal M. Phytoremédiation. revue H.T.E. 2002;122:49–60.

Juste C. Appréciation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments en traces du sol. Science du sol 1988;26:103–12.

Kabata-Pendias A. Trace Elements in Soils and Plants, Third Edition. CRC Press; November 8, 2000.

Kabata-Pendias A. Soil–plant transfer of trace elements—an environmental issue. Geoderma 2004;122:143–9.

Kabata-Pendias A. Trace elements in soils and plants. fourth. Taylor and Francis group; 2011.

Kastori R, Petrovic M, Petrovic N. Effect of excess lead, cadmium, copper, and zinc on water relations in sunflower. Journal of Plant Nutrition 1992;15:2427–39.

Kawashima CG, Noji M, Nakamura M, Ogra Y, Suzuki KT, Saito K. Heavy metal tolerance of transgenic tobacco plants over-expressing cysteine synthase. Biotechnol. Lett. 2004;26:153–7.

Kim S, Lim H, Lee I. Enhanced heavy metal phytoextraction by *Echinochloa crus-galli* using root exudates. Journal of Bioscience and Bioengineering 2010;109:47–50.

Kozdroj J, van Elsas JD. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. Soil Biol. Biochem. 2000;32:1405–17.

Lasalle J. Synthèse de l'évaluation des risques sanitaires relative à la contamination environnementale du littoral sud de Marseille (Montredon - Callelongue). InVs-DRASS; 2005.

Lasalle J. Présence de plomb et d'arsenic sur le littoral sud de Marseille une étude de santé. INVS Santé Environnement. 2007.

Lebeau T, Braud A, Jezequel K. Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: A review. Environmental Pollution 2008;153:497–522.

Lestan D, Luo C, Li X. The use of chelating agents in the remediation of metal-contaminated soils: A review. Environmental Pollution 2008;153:3–13.

Liao MT, Hedley MJ, Woolley DJ, Brooks RR, Nichols MA. Copper uptake and translocation in chicory (*Cichorium intybus* L. cv. *Grasslands Puna*) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. *Rondy*) plants grown in NFT system. I. Copper uptake and distribution in plants. Plant and Soil 2000;221:135–42.

Lindsay W. inorganic phase equilibrium of micronutrients to plant roots. Advandage Agronomy 1972;20:91–151.

- Ma Y, Prasad MNV, Rajkumar M, Freitas H. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances* 2011;29:248–58.
- Madejon P, Burgos P, Cabrera F, Madejon E. Phytostabilization of Amended Soils Polluted with Trace Elements Using the Mediterranean Shrub: *Rosmarinus officinalis*. *International Journal of Phytoremediation* 2009;11:542–57.
- MAEVA. Identification des transferts des éléments traces métalliques de la friche industrielle de l'Escalette vers les différents compartiments environnementaux. Université Paul Cézanne; 2007.
- MAEVA. Impact de la pollution de la friche industrielle de l'Escalette sur le compartiment vivant. Université de Provence, Université Paul Cézanne; 2008.
- Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press: London; 1995.
- Marschner H. Soil-Root Interface: Biological and Biochemical Processes. *Soil Chemistry and Ecosystem Health* 1998;special issue:191–231.
- Marséco. Biodiversité et pollution en zone littorale marseillaise : comprendre les risques pour les écosystèmes et l'homme. Les cahiers de l'ANR-Contaminants et environnements: constater, diffuser, décider. 2012,6:94.
- Masscheleyn PH, Patrick WHJ. Selenium, arsenic and chromium redox chemistry in wetland soils and sediments. *Environmental Geochemistry and Health* 1994;special issue:615–25.
- McGrath SP, Zhao F-J. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology* 2003;14:277–82.
- McGrath SP, Zhao FJ, Lombi E. Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. In: Sparks DL, editor. *Advances in Agronomy*, Vol 75, vol. 75. 2002. p. 1–56.
- Meers E, Du Laing G, Unamuno V, Ruttens A, Vangronsveld J, Tack FMG, Verloo MG. Comparison of cadmium extractability from soils by commonly used single extraction protocols. *Geoderma* 2007;141:247–59.
- Memon AR, Schroder P. Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2009;16:162–75.
- Mench M, Martin E. Mobilization of cadmium and other metals from two soils by root exudates. *Plant and Soil* 1991;132:187–96.
- Mendez MO, Maier RM. Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments - An emerging remediation technology. *Environmental Health Perspectives* 2008;116:278–83.
- Menon MM. Influence of soil pollution by heavy metals on the water relations of young forest ecosystems. Swiss federal institute of technology; 2006.
- Menzies NW, Donn MJ, Kopittke PM. Evaluation of extractants for estimation of the phytoavailable trace metals in soils. *Environmental Pollution* 2007;145:121–30.

Mesjasz-Przybyłowicz J, Barnabas A, Przybyłowicz W. Comparison of cytology and distribution of nickel in roots of Ni-hyperaccumulating and non-hyperaccumulating genotypes of *Senecio coronatus*. *Plant and Soil* 2007;293:61–78.

Michalak A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies* 2006;15:523–30.

Morel JL. Assessment of phytoavailability of trace elements in soils. *Analisis* 1997;25:M70–M72.

Moreno-Jimenez E, Esteban E, Carpena-Ruiz RO, Carmen Lobo M, Penalosa JM. Phytostabilisation with Mediterranean shrubs and liming improved soil quality in a pot experiment with a pyrite mine soil. *Journal of Hazardous Materials* 2012;201:52–9.

Moreno-Jimenez E, Penalosa JM, Carpena-Ruiz RO, Esteban E. Comparison of arsenic resistance in Mediterranean woody shrubs used in restoration activities. *Chemosphere* 2008;71:466–73.

Moreno-Jimenez E, Vazquez S, Carpena-Ruiz RO, Esteban E, Penalosa JM. Using Mediterranean shrubs for the phytoremediation of a soil impacted by pyritic wastes in Southern Spain: A field experiment. *Journal of Environmental Management* 2011;92:1584–90.

Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* 2010;8:199–216.

Nakayama SMM, Ikenaka Y, Hamada K, Muzandu K, Choongo K, Teraoka H, Mizuno N, Ishizuka M. Metal and metalloid contamination in roadside soil and wild rats around a Pb–Zn mine in Kabwe, Zambia. *Environmental Pollution* 2011;159:175–81.

Ondo JA. Vulnérabilité des sols maraîchers du Gabon (région de Libreville) : acidification et mobilité des éléments métalliques. Aix-Marseille Université: Marseille; 2011.

Padmavathiamma PK, Li LY. Phytoremediation technology: Hyper-accumulation metals in plants. *Water Air and Soil Pollution* 2007;184:105–26.

Page V, Feller U. Selective transport of zinc, manganese, nickel, cobalt and cadmium in the root system and transfer to the leaves in young wheat plants. *Ann. Bot.* 2005;96:425–34.

Pal M, Horvath E, Janda T, Paldi E, Szalai G. Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* 2006;169:239–46.

Palero-Fernandez FJ, Martin-Izard A. Trace element contents in galena and sphalerite from ore deposits of the Alcudia Valley mineral field (Eastern Sierra Morena, Spain). *Journal of Geochemical Exploration* 2005;86:1–25.

Palese R, Aeschmann D. La Grande flore en couleurs de Gaston Bonnier: France, Suisse, Belgique et pays voisins. vol. Tomes I à IV. Editions Belin; 1990.

Peijnenburg WJGM, Zablotskaja M, Vijver MG. Monitoring metals in terrestrial environments within a bioavailability framework and a focus on soil extraction. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2007;67:163–79.

Peralta-Videa JR, Lopez ML, Narayan M, Saupe G, Gardea-Torresdey J. The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009;41:1665–77.

Pialot H. Ligneux des collines de la provence calcaire. Edition CRDP. Marseille; 1988.

Pilon-Smits E. Phytoremediation. In: *Annual Review of Plant Biology*, vol. 56. 2005. p. 15–39.

Prasad MNV. *Heavy Metal Stress in Plants: From Biomolecules to Ecosystems*. Springer; June 14, 2004.

Prasad MNV, Freitas HMD. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology* 2003;6:285–321.

Pueyo M, López-Sánchez J., Rauret G. Assessment of CaCl_2 , NaNO_3 and NH_4NO_3 extraction procedures for the study of Cd, Cu, Pb and Zn extractability in contaminated soils. *Analytica Chimica Acta* 2004;504:217–26.

Quartacci MF, Irtelli B, Gonnelli C, Gabbrielli R, Navari-Izzo F. Naturally-assisted metal phytoextraction by *Brassica carinata*: Role of root exudates. *Environmental Pollution* 2009;157:2697–703.

Quevauviller P. Operationally defined extraction procedures for soil and sediment analysis I. Standardization. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 1998;17:289–98.

Quevauviller P, Lachica M, Barahona E, Rauret G, Ure A, Gomez A, Muntau H. Interlaboratory comparison of EDTA and DTPA procedures prior to certification of extractable trace elements in calcareous soil. *Science of The Total Environment* 1996;178:127–32.

Quevauviller P, Rauret G, LopezSanchez JF, Rubio R, Ure A, Muntau H. Certification of trace metal extractable contents in a sediment reference material (CRM 601) following a three-step sequential extraction procedure. *Science of the Total Environment* 1997;205:223–34.

Rabier J, Laffont-Schwob I, Notonier R, Fogliani B, Bouraïma-Madjèbi S. Anatomical element localization by EDXS in *Grevillea exul* var. *exul* under nickel stress. *Environ. Pollut.* 2008;156:1156–63.

Rajkumar M, Sandhya S, Prasad MNV, Freitas H. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances* 2012;30:1562–74.

Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. *Biologie végétale*. Sixth edition. Worth Publishers: New-York; 1999.

Raveux O. L'usine à plomb de l'Escalette : le dernier grand vestige de la métallurgie marseillaise du plomb. *Dynamiques d'hier et d'aujourd'hui* 2002;10:7–9.

Reichman SM. The Responses of Plants to Metal Toxicity. A Review Focusing on Copper, Manganese and Zinc. The Australian minerals & energy environment foundation: Melbourne, Australia; 2002.

Riesen O, Feller U. Redistribution of Nickel, Cobalt, Manganese, Zinc, and Cadmium via the Phloem in Young and Maturing Wheat. *Journal of Plant Nutrition* 2005;28:421–30.

Robert M, Berthelin J. Role of biological and biochemical factors in soil weathering. In: Huang P, Schnitzer M, editors. Interactions of soil minerals with natural organics and microbes. Soil Science Society of America; 1986. p. 453–95.

Rovira A. Plant root exudates. *Botanical Review* 1969;35:35–&.

Rovira A, Foster R, Martin J. Note on terminology : origin, nature and nomenclature of the organic materials in the rhizosphere. In: The soil-root interface. Eds L. Harley et R.S. Russell. Academic Press: New York; 1979. p. 1–4.

Sauvé S, Hendershot W, Allen HE. Solid-Solution Partitioning of Metals in Contaminated Soils: Dependence on pH, Total Metal Burden, and Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.* 2000;34:1125–31.

Senesi N, Loffredo E. Metal ion complexation by soil humic substances. In: Chemical processes in soils. Soil Science Society of America; 2005. p. 563–617.

Sharma SS, Schat H, Vooijs R. In vitro alleviation of heavy metal-induced enzyme inhibition by proline. *Phytochemistry* 1998;49:1531–5.

Simmons DBD, Hayward AR, Hutchinson TC, Emery RJN. Identification and quantification of glutathione and phytochelatins from *Chlorella vulgaris* by RP-HPLC ESI-MS/MS and oxygen-free extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2009;395:809–17.

Singh Gill S, Tuteja N. Cadmium stress tolerance in crop plants. *Plant signaling & behavior* 2011;6:215–22.

Singh VP. Metal Toxicity And Tolerance In Plant & Animal. Sarup & Sons; January 1, 2005.

Sparks DL. Environmental Soil Chemistry. Academic Press; 2003.

Sposito BGSP of ES and EEU of. The Surface Chemistry of Natural Particles. Oxford University Press; February 26, 2004.

Stumm W, Morgan JJ. Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters. Wiley; 1996.

Tahirukaj A, Young I, McWeeney G. A health promoting school approach used to the risks of lead poisoning and to establish cross-ethnic collaboration. *Promotion & Education* 2005;12:138–40.

Tamas L, Dudikova J, Durcekova K, Halugkova L, Huttova J, Mistrik I, Olle M. Alterations of the gene expression, lipid peroxidation, proline and thiol content along the barley root exposed to cadmium. *Journal of Plant Physiology* 2008;165:1193–203.

Testiati E. Contamination des sols par des éléments traces métalliques en zone méditerranéenne côtière : étude de leur mobilité et du transfert à la phytocénose. Aix-Marseille Université; 2012.

Testiati E, Parinet J, Massiani C, Laffont-Schwob I, Rabier J, Pfeifer H-R, Lenoble V, Masotti V, Prudent P. Trace metal and metalloid contamination levels in soils and in two native plant species of a former industrial site: Evaluation of the phytostabilization potential. *Journal of Hazardous Materials* 2013;248–249:131–41.

Vadas TM, Ahner BA. Cysteine- and glutathione-mediated uptake of lead and cadmium into *Zea mays* and *Brassica napus* roots. *Environ. Pollut.* 2009;157:2558–63.

Verkleij JAC, Golan-Goldhirsh A, Antosiewicz DM, Schwitzguebel J-P, Schroeder P. Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper plant parts. *Environmental and Experimental Botany* 2009;67:10–22.

Violante A, Cozzolino V, Perelomov L, Caporale A, Pigna M. Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments. *J. Soil. Sci. Plant Nutr* 2010;10:268–92.

Wenzel WW. Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant and Soil* 2009;321:385–408.

WHO (World Health Organization). Guidelines for drinking-water quality. First addendum to third edition. Geneva; 2006.

Willey N. Phytoremediation - Methods and Reviews. Humana Press. *Methods biotechnology* 23. 2007.

Wolkersdorfer C, Howell R, Walder IF, Nilssen S, Raisanen M, Heikkinen P, et al. Contemporary Reviews of Mine Water Studies in Europe, Part 2 (vol 24, pg 2, 2005). *Mine Water and the Environment* 2012;31:237–8.

Wright SF, Upadhyaya A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 1998;198:97–107.

Wuana RA, Okieimen FE. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *IRSN Ecology* 2011;2011:1–20.

Yang Y-G, Liu C-Q, Pan W, Zhang G-P, Zhu W-H. Heavy metal accumulation from zinc smelters in a carbonate rock region in Hezhang County, Guizhou Province, China. *Water Air and Soil Pollution* 2006;174:321–39.

Yang Z, Lu W, Long Y, Bao X, Yang Q. Assessment of heavy metals contamination in urban topsoil from Changchun City, China. *Journal of Geochemical Exploration* 2011;108:27–38.

Yateem WH, Nassehi V, Khan AR. Fluid Catalytic Cracking Unit Emissions and Their Impact. *Water Air Soil Pollut.* 2011;218:37–47.

Yoon J, Cao X, Zhou Q, Ma LQ. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of the Total Environment* 2006;368:456–64.

Zhao Y, Chengcai C. Toward understanding plant response to heavy metal stress. In: *Abiotic stress in plants - Mechanisms and adaptations*. Arun Shanker and B. Venkateswarlu; 2011. p. 428.

Zuazo VHD, Martínez JRF, Raya AM. Impact of Vegetative Cover on Runoff and Soil Erosion at Hillslope Scale in Lanjaron, Spain. *The Environmentalist* 2004;24:39–48.

Chapitre 2 :

Matériels et méthodes

"La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique : rien ne fonctionne et personne ne sait pourquoi..."

Albert Einstein

Afin d'approcher les niveaux de diffusion de cette pollution et le transfert des contaminants inorganiques au romarin, différents échantillons de sols et de romarins ont été nécessaires pour ce travail de thèse. Pour cela, des sites de prélèvements ont été sélectionnés selon un transect ayant comme point d'origine l'ancienne usine de l'Escalette. Dans cette partie, présentant les matériels et méthodes, une présentation de la zone d'étude est effectuée et suivie de la description des sites de prélèvements et méthodes d'échantillonnages sur le terrain. Puis les méthodologies d'études *in situ* et en conditions contrôlées sont développées, et complétées par le détail des techniques analytiques utilisées.

2.1. Méthodologie et échantillonnage

2.1.1. Site d'étude

2.1.1.1. Géographie

Les études réalisées pour ce travail de thèse ont été menées à Marseille, dans le sud de la France. Elle abrite, sur une superficie de 240,62 km² dans ses limites administratives, une population de 852.395 habitants.

A la périphérie est de la ville commence le massif des Calanques qui s'étend sur plus de vingt miles de côtes sur la mer Méditerranée (figure 2.1), Il est orienté ouest-est, et est limité au nord par le bassin de Marseille, au sud par le domaine marin et à l'est par le massif de Canaille-Soubeyran (Blanc, 2012). Ainsi, le massif des calanques est un massif côtier, constitué de vallons enchevêtrés. Le relief calcaire présente de fortes dénivellations entre la mer et les sommets calcaires variant de 300 à 600 m. Ce massif constitue un patrimoine naturel exceptionnel, ce qui lui a permis de bénéficier de la protection d'un parc national depuis le 18 avril 2012. Il s'agit du premier parc national à la fois terrestre, marin et sub-urbain en Europe.

Le site de l'Escalette, qui est au cœur de la pollution étudiée dans le cadre de cette thèse, est situé dans les Calanques de Marseille. Ce site est répertorié dans BASOL (2012), une base de données référençant les sites et sols pollués en France. Les sites répertoriés sont des sites industriels anciens ou encore en activité, qui sont en cours de remédiation ou qui n'ont jusqu'à présent fait l'objet d'aucun traitement. Les crassiers, qui représentent un volume d'environ 10 000 m³, sont constitués de scories issues de la fonderie de plomb. Ils sont encore présents sur le site de l'ancienne usine, et des scories ont servis de remblais tout le long de la route allant de la Madrague à Callelongue, puisqu'elles ont été utilisées dans les remblais. Deux vallons, l'Escalette et la Garenne, ont leurs talwegs qui se rejoignent à l'est de l'ancienne usine. Ainsi, la zone est fortement encaissée et escarpée.

2.1.1.2. Climatologie

Marseille est située sous un climat méditerranéen, avec des hivers doux et humides et des étés chauds à très chauds et secs la plupart du temps. La station météorologique de Météo-France la plus proche du site de l'Escalette se situe à l'hippodrome de Borély à Marseille. L'ancienne usine est localisée à 4 km au Sud-Sud-Est de cette station météorologique. Toutefois, si la topographie des deux lieux est différente, les deux sites sont proches du littoral, ainsi les informations collectées fournissent une tendance qualitative sur les paramètres météorologiques applicables à l'Escalette. Décembre, Janvier et Février sont les mois les plus froids, avec une moyenne des températures d'environ 12°C pendant la journée et 4°C la nuit. En moyenne, on compte quinze jours de gelée par an. Juillet et Août sont les mois les plus chauds, avec une moyenne des températures de 29°C pendant la journée et 19°C la nuit (tableau 2.1). Des exemples de données pour l'année 2007-2008 sont présentés sur la figure 2.2

Tableau 2.1 : Données climatiques de Marseille (entre 1971 et 2000, WMO 2012)

	Mois												Année
	Jan	Fev	Mar	Avr	Mai	Juin	Juil	Aout	Sept	Oct	Nov	Dec	
Moy. Haute (°C)	11.2	12.6	15.3	17.7	22.2	26.1	29.5	29.2	25.3	20.3	14.7	12.0	19.7
Moy. Journalier (°C)	7.1	8.3	10.7	13.1	17.4	21.2	29.9	29.9	20.4	15.9	10.8	8.0	15.1
Moy. basse (°C)	3.0	3.9	6.0	8.5	12.6	16.0	18.7	18.7	15.5	11.6	6.8	4.1	10.5
Précipitations (mm)	53.6	43.5	40.4	57.9	41.2	25.4	12.6	12.6	60.6	85.4	50.6	52.0	554.6
Moy. journalière précipitations (mm)	6.1	5.1	4.8	6.3	4.9	3.5	1.4	1.4	3.1	6.3	5.2	5.6	56.4
Heures de soleil	150	155.5	215.1	244.8	292.5	326.2	366.4	327.4	254.3	204.5	155.5	143.3	2.835

Source: (World Meteorological Organization, 2012)

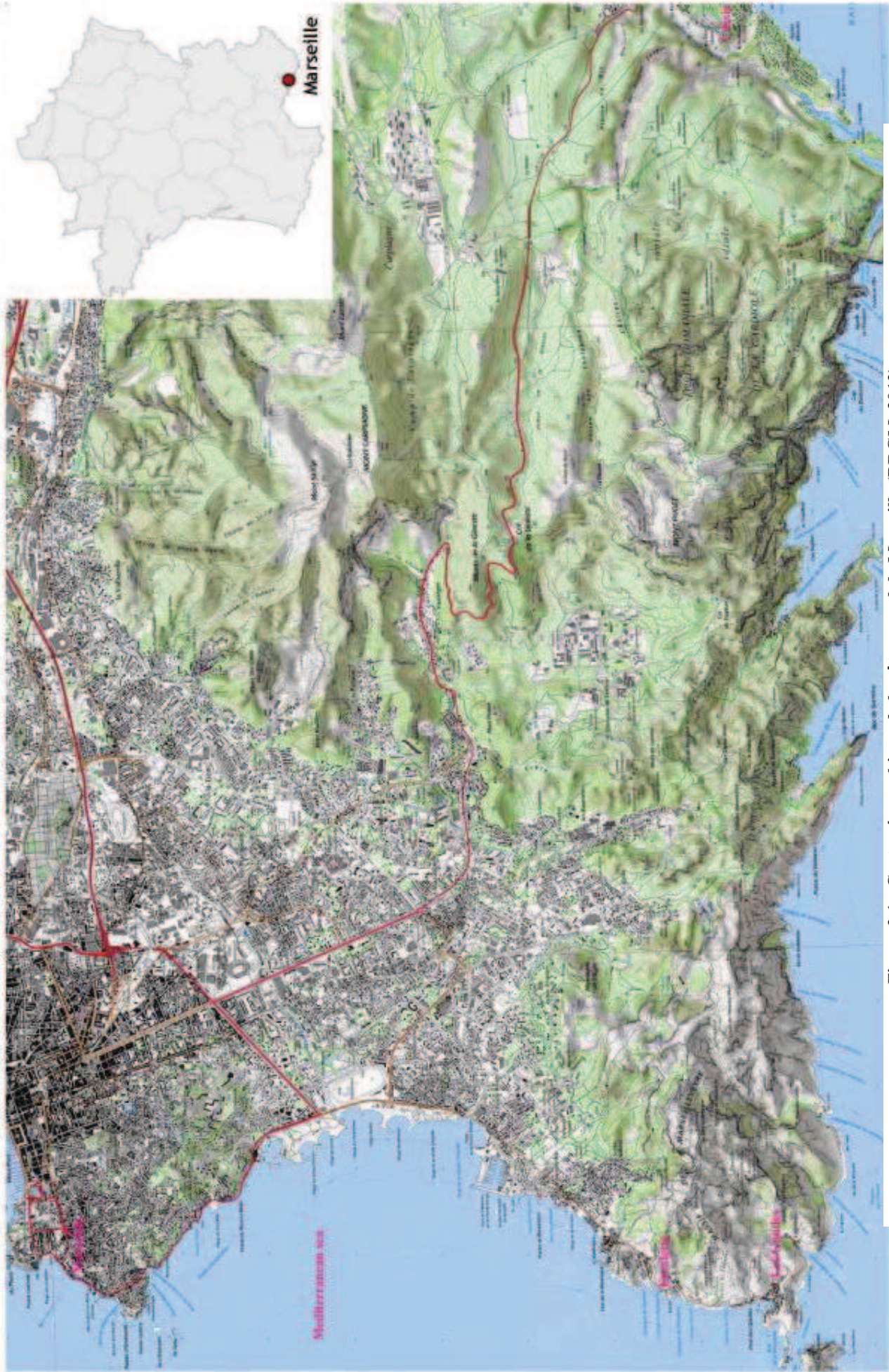


Figure 2.1 : Carte géographique de la côte au sud de Marseille (BRGM, 2012)

Les vents dominants suivent préférentiellement deux directions (données Météo-France, figure 2.3):

- Nord-Ouest dans 35,6 % des cas, avec une vitesse moyenne de $4,1 \text{ m.s}^{-1}$ et des pointes atteignant 17 m.s^{-1} . Ce vent souffle pendant 8,9 % du temps à une vitesse supérieure à 5 m.s^{-1} .
- Est-Sud-Est dans 27 % des cas avec une vitesse moyenne de $3,8 \text{ m.s}^{-1}$ et des pointes atteignant fréquemment 15 m.s^{-1} . Ce vent souffle pendant 9 % du temps à une vitesse supérieure à 5 m.s^{-1} .

Les vents dont la vitesse est supérieure à 5 m.s^{-1} sont susceptibles de mettre en suspension les particules fines de la surface du sol et donc les polluants potentiellement fixés dessus (Airmaraix, 2003).

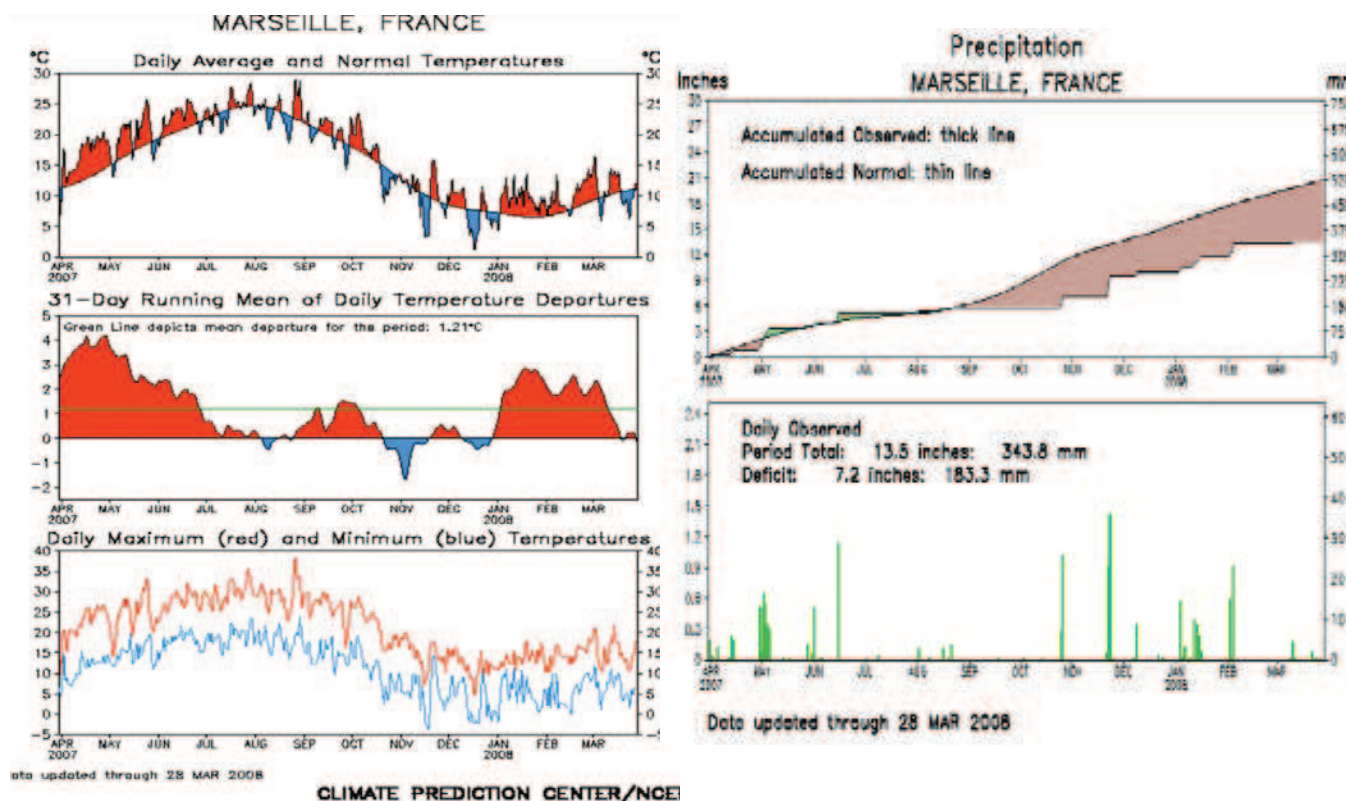


Figure 2.2 : Données météorologiques relevées à Marseille durant l'année 2007-2008 (Météo-France).

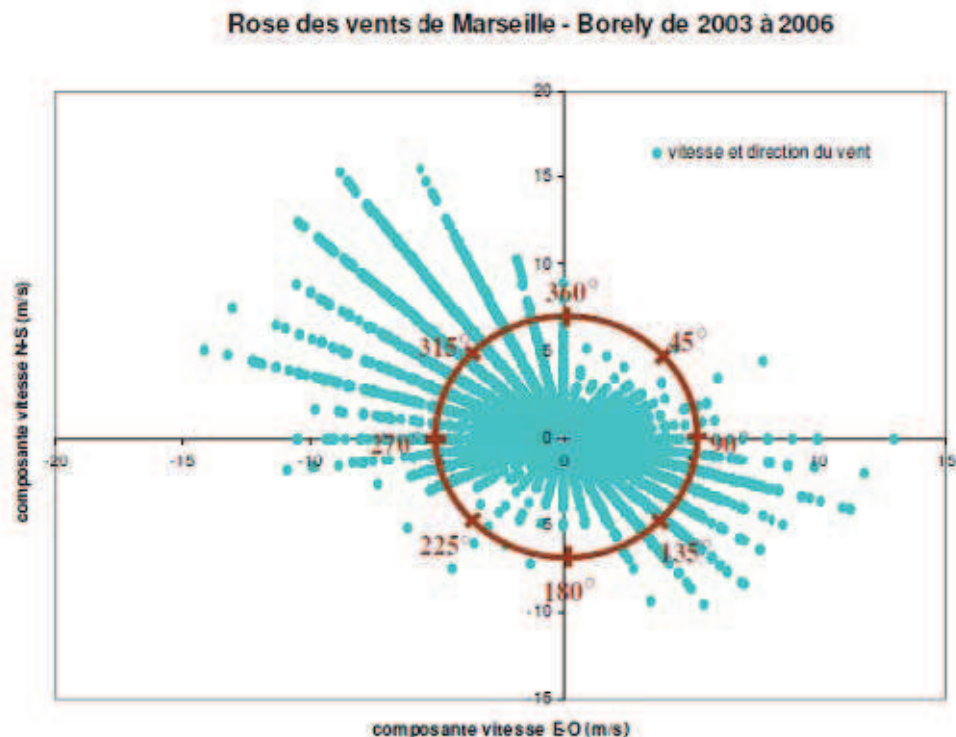


Figure 2.3 : Direction et vitesse du vent à la station Météo-France de Borely (entre 2003 et 2006) (source données Météo-France).

2.1.1.3. Géologie et pédologie

Le sous-sol du massif des Calanques est constitué de trois calcaires du Crétacé inférieur (figure 2.4.). Ce sont des calcaires massifs bio-détritiques. Ces calcaires possèdent de nombreux réseaux karstiques permettant des circulations souterraines importantes. Ces circulations alimentent un aquifère contaminé par l'intrusion d'eau de mer sur la zone littorale. Au niveau de l'ancienne usine, des écoulements souterrains suivent les failles du site de l'Escalette et rejoignent la mer au niveau du port de l'Escalette (MAEVA, 2008)

Le site de l'Escalette est situé à la limite entre trois entités géologiques qui sont calcaires, le Barrémien à faciès Urgonien, l'Hauterivien et le Valanginien (BRGM) :

- ♣ Le « Barrémien à faciès Urgonien », caractérisé par un « faciès » dolomitique, affleure largement dans la région de Marseille et lui confère une partie de son paysage le plus typique,
- ♣ Le « Hauterivien », présente un faciès varié selon le secteur, mais la faune est homogène, et très abondante en surface,
- ♣ Le « Valanginien », caractérisé par une forte assise calcaire à haute épaisseur, 30 à 50 m, avec intercalation de lits argileux verdâtre peu épais, ainsi que de petits bancs calcaires lithographiques ferrugineux.

Les sols du massif des Calanques (Molinier, 1935; MAEVA, 2008) ont des pH compris entre 7 et 9. On observe des rendzines, généralement minces et présentant une structure grumeleuse, sur les crêtes. Les sols sont riches en carbonate de calcium dans la partie fine et riches en matière organique. Les pentes sont caractérisées par la présence de lithosols. Ce sont des sols très peu évolués et très peu épais constitués de roche mère fragmentée. Sur le massif des Calanques, des sols appelés « terra-rossa » remplissent les fissures du karst et les dolines. Ils sont rouges en raison de la libération d'oxydes ferriques et présentent des fortes teneurs en argile. On retrouve ces sols à l'Est de la sortie de la cheminée de l'usine de l'Escalette.



Figure 2.4.: Schéma géologique de la zone des Calanques (Molinier, 1935)

2.1.1.4. Bioscénose

La région méditerranéenne représente une région floristique exceptionnelle avec 25 à 30 000 espèces et sous-espèces végétales ce qui correspond à 10% de la biodiversité végétale mondiale pour 1,6% de la surface terrestre - ceci associé à un fort taux d'endémisme (Médail and Quezel, 1997). Cependant, cette biodiversité remarquable subit une perte considérable du fait de changements environnementaux et anthropiques qui apparaissent plus importants dans les milieux de basse altitude et littoraux (Médail and Verlaque, 1997). Les écosystèmes méditerranéens sont dans un contexte de changement global dans lequel le rôle de l'Homme sera déterminant puisque l'impact de ses activités économiques et de ses choix de gestion agira directement sur les phénomènes de raréfaction et d'extinction des espèces.

Les calanques sont constituées de vallons, dont le profil est présenté figure 2.5. Différents habitats occupent ce profil. Sur les plateaux, des lapiazs, plateaux calcaires fissurés par les eaux de ruissellement, présentent une flore de petits arbrisseaux qui supportent la sécheresse. Les falaises pouvant border les plateaux sont des habitats difficiles, puisqu'il n'y a que de toutes petites fentes avec très peu de terre. Elles jouent cependant un rôle très important puisque de nombreux oiseaux nicheurs y trouvent refuge, notamment des rapaces. Au pied des falaises des éboulis se sont formés et constituent l'habitat de la Sabline de Provence (*Gouffeia arenarioides*), espèce protégée en France. Sur les pentes plus faibles, la végétation est une garrigue méditerranéenne classique, généralement constitué de végétation arbustive persistante avec de forte densité de croissance, comme le chêne kermès, le genévrier et le romarin. Enfin, c'est dans le fond des vallons ayant accumulé plus de débris que sont retrouvés des bois de petits feuillus méditerranéens comme le chêne vert.

Comme partout sur la côte méditerranéenne, le climat des Calanques est semi-aride, avec l'humidité provenant principalement de l'évaporation de la mer. Cette xéricité associée à des brouillards salins conditionne la subsistance d'une végétation adaptée.

Sur le site abandonné de l'ancienne métallurgie industrielle, qui n'a jamais été remis en état, des plantes indigènes ont colonisé naturellement les ruines et dépôts. Les espèces qui poussent sur ce site abandonné sont, par exemple entre autres, *Globularia alypum* L., *Lobularia maritima* (L.) Desv., *Juniperus phoenicea* L., *Rosmarinus officinalis* (figure 2.6) L., *Santolina chamaecyparissus*, *Senecio cineraria*, etc.



Figure 2.5.: Schéma structural de la répartition des habitats terrestres sur le calcaire karstique d'après P. Moutte (GIP des Calanques, 2008)



Figure 2.6. : Photographie de romarin dans les Calanques de Marseille

2.1.2. Expérimentation *in situ* - protocole expérimental

Comme annoncé dans les objectifs de ce travail, afin d'appréhender la contamination diffuse issue de l'Escalette dans le massif des Calanques, un transect expérimental le long d'un gradient de pollution a été défini. Huit sites ont ainsi été sélectionnés (voir ci-dessous) dans ce transect afin de déterminer les niveaux de contamination en ETMM dans les sols, les capacités d'accumulation du romarin dans ses différents organes (tige, feuille, racines) en fonction du niveau de contamination, et d'approcher les mécanismes de tolérance développés par cette plante au travers de l'étude de phytométabolites et de symbioses racinaires. Ainsi des prélèvements de sols et de romarins ont été effectués sur chacun des sites sélectionnés, et différentes analyses sont réalisées sur ces échantillons dans le but d'apporter des réponses concernant la contamination et la tolérance du romarin aux ETMM.

Pour évaluer les niveaux de contamination, les sols des sites sont donc caractérisés par la détermination des paramètres physico-chimiques classiques de pédologie (pH, granulométrie, capacité d'échange cationique (CEC), carbone organique, phosphore échangeable, azote total Kjeldhal), et le niveau de contamination en ETMM est caractérisé par dosage des ETMM pseudo-totaux et leur mobilité dans le sol est approchée par des extractions permettant d'estimer les fractions les plus labiles et potentiellement phytodisponibles.

Au niveau des romarins, afin d'évaluer le transfert des ETMM du sol à la plante, les concentrations en ETMM sont déterminées dans les différentes parties (tiges, feuilles, racines), et au niveau des racines une localisation des ETMM dans les tissus végétaux est recherchée. Une estimation du risque lié à la consommation des romarins peut ainsi être évaluée via les concentrations dans les parties utilisées, et l'évaluation du risque est complétée par un dosage des ETMM dans des infusions réalisées à partir des sommités fleuries.

L'approche des mécanismes de tolérance est abordée, d'une part par la détection de présence des symbioses racinaires, et d'autre part par la détection de phytométabolites au niveau des racines (acides aminés) et au niveau des parties aériennes (acides aminés, thiols, compositions des huiles essentielles, et indices physiologiques de chlorophylles, phénols, flavonols et anthocyanes).

Le protocole expérimental développé avec toutes les analyses effectuées sur les sols et romarins, est résumé sur la figure 2.7.

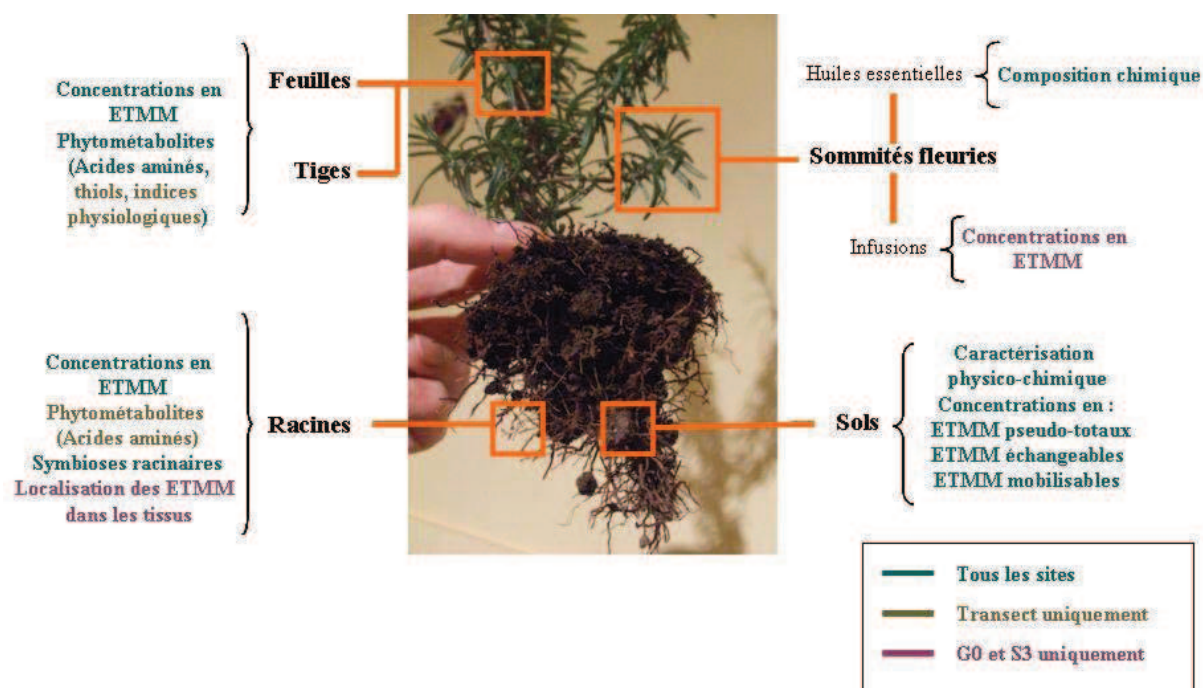


Figure 2.7 : Schéma du protocole expérimental pour l'étude *in situ*

2.1.2.1. Sites de prélèvements

Les zones de prélèvement ont été choisies le long d'un transect s'éloignant de l'usine de l'Escalette par le vallon de la Garenne, puis revenant vers la mer par le vallon de la Mounine. Ce transect a été défini dans le cadre du projet Marséco, dans le but de choisir des sites de prélèvement répondant aux besoins des différentes études menées. Ainsi, ce transect devait présenter un gradient de contamination en ETMM, mais également un gradient d'influence marine pour l'étude de l'apport de pollution organique par les embruns et de l'effet de la salinité sur la résistance des plantes aux pollutions.

Dans le cas de ce projet de thèse, 7 sites ont été choisis (figure 2.8) le long d'un gradient : G0 sur le site de l'usine (au niveau de la sortie de la cheminée rampante en ruine, révélé très contaminé par l'étude cartographique, figure 1.23) ; G1, G2, G3, dans le vallon de la Garenne ; puis G4 et G5 dans le vallon de la Mounine. Le dernier site situé à Sormiou et appelé G6, est considéré comme un site peu contaminé d'après la cartographie de la contamination dans les Calanques réalisé dans le cadre du projet Marséco (Testiati, 2012,

figures 1.23 à .25), et éloigné de l'usine et du centre urbain. Il correspond au site où les concentrations mesurées en ETMM dans les sols ont été les plus faibles. Ainsi, le site référence sélectionné correspond au site S3 de la cartographie réalisée précédemment (figure 1.22).

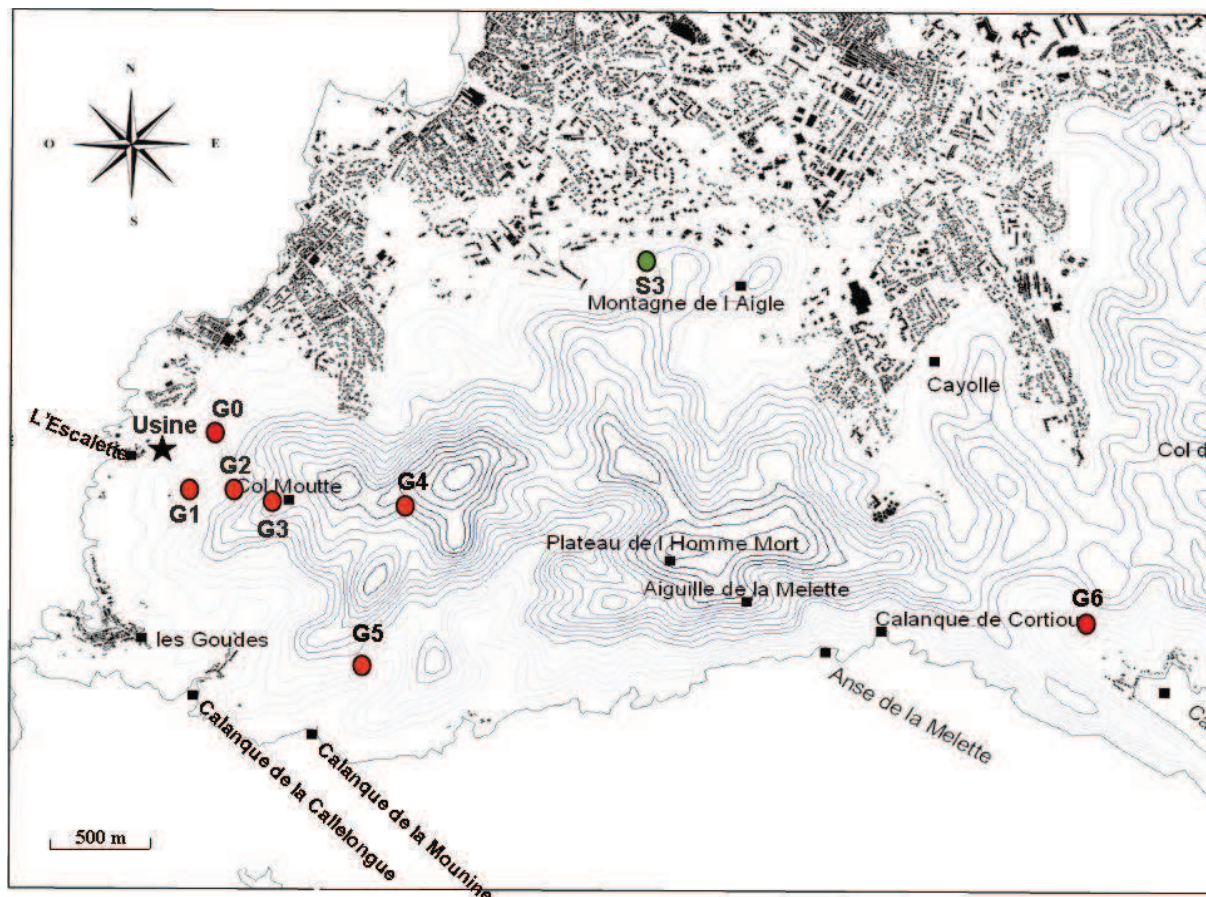


Figure 2.8 : Localisation géographique des 8 sites de prélèvement

Afin d'avoir une meilleure représentation de la localisation de ces sites de prélèvements et de leur contexte géographique, ils ont été placés selon leur coordonnées GPS (Global Positioning System) sur des photographies par satellites (Google-Earth) et présentés sur les figures 2.9 à 11. Tous ces sites sélectionnés (figures 2.8 et 2.11) présentent des conditions pédo-climatiques similaires. L'exposition, la pente, les caractéristiques du sol mais aussi le taux de recouvrement par la végétation, ainsi que le type de végétation présente, ont été des critères déterminant lors du choix des sites (annexe 1). Plusieurs campagnes de prélèvement ont été réalisées afin d'obtenir les échantillons nécessaires aux différentes analyses prévues.



Figure 2.9 : Photographie satellite de la zone de l'Escalette et position des sites G0 à G3.



Figure 2.10 : Photographie satellite avec les positions des sites G1 à G5.



Figure 2.11 : Photographie satellite du massif de Marseilleveyre avec position des sites G0 à G6 et de S3.

2.1.2.2. Prélèvements in situ et prétraitements du matériel végétal

Afin d'obtenir des échantillons représentatifs de chaque site, une zone de 100 m² (10 x 10 m) a été délimitée sur chaque site. Le couvert végétal sur chaque site était de plus de 60% sur les zones sélectionnées et les populations de romarins étaient composées de 15 à 20 individus de taille importante. Pour une représentativité statistique, 5 individus de romarin ont été sélectionnés selon un motif en croix à l'intérieur de chaque zone délimitée, et espacés d'environ 2 m et avec des tailles similaires, c'est à dire de hauteurs et de diamètres au collet similaires, et présentant un même stade phénologique. Des parties aériennes, feuilles et tiges, ainsi que des parties racinaires de romarin ont été prélevés sur chaque individu sélectionné. Et dans le but d'obtenir un échantillon représentatif de l'individu et pour palier à la potentielle hétérogénéité de contamination sur un même individu, l'échantillon final est constitué d'aliquotes prélevées tout autour du romarin.

Pour le transport jusqu'au laboratoire, les échantillons sont placés dans des sacs plastiques propres, fermés hermétiquement, ou dans des sacs en papier. Les échantillons de romarins sont lavés à l'arrivée au laboratoire. Les parties aériennes sont rincées soigneusement à l'eau du robinet, puis à l'eau UHQ. Les feuilles et les tiges sont ensuite séparées manuellement. Les

racines sont lavées minutieusement 3 fois à l'eau UHQ à l'aide d'un jet dentaire, afin d'éliminer toutes particules issues du sol.

Les échantillons de romarin destinés à la réalisation des infusions, aux dosages des ETMM et des huiles essentielles, sont mis à sécher dans une étuve à 40 °C pendant une semaine, puis broyés à 0,2 mm au moyen d'un broyeur (RETSCH zm 1000) avec des lames en tungstène et un tamis en titane. Ceux destinés au dosage des acides aminés sont broyés à l'azote liquide puis placés à -20 °C en attendant d'être traités. Les échantillons prélevés pour le dosage des thiols libres sont placés à -80 °C avant d'être lyophilisés (CRYOTEC Crios – 80) sous un vide de 10 Torr, à -80 °C pendant 24 h. Ils sont ensuite broyés avec un broyeur à couteaux (IKA A10), avec une lame en acier inoxydable, puis conservés dans un dessiccateur jusqu'à l'analyse.

2.1.2.3. Prélèvements et prétraitements des sols

Concernant les sols, seuls les 15 premiers centimètres (après élimination de la litière) ont été prélevés au niveau des cinq romarins d'une même population sélectionnés sur chaque site, puis tamisés directement sur site à 2mm. Ils proviennent de la zone rhizosphérique des romarins sélectionnés. Pour le transport jusqu'au laboratoire, les échantillons sont placés dans des sacs en polypropylène fermés hermétiquement.

Au laboratoire les sols sont séchés à température ambiante, puis broyés à 0,2mm par un broyeur à lames (RETSCH zm 1000) avec des lames en tungstène et un tamis en titane.

2.1.3. Expérimentations en conditions contrôlées – protocole expérimental

Afin d'approfondir et de valider certains des résultats observés *in situ*, des expérimentations en conditions contrôlées ont été réalisées, ce qui permet de s'affranchir des différences liées aux conditions pédologiques et climatiques, ainsi qu'aux paramètres d'âges et de géotypes des romarins. Ainsi des boutures de romarins ont été placées dans des rhizotrons et mises en culture pendant 6 mois dans des phytotrons avec les mêmes conditions de température, d'humidité et d'éclairage. Quatre conditions de sols ont été testées : un sol peu contaminé (G6) correspondant à des conditions témoins en ce qui concerne la contamination en ETMM, ce sol témoin (G6) contaminé en plomb à raison de 10 mg.kg⁻¹ (contamination 1), ce même sol témoin (G6) contaminé en plomb à raison de 100 mg.kg⁻¹ (contamination 2), et un sol

multi-contaminé de façon importante récupéré au niveau de la cheminée rampante (G0) (contamination 3). Le choix de la contamination en plomb s'est justifié aux vues des niveaux mesurés dans les sols des environs de l'usine (Testiati et al, 2013). Ainsi le paramètre variant entre les 3 premières conditions concerne la concentration en Pb du sol, et avec le sol multi-contaminé (contamination 3) des conditions proches de la réalité du terrain sont testées. A ces quatre niveaux de contamination, une condition supplémentaire a été testée et elle concerne l'ajout ou non d'un chélatant dans le sol pouvant interagir sur le transfert des ETMM du sol à la plante. Huit conditions différentes, 4 niveaux de contamination x 2 niveaux de chélatant (avec ou sans), ont donc été testées dans le cadre des études en cultures contrôlées. Un nombre total de 40 systèmes expérimentaux a ainsi été réalisé car pour chaque condition 5 boutures de romarins ont été cultivées (figure 2.12).

Dans l'objectif de préciser les capacités de transfert et d'accumulation des ETMM dans le romarin, les analyses des concentrations en ETMM dans les sols (pseudo-totaux, échangeables et mobilisables) ainsi que dans les différentes parties de la plante (tiges, feuilles, racines) ont été réalisées sur les boutures cultivées en conditions contrôlées (figure 2.13). Et afin de préciser les mécanismes de tolérance développés par le romarin, l'activité bactérienne dans le sol, la présence de symbioses racinaires ainsi que celle de phytométabolites au niveau des racines (dans les exsudats) et au niveau des parties aériennes (indices physiologiques) ont été recherchées (figure 2.13).

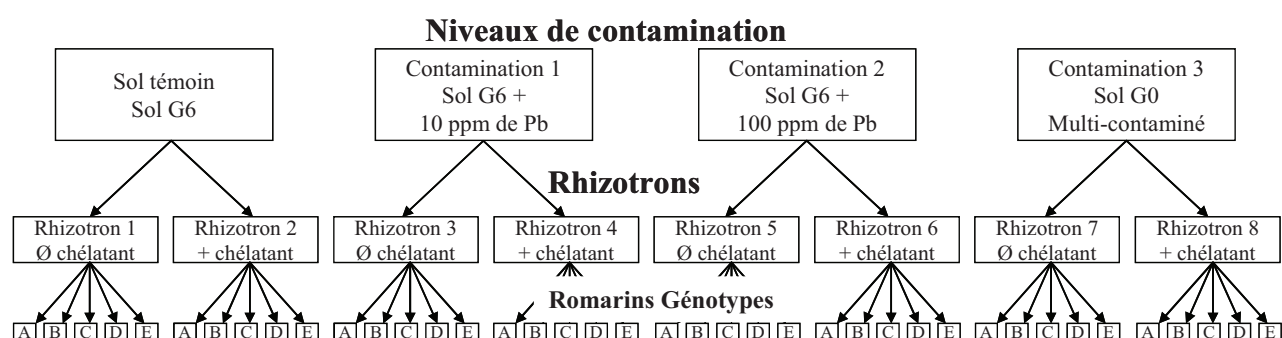


Figure 2.12 : Plan expérimental de l'étude en conditions contrôlées : organisation des rhizotrons

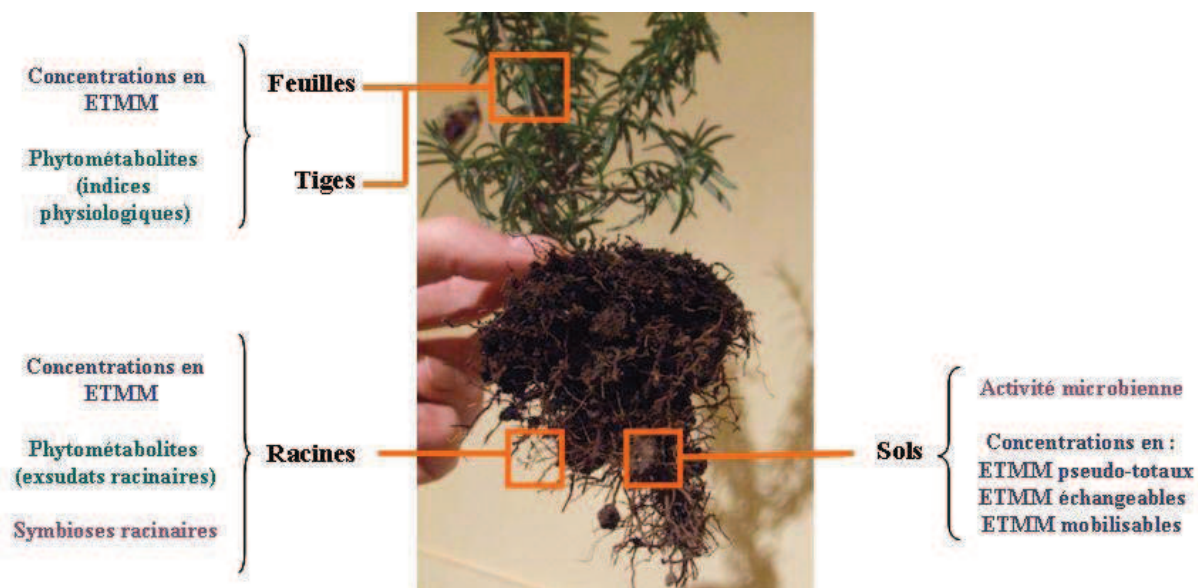


Figure 2.13 : Schéma du protocole expérimental pour l'étude en conditions contrôlées

2.1.3.1. Les rhizotrons

Les études en conditions contrôlées ont été réalisées dans des rhizotrons. Ils ont été conçus d'après les indications proposées par Neumann et al. (2009) , et adaptés selon nos besoins et contraintes. Des plaques de PVC, matériel inerte idéal pour la construction forment l'arrière des rhizotrons. Chaque rhizotron est séparé en 5 compartiments de taille identique (8,7 cm × 25cm) grâce au collage de baguettes en plastique (figure 2.14). L'étanchéité entre les compartiments est assurée par un joint de silicone. Des trous sont percés sur la partie arrière des rhizotrons et recouverts d'un morceau de feutrine afin de faciliter l'arrosage et de favoriser une distribution homogène de l'eau. Une plaque de plexiglas est placée sur l'avant des rhizotrons afin de voir les racines. Une feuille de plastique transparent est placée entre le sol et le couvercle en plexiglas afin d'éviter que les racines n'agèrent au plexiglas. Les compartiments sont remplis avec du sol sec. Pour finir, une feuille de papier aluminium recouvre le rhizotron afin de protéger les racines de la lumière (figure 2.14).

Une seule condition de sol est prévue par rhizotron. Les 5 répétitions nécessaires pour une condition sont obtenues avec un seul rhizotron, puisque chaque compartiment est prévu pour recevoir une bouture, soit un individu de romarin. Au total 8 rhizotrons ont été remplis : 2 pour chaque condition de sol, afin d'évaluer l'ajout de chélatant ou non pour chaque condition de contamination (figure 2.12).

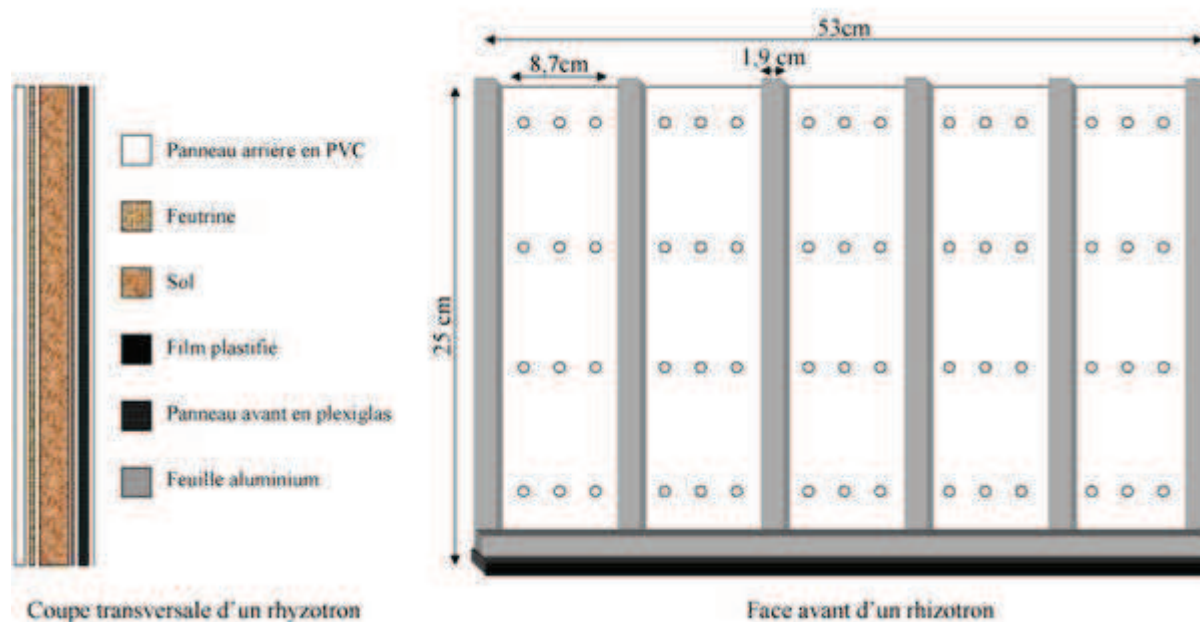


Figure 2.14 : Schéma d'un rhizotron (vues transversale et frontale)

2.1.3.2. Sols des rhizotrons

Deux types de sols ont été utilisés lors de cette expérimentation: un sol composite du site peu contaminé provenant du vallon de Sourmiou sur le site G6 du transect, et un sol composite du site très contaminé au niveau de la sortie de la cheminée rampante de l'usine de l'Escalette sur le site G0 du transect. Les prélèvements des sols composites ont été réalisés en prélevant des échantillons de sols en 5 points par site. Ces 5 points ont été sélectionnés par la méthode dite en « croix », correspondant à la sélection de 5 repères espacés d'au moins 5 m de distance entre eux, en dehors d'une couverture végétale importante autre que herbacée. Au niveau de chaque repère, 5 carrés de 1m² sont délimités et après élimination des pierres et/ou de la litière de surface, le sol est prélevé sur la profondeur de 15 cm. Ces sols prélevés sont tamisés à 2mm sur le terrain. Puis pour réaliser l'échantillon composite, après mélange et quartage de la fraction < 2mm, environ 4 kg de sol de chaque carré sont récupérés et stockés dans un sac en polypropylène. De retour au laboratoire, après séchage à l'air libre et à température ambiante, des mêmes masses de chacun des 5 carrés de prélèvement sont mélangées intimement.

A partir de ces deux sols composites, les 4 conditions de contaminations ont pu être obtenues. En effet, après homogénéisation, le sol composite de G6, le moins contaminé, a été divisé en 3 : le sol témoin, constitué du sol composite de G6, la contamination 1 avec le sol G6 dopé

avec 10ppm de plomb, la contamination 2 avec le sol G6 dopé avec 100ppm de plomb, et la contamination 3 avec le sol composite multi-contaminé de G0.

Les sols ont été renforcés en ajoutant du Pb sous forme liquide, par dilution d'une solution à 1g/L dans de l'acide nitrique 1% (Fisher Chemical, plomb-étalon 1000 ppm dans HNO₃ 1% pour SAA). Pour favoriser l'homogénéité de la contamination, l'apport de Pb a été réalisé en trois ajouts successifs espacés de plusieurs jours, afin de laisser au sol le temps de se réessuyer. Les sols humidifiés ont été quotidiennement agités à l'aide d'un mélangeur (REDSTONE malaxeur électrique). Le sol témoin a subi le même traitement, avec un apport d'eau UHQ. Pour chaque condition environ 4,25 kg de sol ont été enrichis. Un volume de 775ml de solution de Pb a été apporté à chaque ajout, ce volume permettant d'humecter la totalité du sol.

Une fois les 3 ajouts réalisés, tous les sols ont été placés pendant 4 mois à l'obscurité et à humidité constante afin de se stabiliser (Bataillard et al., 2003; Tang et al., 2008). Les sols ont été homogénéisés et réhumidifiés toutes les semaines. Enfin, après 4 mois, les sols ont été séchés, et 30% en masse de sable (ZOLUX Quartz n° 0,5 blanc) leur ont été additionnés afin d'augmenter leur porosité et d'éviter le compactage du sol pouvant causer l'asphyxie racinaire au cours de l'expérimentation. Le sable utilisé a été préalablement lavé avec H₂O₂ 30 volumes pendant une nuit afin d'éliminer la matière organique, puis avec HCl 0,1 mol.L⁻¹ pendant une nuit pour l'élimination des carbonates, ceci avant d'être rincé à l'eau claire jusqu'à élimination complète de l'acidité. Après essuyage de ces sols composites, ils sont utilisés pour remplir les compartiments qui leur ont été assignés dans les rhizotrons.

A la fin de l'expérience de culture contrôlée, les sols de chaque compartiment sont récupérés. Une partie (environ 100g pour déterminer la respiration microbienne) sera conservée à 4°C dans des sacs plastiques propres ouverts jusqu'à ce que le sol soit sec. Le reste sera traité de la même façon que décrite dans le paragraphe 2.1.3.3.

2.1.3.3. Matériel végétal des rhizotrons

La viabilité des graines de romarin est faible, et celles qui germent produisent une grande variété de types de plants (Conway et al., 1997). Ainsi, pour maintenir une uniformité parmi

les plants, les romarins utilisés pour cette expérimentation ont été obtenus par propagation végétative. La technique du bouturage à talon a été choisie, puisqu'elle est particulièrement adaptée à la propagation des espèces ligneuses. Les rameaux à bouturer n'ont pas été coupés, mais simplement arrachés délicatement de façon à détacher un petit lambeau de l'écorce du rameau principal, sans tenir compte du degré de lignification, celui-ci n'ayant apparemment pas d'effet sur la capacité de reprise des explants (Maness, 1981). Les explants ont été prélevés sur les romarins sélectionnés du site multi-contaminé G0, le but étant d'avoir une bouture de chacun des 5 romarins par condition, afin de limiter l'effet génotype dans les résultats. Les boutures de romarin ont dans un premier temps été mises à enraciner dans du terreau, et placés dans les phytotrons (SANYO, MLR-351) avec une photopériode de 12h par jour, un éclairage de $287 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, une température de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ le jour et $15 \text{ }^\circ\text{C}$ la nuit et une humidité constante de 60 % et ceci pendant 4 mois.

2.1.3.4. Expérimentations en phytotrons

Après ces 4 mois de développement, les boutures de romarins sont transférées et transplantées dans les compartiments des rhizotrons, ou elles sont arrosées de façon hebdomadaire, chaque individu recevant 40mL d'eau distillée. La culture de ces boutures a été poursuivie pendant 6 mois dans les phytotrons (SANYO, MLR-351) avec la même photopériode et les mêmes conditions d'éclairage, de température et d'humidité que précédemment.

Durant les 6 mois de l'expérience, des analyses non destructives ont été réalisées (figure 2.15).



Figure 2.15: Schéma récapitulatif des manipulations non destructives effectuées durant les 6 mois de culture des romarins en rhizotrons dans les phytotrons

Dans un premier temps, avant la mise en place des romarins dans les compartiments des rhizotrons, les longueurs des parties aériennes et racinaires de chaque individu ont été mesurées. Régulièrement, pendant les 6 mois de culture, l'état physiologique global des

plantes a été évalué par des mesures des indices de chlorophylles, d'anthocyanes, de phénols, de flavonols et un rapport calculé azote/carbone et flavonols grâce à un appareil portatif de mesures non-destructives, le multiplex® (voir description ci-dessous, chapitre 2.2). Un point de mesures a été réalisé tous les mois, avec une fréquence plus élevée le dernier mois, du fait de l'apport de chélatant.

Le chélatant a été choisi après des essais d'extraction d'ETMM en batch avec différents chélatants naturels. L'acide citrique, le glutathion et la cystéine ont été testés. A la vue des résultats, la cystéine a été choisie (annexe 2). Il s'agit d'un acide aminé, rapidement dégradé dans le sol. Ainsi, la cystéine a été apportée aux sols des rhizotrons destinataires sous la forme de trois ajouts successifs de solutions avec un intervalle de 2 jours à chaque fois, et ceci 15 jours avant la fin de l'expérience (Melo et al., 2008). Une concentration totale de cystéine de 10mmol.kg^{-1} de sol a été apportée (Vadas and Ahner, 2009) en étant incorporée dans les eaux d'arrosage. Ainsi les compartiments ne recevant pas de chélatant, ont été arrosés avec le même volume d'eau distillée.

L'intérêt des rhizotrons étant d'avoir accès aux racines, des prélèvements d'exsudats racinaires ont été réalisés selon la méthode de Neumann et Romheld (1999). Ainsi, par compartiment, 10 cercles de papier absorbant Whatmann 3MM, après lavage au méthanol et à l'eau UHQ pour éliminer les impuretés, ont été placés sur les racines de romarin. Une fois les cercles de papier absorbant placés sur les racines, les rhizotrons sont refermés et replacés dans les phytotrons (SANYO, MLR-351) pendant 2h. Ces disques sont ensuite récupérés et placés dans des tubes à centrifuger dans lesquels 1mL d'eau UHQ est ajouté afin d'extraire les acides organiques potentiellement présents dans les exsudats. Les tubes sont agités pendant 10 min à 125 rpm sur un agitateur orbital (Fisher Bioblock Scientific SM30B) puis centrifugés 10 min à 8000 rpm (centrifugeuse JP SELECTA, Médifriger BL-S) avant filtration à $0,45\mu\text{m}$. Les extraits obtenus sont ensuite congelés avant lyophilisation à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ avec un vide de 10 torr pendant 24 h (CRYOTEC Crios – 80). Ces manipulations ont été répétées 3 fois avant ajout du chélatant et 3 fois après (figure 2.15).

A la fin de l'expérience, chaque individu de romarin est collecté. Les racines et les parties aériennes sont mesurées, lavées à l'eau de ville et 3 fois à l'eau distillée, puis mis à sécher dans une étuve à 30°C pendant une semaine. Les échantillons secs sont broyés (après séparation des feuilles et des tiges) avec un broyeur à couteaux IKA A10 puis conservé dans des flacons hermétiquement fermés jusqu'à minéralisation.

2.2. Méthodes analytiques

2.2.1. Caractérisation biologique et physico-chimique des sols

2.2.1.1. Estimation de l'activité microbienne du sol

L'activité microbienne du sol est estimée en mesurant la respiration aérobie induite à l'aide d'un système Oxytop® control qui permet de suivre automatiquement et en continu la consommation en oxygène d'un échantillon par mesure de la diminution de la pression dans une enceinte hermétiquement fermée (figure 2.16).

La respiration est un processus universel permettant aux cellules vivantes, qu'elles soient animales, végétales ou microbiennes d'assurer leurs besoins énergétiques. Dans le cas de la respiration aérobie des organismes oxydent la matière organique, source d'électrons et d'énergie. Les électrons vont transiter le long d'une chaîne respiratoire jusqu'à l'accepteur final : l'oxygène. Ainsi, à la fin de ce processus, les produits issus de l'oxydation de la matière organique (CO_2) et de la réduction de l'oxygène (H_2O) sont rejetés par l'organisme. L'activité respiratoire peut donc être mesurée en quantifiant le CO_2 produit ou l' O_2 consommé (notre cas), ou les deux. Cette mesure donne une indication sur la biomasse microbienne, et donc des informations sur le fonctionnement microbiologique des sols.

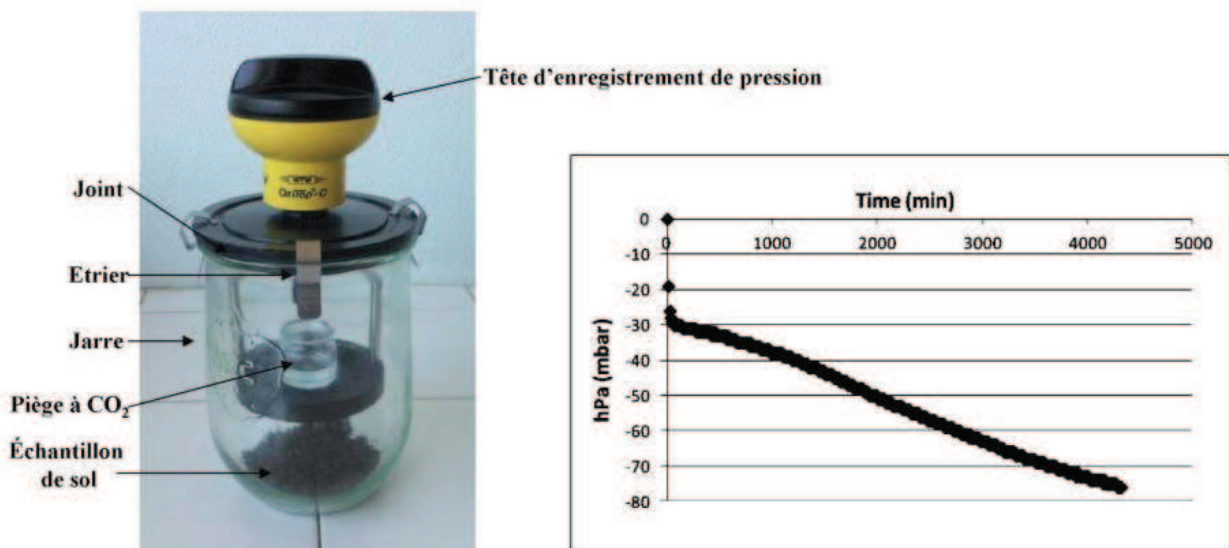


Figure 2.16 : à gauche : photographie d'un système Oxytop® ; à droite: exemple de cinétique de dépression pouvant être obtenu.

Les sols ont été humidifiés à 50% de la capacité au champ, puis 20g des sols humides sont introduits dans une jarre. Afin de stimuler l'activité des micro-organismes hétérotrophes, 100mg de glucose ont été ajoutés sous la forme de 0,5 mL d'une solution à 200g.L^{-1} . Cet ajout fournit une source de carbone facilement assimilable aux micro-organismes. Afin de piéger le CO_2 gazeux formé, quatre pastilles de soude sont placées dans chaque jarre. Ces dernières sont ensuite fermées hermétiquement par une tête de mesure qui enregistre les variations de pression toutes les 16 minutes. Les jarres fermées sont placées pendant 4 jours dans une enceinte thermo-régulée à 25°C , avec une résolution n'excédant pas $0,1^\circ\text{C}$, et à l'obscurité.

Après 4 jours les résultats sont collectés. L'évolution de la pression permet de déterminer la quantité d' O_2 consommé au cours de la respiration, puisque le CO_2 formé est piégé par la soude. A partir des variations de pressions enregistrées pendant 4 jours, la pente de la perte de pression dans la jarre est calculée. Les résultats sont exprimés en mg d' O_2 consommé par jour et par gramme de sol sec selon la formule suivante :

$$SR = \frac{M(\text{O}_2) \cdot V_{\text{fr}} \cdot dP}{R \cdot T \cdot M(\text{DS}) \cdot X_d}$$

Où SR: respiration du sol; $M(\text{O}_2)$: masse molaire de O_2 ; V_{fr} : volume libre; dP : différence de pression; R: constante des gaz parfaits; T: température en Kelvin; $M(\text{DS})$: masse de sol sec; X_d : nombre de jours.

2.2.1.2. Détermination des paramètres physico-chimiques des sols

Plusieurs paramètres physico-chimiques des sols ont été déterminés: la granulométrie, le pH, le carbone organique total, la teneur en phosphore échangeable, l'azote total Kjeldahl (NTK), la capacité d'échange cationique (CEC), ainsi que les cations (calcium, magnésium, potassium et sodium) échangeables à l'acétate d'ammonium.

Seules les mesures de pH et de carbone organique total et l'azote total Kjeldhal (NTK) ont été réalisées au laboratoire. Pour les autres paramètres, les sols ont été envoyés à l'INRA d'Arras pour analyse suivant les normes NF X 31-107, NF X 31-161, NF X 31-130 et NF X 31-108 pour, respectivement la granulométrie, le phosphore échangeable, la CEC selon la méthode Metson, et les cations échangeables.

pH_{eau} (norme ISO 10390)

La détermination du pH_{eau} a été réalisée selon la méthode standard ISO 10390. 10g de sol ont été suspendus dans 25 ml d'eau ultra-pure, agités pendant 1 heure à 150rpm sur un agitateur orbital (Fisher Bioblock Scientific SM30B). On laisse ensuite reposer le mélange pendant 1 heure, avant mesure du pH avec un pH-mètre Orion 2 Thermo Fisher. Le pH_{eau} correspond à la concentration en ions H₃O⁺ libres de la solution du sol. La mesure obtenue représente l'acidité active ou réelle du sol.

Le carbone organique total

La mesure du carbone organique total (COT) est un moyen indirect d'accéder à la quantité de matière organique dans le sol. La détermination des teneurs en COT a été faite à l'aide d'un analyseur de carbone organique total Shimadzu TOC-5050A relié à un module pour échantillons solides SSM-5000A. L'appareil permet de mesurer le carbone total (CT) et le carbone inorganique (CI). Ainsi, par différence, il calcule le COT :

$$CT - CI = COT \text{ (exprimé en \%)}.$$

La mesure du CT est réalisée grâce à l'oxydation de la matière par combustion à 900°C dans un four. Le CI est quantifié après acidification de l'échantillon avec quelques millilitres d'acide phosphorique (H₃PO₄ à 85%) dans un four à 200°C. Dans les deux cas, les réactions font que le CT et le CI sont transformés en CO₂. Ce dernier est alors entraîné par un courant d'oxygène vers une cellule de détection par infrarouge non dispersif (filtres interférentiels passe-bande région 2400-2280 cm⁻¹). La prise d'échantillon est de l'ordre de 70 et 100 mg pour l'analyse du CI et du CT respectivement.

La précision de la mesure dépend notamment de la précision de la balance (0,1 mg). Les nacelles contenant les échantillons doivent être manipulées avec des pinces dépourvues de trace de carbone. Pour chaque échantillon, l'analyse a été répétée 3 fois pour vérifier la répétabilité des résultats et utiliser une moyenne représentative. Le coefficient de variation a également été calculé. Lorsque sa valeur était supérieure à 5%, l'analyse était répétée à nouveau. Les valeurs sont ensuite exprimées en mg de C.kg⁻¹. Régulièrement, quelques centaines de milligrammes de deux solutions de glucose (C₆H₁₂O₆) et d'hydrogencarbonate de sodium (NaHCO₃) ont été utilisés pour étalonner le carbone total et le carbone inorganique (Mantzavinos et al., 2001); (Petitjean et al., 2004); (Vergnoux, 2009)).

La granulométrie (norme NF X 31-107)

La granulométrie en 5 fractions sans décarbonatation a été déterminée. Les proportions des classes de particules sont les suivantes :

- Argiles : < 2 μm
- Limons fins : 2 μm à 20 μm
- Limons grossiers : 20 μm à 50 μm
- Sables fins : 0,050 mm à 0,200 mm
- Sables grossiers 0,200 mm à 2,00 mm

La détermination des fractions les plus fines (< 50 μm) s'effectue au moyen de 3 prélèvements successifs (à la pipette dite de Robinson) dans une suspension de sol en cours de sédimentation. La fraction des sables fins est séparée par passage de la suspension sur tamis de 50 μm sous un courant d'eau après prélèvement des fractions fines.

Prélèvements et tamisage sont réalisés après destruction de la matière organique par l'eau oxygénée (H_2O_2) sur une prise d'essai d'environ 10 g. La dispersion finale est réalisée par un court passage aux ultrasons après addition de dispersant $[(\text{NaPO}_3)_6 + \text{Na}_2\text{CO}_3]$ et après avoir au préalable séparé les sables grossiers (> 0,2 mm) par tamisage. Les pesées après évaporation et séchage des fractions prélevées à la pipette permettent de déterminer les proportions des différentes classes granulométriques. Les résultats sont exprimés par rapport à la phase minérale (somme des 5 fractions = 1000).

Le phosphore échangeable (norme ISO 11263)

Les échantillons sont agités en présence d'une solution d'oxalate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$) à 0,1 mol/L dans un rapport 1/25 (m/v) (Joret and Hebert, 1955). Le dosage du phosphore extrait s'effectue par spectrophotométrie à 825nm après développement de la coloration du complexe phosphomolybdique selon le protocole décrit par Duval (1963). La prise d'essai est de 2 g de sol broyé à 2 mm.

L'azote total Kjeldhal (NTK) (norme ISO 11261)

L'échantillon est digéré à l'aide d'acide sulfurique concentré, après addition du catalyseur de minéralisation ($\text{CuSO}_4 + \text{K}_2\text{SO}_4 + \text{Se}$). Le sulfate d'ammonium ainsi formé est distillé sous forme d'ammoniac en solution alcaline et titré par un excès de solution d'acide sulfurique 0,05M. L'excès d'acide est dosé par la soude 0,01M.

La capacité d'échange cationique (CEC) (norme ISO 23470)

La CEC correspond à la quantité de charges positives portées par les cations susceptibles d'être fixés, de façon réversible, sur les sites chargés négativement de certains constituants du sol. On distingue les sites à charges permanentes dont le nombre varie peu avec les conditions de milieu (minéraux phylliteux) et les sites à charges variables (matière organique) dont la quantité est fortement liée au pH. La détermination de la CEC selon la méthode de Metson comprend trois étapes (Ciesielski and Sterckeman, 1997; Metson, 1956) :

- L'échantillon est d'abord saturé en ions ammonium (NH_4^+) par percolations successives d'une solution d'acétate d'ammonium ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$) à 1 mol/L. Le pouvoir tampon de cette dernière permet de ramener le pH du milieu aux environs de 7, ce qui constitue une des caractéristiques essentielles de cette méthode.

- Après avoir éliminé l'excès d'ions ammonium par percolations d'alcool éthylique, on procède ensuite à leur échange par une solution de chlorure de sodium à 1 mol/L.

- Les ions ammonium déplacés sont dosés par spectrophotométrie sur la solution précédente, une fois filtrée. Les concentrations trouvées sont converties en cmol^+/kg (centimoles de charges positives par kilogramme de sol).

La prise d'essai est de 2,5 g de sol broyé à 2 mm.

Les cations échangeables extraits à l'acétate d'ammonium (norme ISO 23470)

Par convention, les cations échangeables sont déterminés par agitation (et non par percolation) de l'échantillon en présence d'une solution d'acétate d'ammonium à 1 mol/L. Après filtration, l'extrait est récupéré en vue du dosage des cations passés en solution en absorption (Ca et Mg) ou émission (K et Na) atomique en flamme (Thomas, 1982; Ciesielski and Sterckeman, 1997). La prise d'essai est de 2,5 g d'échantillon broyé à 2 mm. Les résultats sont exprimés en cmol^+/kg comme pour la CEC.

A noter que la fraction de cations extraite n'est pas toujours spécifique aux seules formes échangeables. Ce phénomène est particulièrement accentué dans le cas de fortes proportions de sels solubles (sols salés) et dans le cas du calcium pour les sols calcaires. L'ajout d'une solution d'acétate d'ammonium de pH 7 à un sol de pH aux environs de 8 revient à l'acidifier et provoquer la dissolution du carbonate de calcium jusqu'à saturation du milieu.

2.2.2. Analyses des ETMM

2.2.2.1. Extractions des ETMM

- **Dans les sols**

L'analyse des ETMM se faisant en solution, les métaux contenus dans le sol doivent dans un premier temps être solubilisés.

ETMM pseudo-totaux (norme ISO 11466)

Dans ce cas les sols subissent une minéralisation acide en four micro-onde (MILESTONE Start D). Les échantillons sont donc placés, en présence d'acide concentré, dans des tubes en téflon, hermétiquement fermés et placés dans un four micro-onde (figure 2.17). Cette méthode permet une dissolution quasi-complète de l'échantillon, n'occasionne aucune perte d'éléments volatils limitant ainsi les contaminations et protégeant l'opérateur. La forte acidité du milieu, forte température et forte pression facilite la décomposition de la matière organique. De plus, le contrôle de ces paramètres assure une bonne répétabilité.

Le mélange d'acide et le programme de température doivent être optimisés pour chaque type d'échantillon. Le mélange acide et le programme de température le plus approprié a été choisi après minéralisation d'un sol référence à valeur certifiée (CRM 049-050, de RTC-USA) avec une exactitude de $100\pm 10\%$. Le programme sélectionné atteint une température de 200°C en 20min et y reste pendant 20min avant de redescendre jusqu'à la température initiale en 40min environ.

Concernant le mélange acide, les sols sont minéralisés dans de l'eau régale c'est-à-dire dans un mélange composé de 1/3 d'acide nitrique (fisher chemical, HNO_3 supra pur 67-69%) et de 2/3 d'acide chlorhydrique (fisher chemical, HCl supra pur 35-38%). Après la minéralisation, les échantillons sont repris dans 50ml, qsp eau UHQ. On parle d'analyse d'ETMM pseudo-totaux, car ce mélange acide ne dissout pas l'ensemble des silicates, alors que ce sont les minéraux dominants dans la majorité des sols. Les valeurs obtenues avec cette méthode peuvent être plus faibles que les valeurs considérées comme véritablement totales, notamment pour certains éléments comme le plomb (Baize, 2009). Cependant, l'obtention de valeurs dites "totales" implique l'utilisation d'acide fluorhydrique, qui est un produit extrêmement toxique et dangereux. Ainsi, la minéralisation n'étant pas totale, le minéralisat obtenu est filtré à $0,45\ \mu\text{m}$ et conservé à 4°C jusqu'à analyse.

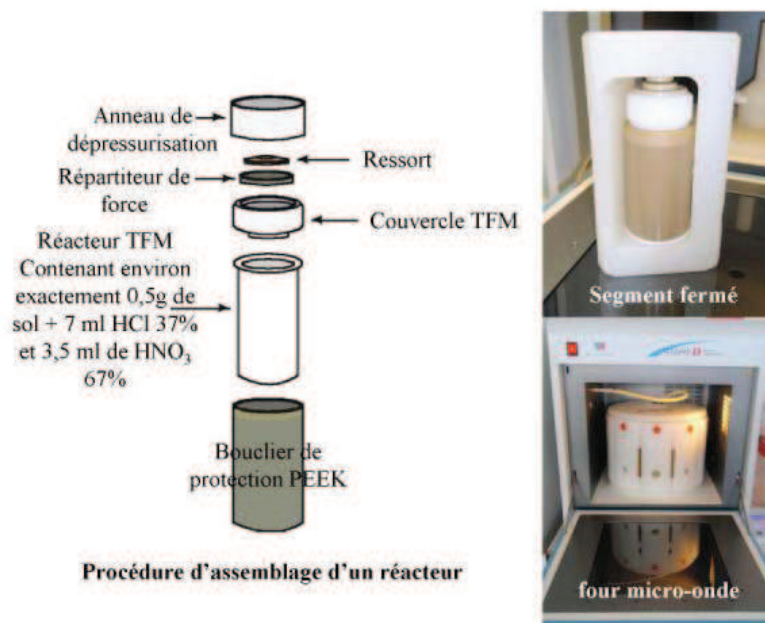


Figure 2.17: Procédure de fermeture des réacteurs de minéralisation pour le four micro-onde

ETMM échangeables

La fraction totale échangeable des métaux dans un sol peut être estimée par extraction avec une solution présentant une force ionique suffisamment élevée, tels que du nitrate de calcium (Ca(NO₃)₂) à 0,1 M. Ceci est fonction de l'augmentation de la concentration en Ca²⁺ dans la solution d'extraction qui est choisie de manière pertinente par rapport aux conditions naturelles de la solution du sol (Meers et al., 2007). Ainsi, une extraction à l'aide de solution de nitrate de calcium a été utilisée pour mesurer la disponibilité des métaux, qui peut être directement liée à leur potentiel de toxicité. Dans ce travail, une solution à 0,05 M de Ca(NO₃)₂ a été utilisée comme solution d'extraction et elle a été préparée en suivant le protocole du BCR (Bureau Communautaire de Référence) (Quevauviller, 1998).

Un volume de Ca(NO₃)₂ (correspondant à un rapport de 1/10 (m/v)) est ajouté au sol à extraire placé dans un tube en PTFE (téflon), soit 30 ml pour 3 g de sol. Le tout est agité à température ambiante sur un agitateur orbital (Fisher Bioblock Scientific SM30B) à 125 tours par minutes pendant 2 h. Les tubes sont ensuite mis à centrifuger 10 min à 8000 rpm (JP SELECTA, Médifriger BL-S), puis le surnageant est récupéré et filtré à 0,45 µm. Les solutions ainsi obtenues sont acidifiées avec 1 % (200 µl d'acide nitrique supra pur concentré) et conservées à 4 °C jusqu'à analyse en ICP-AES ou en GF-AAS.

ETMM mobilisables

Ils sont évalués par extraction des sols à l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) (Quevauviller, 1998). L'EDTA est un agent chélatant capable de former des complexes stables avec les cations métalliques. Cette molécule comporte six sites basiques, quatre correspondant aux bases conjuguées (carboxylates) des fonctions carboxyliques et deux correspondant aux fonctions amines, qui constituent les centres ligands (figure 2.18). Les résultats obtenus avec ce type d'extraction surestiment généralement les teneurs réellement phytodisponibles puisque l'EDTA a tendance à mobiliser des éléments retenus dans des compartiments du sol que les racines ne peuvent pas atteindre (Feix and Tremel-Schaub, 2005). Les fractions censées être extraites sont celles correspondantes aux métaux liés aux carbonates et aux métaux liés organiquement, en utilisant une méthode d'extraction approprié pour l'analyse des sols calcaires (Quevauviller et al., 1996). Les extractions sont réalisées suivant le protocole BCR proposé par (Quevauviller, 1998) avec une solution d'EDTA à 0,05 mol/L ajustée à pH $7,00 \pm 0,05$ par addition d'acide chlorhydrique ou d'ammoniaque concentré. Le choix du pH 7 constitue un compromis entre le maximum de solubilité de nombreux anions et l'augmentation de la chélation des cations, ce qui fait de ce type d'extractions une procédure applicable aux espèces formant des oxy-anions (As, Cr, Mn...), comme aux cations (Cd, Pb, Zn, etc) (Garrabrants and Kosson, 2000). Ce test est considéré comme approprié pour l'analyse des sols calcaires (Quevauviller et al., 1996).

Un volume d'EDTA correspondant à un rapport de 1/10 (m/v) est ajouté au sol à extraire placé dans un tube en PTFE (téflon), soit 30ml pour 3g de sol. Le tout est agité à température ambiante sur un agitateur orbital (Fisher Bioblock Scientific SM30B) à 125 tours par minutes pendant 1h. Les tubes sont ensuite mis à centrifuger 10min à 8000rpm (JP SELECTA, Médifriger BL-S), puis le surnageant est récupéré et filtré à $0,45\mu\text{m}$. Les solutions ainsi obtenues sont conservées à 4°C jusqu'à analyse en ICP-AES ou en GF-AAS.

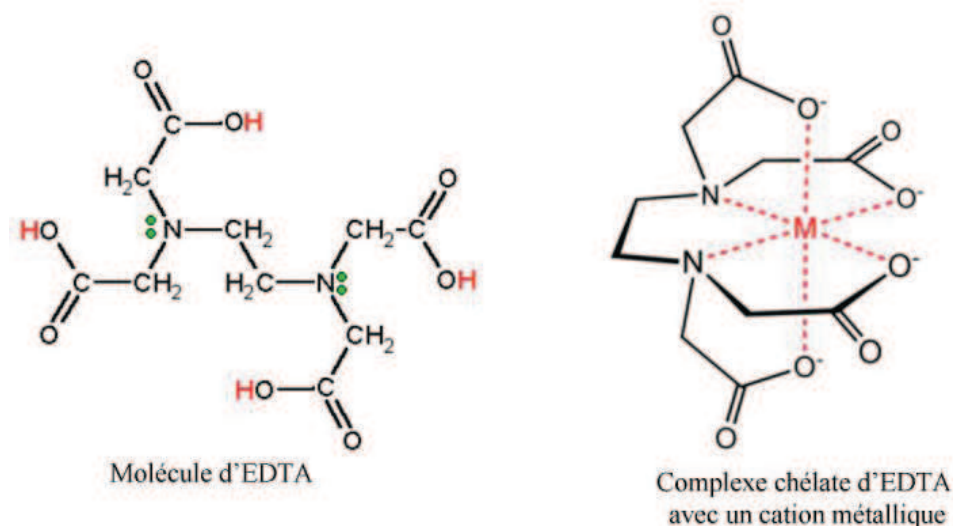


Figure 2.18: Molécule d'EDTA (acide éthylène diamine tetraacétique) complexée ou non avec un cation métallique

- *Dans les romarins*

Comme les sols, la quantification des ETMM contenus dans les végétaux nécessite une minéralisation. Le matériel utilisé est identique à celui décrit pour les métaux pseudo-totaux dans les sols dans le paragraphe ci-dessus. Cependant le programme de température et le mélange acide ont été adaptés. Deux programmes et quatre mélanges acides ont été testés avec un matériel végétal de référence certifié (DC 73349) provenant du NCS (Institut central du fer et de l'acier, Chine). Finalement, le programme le plus adapté comprend deux plateaux de température, un premier de 10 min à 150 °C atteint en 30 min et un second à 180 °C pendant 10 min également. Le mélange acide quant à lui est inversé par rapport à celui utilisé pour les sols. Ainsi, aux 0,5 g de romarin 3 ml de HNO₃ et 6 ml de HCl concentrés sont ajoutés avant fermeture du réacteur et minéralisation.

Les échantillons minéralisés sont repris dans 50 ml pour les échantillons in situ, 25 ou 20 ml qsp eau UHQ pour les échantillons des expérimentations en conditions contrôlées puis analysés en ICP-AES et GF-AAS.

- **Dans les infusions**

L'évaluation du passage des ETMM dans l'eau lors du processus d'infusion a été déterminée avec pour objectif de reproduire au mieux les gestes des consommateurs. Ce procédé consiste à verser de l'eau bouillante sur les drogues végétales (plantes médicinales au sens de la pharmacopée française) puis à la laisser en contact pendant une durée prescrite. La pharmacopée française préconise de faire infuser pendant 15 min, 5 g de feuilles de romarin et/ou sommités fleuries de romarin dans 1 L d'eau (ANSM, 2007). Cependant, une recette trouvée sur plusieurs sites Internet, (www.toutfaisoimeme.com, www.femininbeaute.com), donc plus accessible au grand public, préconisait de faire infuser 50g de feuilles de romarin dans 1 L d'eau pendant 15 minutes. C'est ce protocole que nous avons retenu.

Pour cela, des sommités fleuries ont été prélevées sur les romarins des sites G0 et S3 (le plus contaminé G0, et le moins contaminé S3). Elles ont été cueillies aléatoirement sur le romarin afin d'obtenir un échantillon représentatif de l'individu entier, et les branches visiblement altérées n'ont pas été sélectionnées afin de reproduire le geste du consommateur. Au laboratoire, les échantillons ont été lavés grossièrement à l'eau du robinet puis placés dans une étuve ventilée à température ambiante (maxi 35 °C) afin d'accélérer le séchage. Avant infusion, les romarins sont sommairement effeuillés afin de récupérer les feuilles et les sommités fleuries et d'éliminer les tiges les plus épaisses. Une eau de source faiblement minéralisée a été choisie. Il s'agit de l'eau Mont Roucous® dont les propriétés physico-chimiques sont présentées tableau 2.2. Un volume de 250 mL de cette eau portée à ébullition est ajouté à 12,5 g de romarins séchés et non broyés. Après 15 min d'infusion, les solutions obtenues sont filtrées à 0,45 µm, acidifiées à 1 % avec de l'acide nitrique concentré et conservées à 4 °C en attendant leur analyse en ICP-AES ou GF-AAS. Une seule infusion a été réalisée par romarin, sauf dans le cas d'un individu du site contaminé (G0), pour lequel 3 répétitions ont été obtenues, afin d'évaluer l'hétérogénéité au sein d'un même individu.

Tableau 2.2 : Paramètres physico-chimique de l'eau de source Mont Roucous®

Paramètres	
pH	5,85
Résidu sec à 180°C (mg/L)	25
Calcium (mg/L)	1,2
Magnésium (mg/L)	0,2
Sodium (mg/L)	5
Potassium (mg/L)	0,4
Chlorures (mg/L)	3,2
Silice (mg/L)	3,2
Sulfates (mg/L)	3,3
Hydrogénocarbonate (mg/L)	4,9
Fluor (mg/L)	0,3
Nitrate (mg/L)	2,3

- *ETMM adsorbés à la surface des racines des romarins*

L'extraction des ETMM adsorbés a été réalisée sur des racines sèches de différentes tailles d'un romarin du site multi-contaminé G0. En effet, la concentration d'ETMM adsorbés à la surface des racines peut être considérable, entre autre concernant le plomb, et ces ETMM peuvent être adsorbés à la périphérie des racines au niveau des tannins notamment (Chin et al., 2009). Les racines ont été plongées dans une solution de NaEDTA à 20 mmol/L et agitées pendant 15 min à 125 rpm, en suivant le protocole proposé par Xiong et al. (2011). Après agitation, la solution est récupérée, filtrée à 0,45 µm puis conservée à 4 °C jusqu'à analyse. Les racines utilisées ont ensuite été rincées, séchées, broyées puis minéralisées pour un dosage des ETMM restant, ceci afin de déterminer le pourcentage d'ETMM adsorbé.

2.2.2.2. Dosages des ETMM dans les extraits

Les ETMM, mis en solution, sont dosés soit par spectrométrie d'émission atomique par torche à plasma, ICP-AES (HORIBA Jobin Yvon JY2000 Ultrace), soit par spectrométrie d'absorption atomique en four graphite, GF-AAS (Thermoscientific ICE 3000).

* **L'ICP-AES** est une méthode d'analyse multi-élémentaire. La solution à doser passe dans un plasma qui est un gaz ionisé, électriquement neutre, constituant une source de température très élevée (8000 à 10000K). Il a pour rôle de casser les liaisons moléculaires, de produire des ions et des atomes libres, et d'exciter ces particules. Il s'agit d'une technique d'émission atomique puisqu'elle utilise les émissions de photons résultant du passage d'un atome d'un niveau d'énergie supérieur, atteint après excitation par le plasma, à un niveau d'énergie inférieur. Chaque élément possède des raies d'émission spécifiques. Le dosage est possible puisque l'intensité lumineuse émise est proportionnelle à la concentration de l'élément à doser. Les paramètres d'utilisation de l'ICP-AES Jobin Yvon 2000 Ultrace sélectionnés pour le dosage des ETMM sont présentés dans le tableau 2.3.

Tableau 2.3 : Paramètres expérimentaux de l'ICP-AES utilisés pour la quantification de As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn dans les solutions d'extraits des ETMM.

Paramètres	Valeurs
Puissance (kW)	1
Débit d'Argon plasmagène (L.min⁻¹)	12
Longueurs d'onde	
Arsenic	193,7
Cuivre	324,7
Fer	259,9
Manganèse	257,6
Plomb	220,3
Antimoine	206,8
Zinc	213,8

* **La GF-AAS** est une méthode mono-élémentaire, mais sa limite de détection est généralement inférieure à celle de l'ICP-AES. Elle a donc été utilisée lorsque les solutions présentaient des concentrations inférieures à la limite de quantification de l'ICP-AES.

Dans cette technique l'échantillon est vaporisé dans un four en graphite chauffé rapidement à une température très élevée (plus de 2000°C selon les éléments) par effet Joule. Cette énergie va permettre la volatilisation et l'atomisation des molécules. Les atomes vont être soumis à un faisceau lumineux, produit par une lampe à cathode creuse, dont la longueur d'onde va permettre le passage de l'état fondamental à l'état excité d'un élément en particulier. La concentration en élément est déduite de la mesure de l'absorbance des photons par les atomes

(loi de Beer-Lambert). Durant l'analyse le four en graphite est chauffé selon un programme spécifique de l'élément à analyser. Généralement 4 étapes sont respectées: le séchage, la décomposition, l'atomisation et la pyrolyse (tableau 2.4.).

Tableau 2.4: Paramètres expérimentaux du GF-AAS pour la quantification de l'arsenic, de l'antimoine et du plomb

	As	Sb	Pb
Longueur d'onde (nm)	193,7	217,6	217
Modificateur de matrice	NiNO ₃	NiNO ₃	MgNO ₃
Phase 1			
Température (°C)	110	110	110
Paliers (sec)	30,0	25,0	20,0
Débit argon (ml.min⁻¹)	0,2	0,2	0,2
Phase 2			
Température (°C)	120	120	120
Paliers (sec)	12,0	15,0	20,0
Débit argon (ml.min⁻¹)	0,2	0,2	0,2
Phase 3			
Température (°C)	1250	1300	900
Paliers (sec)	15,0	15,0	15,0
Débit argon (ml.min⁻¹)	0,2	0,2	0,2
Phase 4			
Température (°C)	2600	2250	1300
Paliers (sec)	3,0	3,0	3,0
Débit argon (ml.min⁻¹)	0	0	0
Phase 5			
Température (°C)	2700	2700	2700
Paliers (sec)	3,0	3,0	3,0
Débit argon (ml.min⁻¹)	0,2	0,2	0,2

*** Validation des dosages :**

La quantification a été réalisée par étalonnage externe uniquement. Les solutions étalons ont été préparées à partir de solutions monoélémentaires de référence certifiées à 1 g.L⁻¹ et d'acide nitrique à 2%. La calibration des appareils a été réalisée à chaque fois dans la même matrice que les échantillons. Par la suite, la vérification et la validation des droites d'étalonnage ont été réalisées grâce à des solutions multi-élémentaires différentes certifiées également, toujours dans la même matrice que les échantillons analysés. La justesse de l'analyse est ainsi vérifiée par la mesure d'un échantillon de contrôle de référence QC, et l'acceptation est effectuée pour une différence maximale de 5% par rapport à la valeur de

l'échantillon de contrôle. En cours d'analyse, une vérification de la stabilité de la mesure est réalisée tous les 10 échantillons avec la mesure d'un étalon ou d'un QC, et l'acceptation est effectuée pour une dérive maximale de 5%.

Les limites de quantification pour chaque ETMM ont été déterminées pour les analyses par ICP-AES et par GF-AAS. Ces limites calculées pour chaque milieu d'extraction (pseudo-totaux, échangeable, mobilisable, dans les plantes) sont présentées en annexe 3a et 3b.

La validation de la minéralisation et de l'analyse des métaux pseudo-totaux dans les plantes a été réalisée grâce à l'utilisation d'échantillons de référence certifiés de plantes (CRM « Bush branches and leaves », NCS-DC 73349, USA). La validation de la minéralisation et de l'analyse des métaux pseudo-totaux dans les sols a quand à elle été réalisée grâce à l'utilisation de sols de référence certifiés présentant des niveaux de contamination en ETMM différents (CRM 049-050 fournit par RTC-USA ; SRM-2586, USA). Les résultats obtenus lors des tests de validation avec ces échantillons certifiés ont tous été inclus dans les intervalles de confiance (en général à 5% d'écart) ou de tolérance (autour de 10% maximum) fournis par les organismes de certification.

2.2.2.3. Localisation histologique des ETMM dans le romarin

La localisation histologique dans le romarin a été réalisée grâce à des coupes de racines qui ont été analysées par micro-spectroscopie de fluorescence X (Horiba Jobin Yvon, XGT⁷⁰⁰⁰).

Micro-spectroscopie de fluorescence X (μ XRF)

La μ XRF utilise l'excitation directe des rayons X pour induire l'émission caractéristique de fluorescence X de l'échantillon analysé. On distingue deux types de fluorescence :

- La fluorescence primaire qui résulte directement de l'effet du rayonnement incident sur l'élément considéré et constitue la principale contribution à l'émission d'un élément dans un échantillon.
- La fluorescence secondaire où le faisceau incident "excitateur" est en fait la fluorescence X d'un des éléments de l'échantillon. Ce dernier élément émettra donc une fluorescence totale qui sera la résultante de la fluorescence primaire due au faisceau incident et de la fluorescence secondaire due à un des autres éléments de l'échantillon.

La taille du faisceau d'un Micro-spectromètre de fluorescence X est comprise entre 10 et 100 μm . Ainsi, il ne sera pas possible d'observer l'organisation tissulaire des échantillons, cependant, le principal atout de la μXRF est sa limite de détection faible, puisqu'elle est comprise entre 50 et 100 $\mu\text{g/g}$ selon les éléments.

Des fragments de racine sèches de différentes tailles (pivot, racines primaires et secondaires) prélevées sur un romarin sacrifié du site contaminé G0, ont été incluses dans une résine époxy (EPON) et des coupes transversales de 200 μm d'épaisseur ont été obtenues grâce à une scie à fil. Les analyses ont été réalisées avec un microscope équipé d'un tube à rayon X produisant un faisceau de forte intensité et très ciblé avec une taille de point de 10 μm (Tube à rayon X avec une source au rhodium, voltage d'accélération de 30 kV et un courant de 1 mA). Les rayons X émis par l'échantillon irradié sont détectés par un spectromètre à rayon X à énergie dispersive (EDS) équipé d'un détecteur en Silicium de grande pureté, refroidi par l'azote liquide. La cartographie élémentaire (128 px^2 soit une taille de pixel de 4 μm) montre la distribution de Ca, Fe, K, S, Pb et Zn dans les coupes de racine avec un temps de comptage de 20*1000 secondes. Des spectres ont également été obtenus sur des zones sélectionnées avec un temps de comptage de 1000 s.

2.2.3. Caractérisation des phytométabolites dans le romarin

2.2.3.1. Les acides aminés

Ce sont les échantillons de romarin frais, broyé à l'azote liquide qui sont utilisés pour extraire les acides aminés. Le protocole d'extraction a été adapté selon (Bates et al., 1973). Un volume de 5 ml d'acide sulfosalicylique à 3 % est ajouté à environ précisément 1,0 g d'échantillon placé dans des tubes à centrifuger en téflon. Les tubes sont fermés et mis dans un bain à ultrason (VWR international) pour casser les cellules et libérer les acides aminés. Ils sont ensuite centrifugés pendant 10 min à 8000 rpm (JP SELECTA, Medifriger-BL-S) avant d'être filtrés à 0,45 μm et conservés à -20 °C jusqu'à analyse.

Les analyses sont réalisées en chromatographie ionique haute performance (HPIC), grâce à une ICS 3000 (DIONEX) équipée d'un passeur d'échantillon AS50 (DIONEX). La chromatographie liquide à haute performance échangeuse d'anions, couplée à un système de détection ampérométrique pulsé (ED40 – DIONEX), est une technique qualitative et

quantitative très performante pour l'analyse directe, sans étape de dérivation, des acides aminés, contrairement aux techniques de détection par UV ou fluorescence habituellement utilisées en chromatographie liquide haute performance (Yokoyama et al., 1996). Ce système étant également adapté à l'analyse des sucres, une cartouche permettant d'éliminer les sucres (Carbohydrate Removal Cartridge - CRC) dans l'échantillon, est placée avant la colonne. Il s'agit d'une cartouche remplie d'une résine échangeuse de cation fonctionnalisée par des groupements sulfonates. Les acides aminés protonés par l'acide formique 0,02 % (0,08 ml/min) sont retenus sur la cartouche, alors que les sucres, neutres sont élués et éliminés vers les déchets. Après l'éluion des sucres, la cartouche est connectée au système et les acides aminés sont entraînés vers la colonne.

La séparation est possible grâce à un ensemble "Amino-pac PA 10". Il est constitué d'une courte colonne de garde (2× 40 mm) et d'une longue colonne analytique (2× 250 mm) remplies d'une même résine pelliculaire échangeuse d'anion (55% Divinylbenzene), polymérique et hydrophobe, fonctionnalisée par des sels alkyl ammonium quaternaires. En milieu basique, les acides aminés sont chargés négativement. En effet, le groupement acide carboxylique s'ionise en perdant un proton. La séparation des acides aminés est faite avec un éluant fortement alcalin donnant lieu à des interactions fortes avec la phase stationnaire. Des ions acétates ont été utilisés en gradient d'éluion. En effet, ces anions interagissent plus fortement avec la phase stationnaire que les ions hydroxydes.

A la sortie de la colonne, un système de détection par ampérométrie pulsée (PAD) avec une électrode d'or permet la mise en évidence des acides aminés. Les analytes sont oxydés à la surface de l'électrode par l'application d'un potentiel positif. Le courant généré par la molécule lors de son oxydation est proportionnel à sa concentration, ce qui rend l'analyse quantitative. Afin de prévenir la diminution du signal, la surface de l'électrode est nettoyée par l'application d'une série de potentiels.

Concernant la séparation des acides aminés dans la colonne, trois éluants sont utilisés:

Voie A: eau UHQ,

Voie B: solution de soude 250 mM

Voie C: solution d'acétate de sodium à 1 M.

Les solutions préparées sont dégazées sous hélium pendant 5 min puis mise sous atmosphère inerte grâce à un flux d'azote dans les bidons d'éluant. Le programme d'éluion dure 74 min. Le débit est de 0,250 ml/min avec un gradient présenté dans le tableau 2.5.

Tableau 2.5 : Gradient d'élution utilisé pour le dosage des acides aminés en chromatographie ionique

Temps d'élution (min)	A (%)	B (%)	C (%)	Etape de la programmation
0	76	24	0	Elution
8	64	34	0	
18	40	20	40	
21	44	16	40	
23	14	16	70	
42,1	20	80	0	lavage
44,2	76	24	0	conditionnement
74	76	24	0	fin

Le système de détection par ampérométrie pulsée est soumis à différents potentiels présentés tableau 2.6

Tableau 2.6 : Représentation des différents potentiels et temps d'application à l'électrode pour la détection ampérométrique

Temps (s)	Potentiel (V) vs. pH	Intégration
0,00	0,13	
0,040	0,13	
0,050	0,33	
0,210	0,33	début
0,220	0,55	
0,460	0,55	
0,470	0,33	
0,560	0,33	fin
0,570	-1,67	
0,580	-1,67	
0,590	0,93	
0,600	0,13	

Ces paramètres sont programmés puis gérés à l'aide du logiciel Chroméléon® (DIONEX). L'étalonnage est effectué avec des solutions étalon allant de 1µM à 500µM, préparées dans une solution d'acide chlorhydrique à 1 %. Les acides aminés et peptides étudiés sont glycine, proline, méthionine, histidine, cystéine et glutathion.

2.2.3.2. Les thiols libres

Les thiols libres sont mesurés par spectrophotométrie UV (JASCO V-670) dans les feuilles et tiges de romarin prélevés *in situ*, après lyophilisation, broyage et dérivation. Ils sont extraits suivant le protocole modifié de Potesil et al. (2005). Une masse d'environ précisément 0,5 g de romarin pesée précisément et broyée et 5 ml de tampon phosphate 0,2 M, pH 9, sont introduits dans un tube à centrifuger. Le mélange est agité pendant 30 min à 30 rpm (Fisher Bioblock Scientific SM30B) dans une chambre froide à 10 °C. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 14000 g pendant 30 min dans une centrifugeuse thermostatée à 4 °C (JP SELECTA, Médifriger BL-S). Le surnageant est récupéré et filtré à 0,45 µm sur des filtres PES (polyethersulfone) puis conservé à -80 °C jusqu'à purification et analyse.

Dans la littérature deux réactifs sont couramment utilisés afin de dériver le groupement thiol. L'un d'eux est le réactif d'Ellman, l'acide 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoïque) (DTNB) et l'autre, le monobromobimane (mBBr) (El-Zohri et al., 2005; Perez-Rama et al., 2005). Cependant, le DTNB ne permet pas un dosage des thiols de manière très sensible et le MBBr est un réactif fluorescent utilisé dans le cadre de techniques séparatives. Très récemment, la réaction des composés thiols avec les esters de l'éthylpropiolate a été utilisée pour la quantification par spectrophotométrie des thioacrylates résultants qui présentent une absorbance à 285 nm (Owen, 2008). Cette réaction d'oxydoréduction est très rapide et s'effectue en conditions douces à pH 6,8 (figure 2.19).

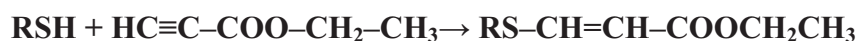


Figure 2.19 : Réaction de dérivation entre le groupe thiol et l'éthylpropiolate (Zacharis et al., 2009).

C'est ce dernier réactif qui a été choisi comme réactif de dérivation pour cette étude. L'éthylpropiolate permet d'effectuer des réactions de dérivation rapides, fiables et adaptables à une large variété d'échantillons. De plus, il permet de former des dérivés solubles en phase aqueuse (Palacio-Barco, 2010). La dérivation a été faite avant l'analyse en spectrophotométrie UV en ajoutant 10 µL d'éthylpropiolate à 0,2 ml d'échantillon purifié et du tampon phosphate 0,2 M pH 9 qsp 10 ml. Malgré la filtration, l'extrait de romarin obtenu contient de nombreuses molécules aromatiques comme les phénols, des diterpènes et des flavones, capables d'absorber dans l'UV (Almela et al., 2006). Ainsi, pour éviter un bruit de fond trop élevé lors de la mesure du spectre UV, les échantillons ont été purifiés à l'aide de cartouches de 50 mg

de XAD-4 (styrène-divinyl benzène) capables de retenir les substances hydrophiles acides, préalablement conditionnées par percolation de 3 mL d'acétonitrile puis rincées avec 3 mL d'eau déminéralisée.

L'étalonnage de la méthode est réalisé avec une solution de cystéine, un acide aminé thiolé. La gamme étalon est comprise entre 0 et 140 μM de cystéine. Les résultats obtenus sont exprimés en milligrammes de thiols par litre (mg -SH/L) puis en micromoles de thiols par gramme de matière sèche de romarin.

2.2.3.3. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) ont été isolées par hydrodistillation à partir des feuilles des sommités florales de romarin, séchées à 40°C. Il s'agit d'une méthode d'extraction dont le rôle est d'entraîner les composés volatils avec la vapeur d'eau. Pour cela, un mélange eau – végétal est porté à ébullition. Sous l'effet de l'ébullition, la structure des cellules végétales est détruite, libérant les molécules contenues dans les feuilles et entraînant les espèces chimiques les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique. Le courant de vapeur crée permet l'entraînement d'une mélange hétérogène d'eau et de molécules organiques, qui est en fait un azéotrope de l'eau. Cette propriété du mélange permet, dans la majorité des cas une volatilisation des métabolites secondaires à une température d'ébullition inférieure à celle de chaque composé et à celle de l'eau. Ainsi, des métabolites ayant un point d'ébullition assez élevé peuvent être extraits (Sutour, 2010). La vapeur, chargée de l'essence de la matière première distillée, se condense puis est récupérée dans un autre récipient après condensation dans un système réfrigérant. L'hydrodistillat obtenu est constitué d'une phase aqueuse (hydrolat) contenant les composés hydrosolubles et d'une phase organique formée par l'huile essentielle qui de par sa plus faible densité se trouvera au dessus de la phase aqueuse.

L'hydrodistillation a été réalisée avec un appareil de type Clevenger (figure 2.20) pendant 2 h (Schwob et al., 2004). Un échantillon d'huile essentielle a été obtenu par individu. Les rendements d'extraction ont été calculés par rapport à la masse de matière végétale sèche hydrodistillée pour les individus de G0 et S3. Les échantillons de romarins et 200 mL d'eau distillée sont introduits dans un ballon. L'immersion totale des branches de romarin n'est pas nécessaire, puisque la vapeur suffit à entraîner les composés volatils. La masse de romarin introduit étant faible (environ 12 g de romarin sec), la quantité d'huile essentielle est réduite.

La récupération de l'huile essentielle se fait donc en ajoutant du pentane, un solvant polaire et hydrophobe. Le mélange ainsi récupéré est conservé à 4 °C à l'obscurité jusqu'à analyse.

Les HE ont été analysées en chromatographie en phase gazeuse (VARIAN, 3900GC) équipé d'une colonne capillaire en verre de silice CP SIL 8CB (30 m × 0,25 mm et une épaisseur de film de 0,25 µm) composée de 5 % de diphényle et de 95 % de diméthyle polysiloxane. A la sortie de la colonne un détecteur à ionisation de flamme (FID) est présent. La flamme est obtenue par combustion d'un mélange d'hydrogène et d'air. Les composés organiques sortant de la colonne pénètrent dans la flamme et forment des ions, collectés par deux électrodes, entre lesquelles on applique une différence de potentiel. Il en résulte un courant électrique recueilli par un électromètre.

L'éluion des composés des huiles essentielles se fait suivant un gradient de température. Après une étape isotherme à 50 °C pendant 2 min, la température du four augmente de 50 à 200 °C à 3 °C/min. L'hydrogène est utilisé comme gaz vecteur, avec un flux de 0,5 mL/min. L'injecteur split-splitless et le détecteur sont chauffés à 220 et 230 °C respectivement. Les huiles essentielles en solution dans le pentane ont été injectées en mode split (1:30).

Les HE ont également été analysées en chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC/MS) (HEWLETT-PACKARD, 5972). Un spectromètre de masse permet l'identification et la quantification des analytes. Il est constitué d'une source, d'un analyseur et d'un détecteur. La source permet la production d'ions gazeux à partir des molécules introduites. Dans ce cas, il s'agit d'une ionisation par impact électronique (EI). Les molécules sont bombardées par un faisceau d'électron de haute énergie, ce qui a pour effet d'arracher un électron à la molécule bombardée. Ceci conduit à la formation d'un ion radicalaire qui acquiert une forte énergie interne avec pour conséquence une fragmentation en ions plus petits. Les électrons sont produits par le chauffage d'un filament métallique et accélérés par une différence de potentiel. L'analyseur permet la séparation des ions produits par la source en fonction de leur rapport masse sur charge : m/z . Dans le cas présent, un analyseur dit "quadripolaire" de type quadripôle a été utilisé. Il est constitué de quatre électrodes métalliques parallèles raccordées électriquement deux à deux, de section idéalement hyperbolique mais le plus souvent cylindrique et longue de douze à vingt centimètres. L'application d'un potentiel crée un champ quadripolaire entre les électrodes. Deux électrodes symétriques par rapport à l'axe central du quadripôle sont portées à un potentiel. Les deux autres ont le même potentiel mais de signe opposé. Les polarités des électrodes sont

rapidement inversées, ce qui confère aux ions un mouvement. Suivant le potentiel appliqué, certains ions vont adopter une trajectoire stable et pourront atteindre le détecteur, tandis que d'autres seront collectés par les barres du quadripôle. Le rôle du détecteur est double: détecter les ions proportionnellement à leur nombre et amplifier le courant correspondant pour le rendre détectable par l'électronique du système.

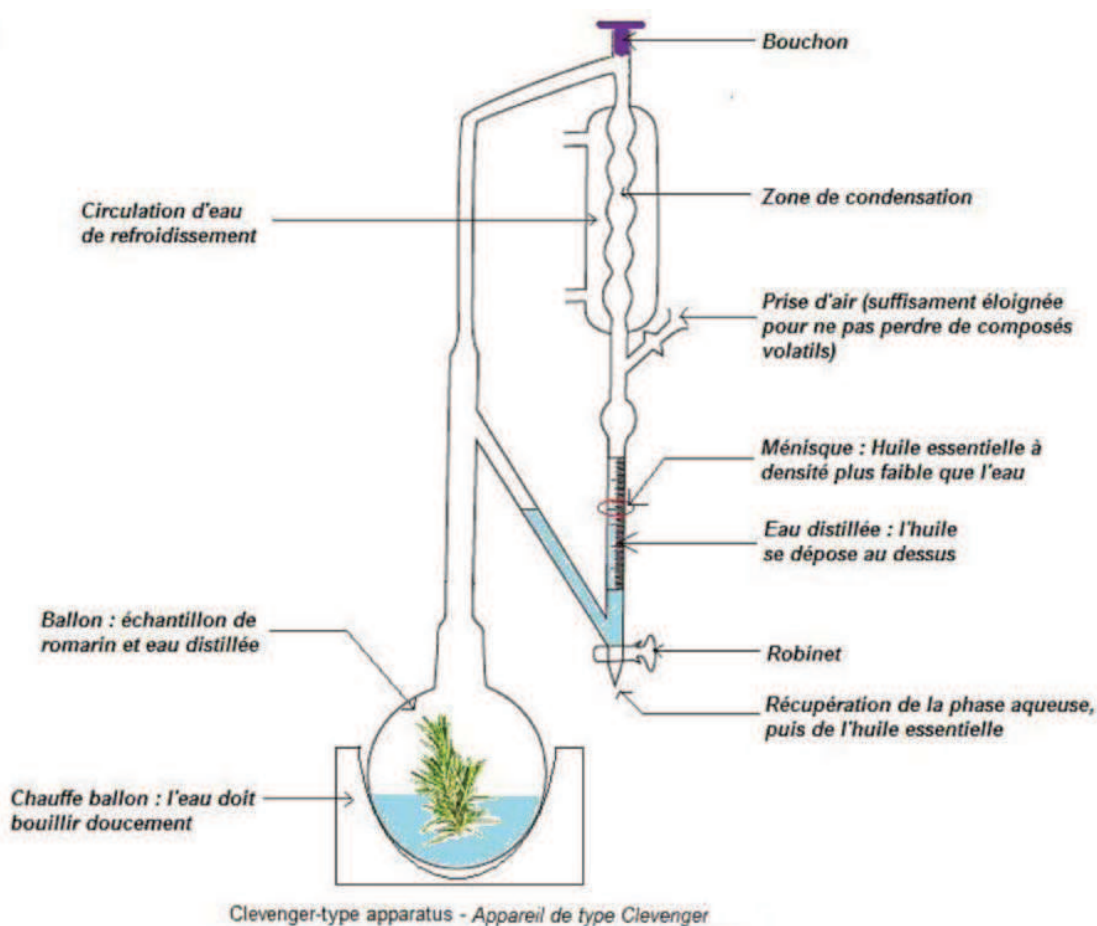


Figure 2.20 : Montage de l'appareil de type Clevenger utilisé pour l'obtention des huiles essentielles de romarin.

Les analyses ont été réalisées avec un GC/MS équipé d'une colonne capillaire DB5 en verre de silice (25 m x 0,2 mm, épaisseur de film 0.25 μm), composée de (5 % Phenyl)-methylpolysiloxane, couplée à un spectromètre de masse quadripôle. Le programme de température augmentait de 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de 60 à 220 $^{\circ}\text{C}$. L'injecteur split-splitless et le détecteur ont été chauffés à 220 et 270 $^{\circ}\text{C}$ respectivement. De l'hélium à un débit de 1 ml/min a été utilisé comme gaz vecteur. Le spectromètre de masse opérait avec une source de type ionisation par impact électronique avec une énergie d'ionisation de 70 eV. Les données de

courant ionique total (TIC) ont été collectées avec un temps de scan de 0,1 s pour une gamme de masse allant de 38 à 400 daltons.

Les composés constituant les HE ont été identifiés par comparaison des spectres de masse et des données obtenues en GC pour les composés standards préalablement analysés et conservés dans le système de base de données (NBS 98K et WILEY 275). L'identification d'autres composés a été réalisée par comparaison des spectres de masse avec ceux des bases de données citées dans la littérature (Adams, 2007). Les indices de rétention ont été calculés pour tous les constituants volatils parmi une série homologue de n-alcanes (Jennings and Shibamoto, 1982).

2.2.3.4. Indices physiologiques par analyses non destructives

Le multiplex (FORCE-A®, Orsay) est un instrument de mesure optique portable, et non destructif renseignant sur l'état physiologique du végétal en donnant un indice proportionnel à la présence des composés primaires et secondaires des végétaux. En effet, l'excitation des feuilles par les UV produit deux types de fluorescences distinctes: une fluorescence bleu vert de 400 à 630 nm et une fluorescence de la chlorophylle a dans le rouge et l'infra rouge de 600 à 800 nm. Les intensités relatives de ces deux types de fluorescence sont très sensibles aux propriétés intrinsèques des feuilles et aux facteurs environnementaux. Elles donnent ainsi des informations sur la teneur en chlorophylles liée au mécanisme de photosynthèse, et aussi sur l'accumulation des produits du métabolisme secondaire.

Pour cela, le multiplex utilise un détecteur de fluorescence multi-paramétrique qui peut être utilisé à la lumière du jour. Il possède trois sources de longueurs d'onde (LED): UV_A (375 nm), vert (530 nm), et rouge (630 nm) ainsi que trois filtres de détection synchronisés pour l'enregistrement de la fluorescence: fluorescence bleue-vert (447 nm), fluorescence rouge (665nm), et fluorescence du rouge lointain (735 nm). Afin d'apporter une lumière assez importante et homogène à l'échantillon, le multiplex possède 6 sources UV et trois matrices à LED de lumière verte et rouge dans un cercle. La combinaison de ces différents signaux de fluorescence (neuf signaux de fluorescence plus trois de réflectance, donne une possibilité de 66 rapports de fluorescence potentiellement utiles pour l'interprétation du contenu des plantes en différents phytométabolites (Tremblay et al., 2012). À partir des informations recueillies par chacun des capteurs, des indices et des ratios sont calculés pour s'affranchir de la

géométrie de l'échantillon. Ils donnent des informations sur les pigments et métabolites secondaires des couches superficielles des plantes comme les teneurs en chlorophylles, en flavonols, en anthocyanes et composés phénoliques, ou encore sur le statut azoté par un ratio chlorophylles/flavonols lié au ratio N/C (Gitelson et al., 1999; Meyer et al., 2003; Agati et al., 2005; Cartelat et al., 2005; Agati et al., 2007)

L'index de chlorophylle (SFR_R) est défini par le ratio de la fluorescence émise dans le rouge lointain et dans le rouge sous excitation rouge. Il est basé sur l'augmentation de la ré-absorption de la fluorescence de la chlorophylle a à ces longueurs d'onde les plus courtes lorsque la quantité de chlorophylle augmente.

L'indice de flavonoïdes (FLAV) est obtenu en calculant le logarithme du ratio de la fluorescence du rouge lointain sous excitation rouge et sous excitation UV.

L'absorbance liée à la présence d'anthocyanes est exprimée par l'indice d'anthocyane (ANTH) déterminé par le logarithme du ratio de la fluorescence chlorophyllienne après excitation par la lumière rouge et verte (Agati et al., 2008).

L'indice des phénols épidermiques (EPhen) est déduit par les mesures séquentielles de la fluorescence des chlorophylles sous excitation UV (375 nm) et lumière rouge (650 nm).

Lors de la mesure, l'échantillon est placé à 10 cm des sources de lumière grâce à un cache et la surface de mesure est constituée d'une ouverture circulaire de 8 cm de diamètre. L'appareil émet successivement un flash de chaque source d'excitation et l'émission de fluorescence associée est enregistrée au niveau de chaque détecteur. Une mesure est constituée d'une moyenne de la fluorescence obtenue à partir de 500 flashes émis en moins d'une seconde.

Chaque individu a été flashé 25 fois *in situ* et 5 fois en conditions contrôlées. Les flashes ont été réalisés tout autour de l'individu afin d'obtenir un résultat représentatif. Concernant les mesures des romarins cultivés en condition contrôlée, des caches noirs ont été utilisés, afin que les flashes ne prennent en compte que les parties végétales.

2.2.3.5. Exsudats racinaires

Mise en évidence des acides organiques exsudés par les racines.

A partir des disques de papiers récupérés au niveau des racines et sur lesquels les acides organiques potentiellement présents dans les exsudats ont été extraits (cf 2.1.4.4.), les acides

organiques ont été identifiés et quantifiés par chromatographie ionique à l'aide d'un système ICS-3000 HPLC (DIONEX), piloté par le logiciel Chroméléon® (version 6.80).

La séparation des acides organiques a été réalisée sur une colonne DIONEX IonPac AS11-HC (4 x 250 mm) couplée à une colonne de garde DIONEX AG11-HC (4 x 50 mm). La colonne et la pré-colonne contiennent des résines pelliculaires à base d'éthylvinylbenzène et de divinylbenzène réticulés et fonctionnalisés par une fonction alcool ammonium quaternaire. L'échantillon a été injecté automatiquement à l'aide d'une boucle d'injection de 25 µL. L'analyse a été effectuée à 30 °C, avec un débit fixé à 0,8 mL/min suivant le gradient d'élution décrit ci-après. Les conditions initiales étaient constituées de 1 mM de NaOH. Cette concentration a été augmentée jusqu'à atteindre 5 mM de NaOH à un temps de 12 min. Le gradient a ensuite été porté à 19 mM de NaOH entre 12 et 30 min puis à 40 mM de NaOH entre 30 et 40 min. La colonne était ensuite reconditionnée entre 40 et 48 min pour retrouver les conditions initiales (1 mM NaOH). Tous les éluants (NaOH et eau déminéralisée) ont été purgés à l'hélium et maintenus sous pression d'azote durant toute l'analyse.

La quantification a été réalisée par conductimétrie (DIONEX - CD25). Pour améliorer le rapport signal sur bruit de la mesure de conductivité, un système de suppression électrochimique à flux externe (ASRS 300 4 mm) a été ajouté à la chaîne d'analyse. En outre, une colonne de piégeage d'anions (IonPac ATC-3 4 mm) a été installée entre la pompe à gradient et la vanne d'injection, et a été utilisée pour extraire les contaminants anioniques potentiels de l'éluant.

Certains acides organiques étant difficilement séparables, l'identification des pics des chromatogrammes a été confirmée par des mesures en spectromètre de masse (THERMO MSQ-PLUS) installé en série du conductimètre. L'acquisition des spectres de masse a été réalisée en mode négatif par ionisation électrospray (ESI) opérant sous un flux d'azote de 6 l.min⁻¹, à une pression de 40 psi, une température de 500°C et un voltage du capillaire de 3,5 kV. Le potentiel de fragmentation a été fixé à 75 V et les acides organiques ont été mesurés en mode ion sélectif (SIM).

2.2.4. Suivis physiologiques

2.2.4.1. Biométrie

Lors de l'arrêt de l'expérimentation en rhizotrons, les parties aériennes et racinaires des romarins ont séparées, lavées et pesées avant et après séchage dans une étuve à 40 °C pendant 7 jours. La différence masse fraîche et sèche a permis de déterminer la teneur en eau des individus (exprimée en pourcentage) comme suit :

$$\text{masse fraîche-masse sèche} = \text{masse d'eau}$$

$$\frac{\text{masse d'eau}}{\text{masse fraîche}} \times 100 = \text{teneur en eau (\%)}$$

2.2.4.2. Mise en évidence des symbioses racinaires

La présence de champignons endomycorhiziens (CMA) ou d'endophytes septés foncés (DSE) dans les racines des plantes n'est pas détectable à l'œil nu. Une coloration est donc nécessaire. Les racines ont été préparées et colorées en adaptant au romarin la technique de Phillips et Hayman (1970).

Au préalable, les racines ont été nettoyées minutieusement afin d'éliminer les particules de sol qui pourraient nuire à la coloration. Elles ont, dans un premier temps, été rincées à l'eau courante, puis 3 fois à l'eau distillée. La coloration n'ayant pu être réalisée immédiatement dans tous les cas, les racines lavées ont été conservées à température ambiante dans de l'éthanol à 60%.

Avant coloration, une étape de décoloration est nécessaire. Les racines de romarin sont décolorées dans un bain de KOH à 20 % pendant 50 minutes à 90 °C, puis dans l'acide chlorhydrique à 2% pendant 5 minutes, après trois rinçages des racines à l'eau distillée pour éliminer KOH. Ensuite les racines sont mises dans une solution à 5% d'acide lactique pour acidifier le milieu. Puis la présence du champignon est mise en évidence par la coloration des structures fongiques (hyphes) au bleu trypan à 0,05 % dans du lactophénol (Merck). Les racines imprégnées de colorant ont été mises au bain marie à 80°C pendant 5 min. L'excès de colorant est éliminé et les racines sont mises à tremper dans le glycérol jusqu'à la préparation des lames.

La morphologie du mycélium des DSE a été observée à des grossissements de $\times 400$ avec un microscope optique. L'emplacement et la distribution des structures des DSE, y compris les hyphes cloisonnées mélanisées et les microsclérotés ont été détectés. Les structures des CMA telles que arbuscules, vésicules et hyphes ont été examinées. Les pourcentages de colonisation des CMA et DSE ont été estimés indépendamment par la méthode de (Zhang et al., 2010).

Sur chaque lame d'observation, 10 fragments de racines colorées ont été placés afin d'estimer la proportion de racines mycorhizées ou colonisées par les DSE sur le total des racines observées. Seule l'absence ou la présence d'endomycorhize ou de DSE a été évaluée. Un fragment est considéré comme colonisé lorsque la présence des structures caractéristiques des espèces fongiques impliquées est observée. Pour chaque individu de romarin, 10 lames ont été préparées, les résultats correspondent donc à l'examen de 100 fragments de racine par individu.

2.2.5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R. Les comparaisons de moyennes ont été effectuées avec le test non paramétrique de Wilcoxon avec un seuil de signification (p) de 0,05. Les corrélations linéaires significatives ont été déterminées avec le même seuil par le test de Pearson disponible à partir du progiciel Hmisc. Une régression non linéaire (modèle de Mitscherlich) disponible à partir des progiciels nls2 et nlme et a été utilisée pour modéliser les concentrations en ETMM dans les parties aériennes en fonction de la concentration dans le sol, après transformation logarithmique des données.

Concernant l'analyse statistique de la composition des huiles essentielles, une statistique de rang de Wilks Lambda, a été utilisée comme proposé par Nath et Pavur (1985) pour tester l'égalité des groupes de moyennes des différents paramètres mesurés à la fois sur les sols et les romarins (propriétés des sols, concentrations en ETMM dans les sols et différentes parties des plantes, bioaccumulation dans les parties aériennes et racinaires, ETMM dans les infusions, concentrations et composition chimique moyenne des huiles essentielles (fonction Wilks.test, progiciel rrcovrank)...). Les matrices de covariance hétérogènes ont été observées entre deux groupes, mais comme il a été cité par Finch (2005) : "Des recherches précédentes ont révélé que lorsque les groupes ne diffèrent pas en taille, l'effet de covariance hétérogène est très faible". Une Manova à deux facteurs, avec un test de permutation, a été réalisée (Manly, 1997) pour tester l'interaction et les effets simples sur les concentrations en ETMM

des différentes populations et dans les organes des romarins (feuilles et tiges). Des comparaisons post hoc de moyennes ont été effectuées avec le test non paramétrique de Wilcoxon, en utilisant la correction de Bonferroni.

Pour étudier les liens entre les concentrations en ETMM et la composition des huiles essentielles, une analyse de co-inertie (Dray et al., 2003) a été réalisée avec le progiciel Ade4. Cette analyse se compose de deux ACP séparées (une pour chaque groupe de paramètre). L'axe de la première composante principale ACP est ensuite tourné de telle sorte que la covariance entre les deux séries de valeurs projetées soit maximale, et ainsi de suite. En outre, le coefficient *RV* (Robert and Escoufier, 1976) a été utilisé pour mesurer la proximité entre les concentrations en ETMM et la matrice des données des compositions des huiles essentielles. Ce coefficient est une généralisation multivariée du coefficient de corrélation de Pearson au carré. Le test de permutation d'association entre les configurations au moyen du coefficient *RV* proposé par Heo et Gabriel (1998), disponible à partir du progiciel Ade4, a été réalisée avec $n = 10000$ permutations.

Références bibliographiques

Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. vol. 4th Ed. Allured Publishing, Carol Stream: IL, USA; 2007.

Agati G, Meyer S, Matteini P, Cerovic ZG. Assessment of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera* L.) berries using a noninvasive chlorophyll fluorescence method. J. Agric. Food Chem. 2007;55:1053–61.

Agati G, Pinelli P, Cortés Ebner S, Romani A, Cartelat A, Cerovic ZG. Nondestructive evaluation of anthocyanins in olive (*Olea europaea*) fruits by in situ chlorophyll fluorescence spectroscopy. J. Agric. Food Chem. 2005;53:1354–63.

Agati G, Traversi ML, Cerovic ZG. Chlorophyll Fluorescence Imaging for the Noninvasive Assessment of Anthocyanins in Whole Grape (*Vitis vinifera* L.) Bunches. Photochemistry and Photobiology 2008;84:1431–4.

Airmaraix. Campagne de mesures temporaire. Particules et métaux lourds sur le site de l'Escalette (Marseille). 2003.

Almela L, Sánchez-Muñoz B, Fernández-López JA, Roca MJ, Rabe V. Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. Journal of Chromatography A 2006;1120:221–9.

ANSM. Tisanes. Pharmacopée française. Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé; 2007.

Baize D. Eléments traces dans les sols - Fonds géochimiques, fonds pédogéochimiques naturels et teneurs agricoles habituelles - Définitions et utilités. Courrier de l'environnement de l'INRA 2009;57:63–72.

Bataillard P, Cambier P, Picot C. Short-term transformations of lead and cadmium compounds in soil after contamination. European Journal of Soil Science 2003;54:365–76.

Bates L, Waldren R, Teare I. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil 1973;39:205–7.

Blanc JJ. Les grottes du massif des Calanques (Marseilleveyre - Puget - Riou, France) : géologie, géomorphologie, sédimentologie 2012;6:161–200.

Cartelat A, Cerovic ZG, Goulas Y, Meyer S, Lelarge C, Prioul J-L, et al. Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). Field Crops Research 2005;91:35–49.

Chin L, Leung DWM, Taylor HH. Lead chelation to immobilised *Symphytum officinale* L. (comfrey) root tannins. Chemosphere 2009;76:711–5.

Ciesielski H, Sterckeman T. A comparison between three methods for the determination of cation exchange capacity and exchangeable cations in soils. Agronomie 1997;17:9–16.

Conway KE, Maness NE, Motes JE. Integration of biological and chemical controls for *Rhizoctonia* aerial blight and root of rosemary. Plant Disease 1997;81:795–8.

Dray S, Chessel D, Thioulouse J. Co-inertia analysis and the linking of ecological data tables. Ecology 2003;84:3078–89.

Duval L. Etude des conditions de validité du dosage céruléomolybdique de l'acide phosphorique. Conséquences pratiques. Chim. Anal. 1963;45:237–50.

El-Zohri MHA, Cabala R, Frank H. Quantification of phytochelatins in plants by reversed-phase HPLC-ESI-MS-MS. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2005;382:1871–6.

Feix I, Tremel-Schaub A. Contamination des sols - Transfert des sols vers les plantes. ADEME. ZDP Sciences; 2005.

Finch H. Comparison of the Performance of Nonparametric and Parametric MANOVA Test Statistics when Assumptions Are Violated. Methodology: European Journal of Research Methods for the Behavioral and Social Sciences 2005;1:27–38.

Garrabrants AC, Kosson DS. Use of a chelating agent to determine the metal availability for leaching from soils and wastes. Waste Management 2000;20:155–65.

GIP des Calanques. Avant projet pour la création du Parc National des Calanques : composantes du patrimoine naturel, culturel et paysager. 2008.

Gitelson AA, Buschmann C, Lichtenthaler HK. The Chlorophyll Fluorescence Ratio F735/F700 as an Accurate Measure of the Chlorophyll Content in Plants. *Remote Sensing of Environment* 1999;69:296–302.

Heo M, Gabriel KR. A permutation test of association between configurations by means of the rv coefficient. *Communications in Statistics - Simulation and Computation* 1998;27:843–56.

Jennings W, Shibamoto T. *Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography*. 465 Seiten. Academic Press, New York, London, Sydney, Toronto, San Francisco 1980. Preis: 39\$. *Food / Nahrung* 1982;26:830–830.

Joret G, Hebert J. Contribution à la détermination du besoin des sols en acide phosphorique. *Annal. Agron.* 1955;2:233–99.

Lejealle S, Evain S, Cerovic Z. Multiplex : A new diagnostic tool for management of nitrogen fertilization of turfgrass. Denver; presented at the 10th International Conference on Precision Agriculture; 2010.

MAEVA. Impact de la pollution de la friche industrielle de l'Escalette sur le compartiment vivant. Université de Provence, Université Paul Cézanne; 2008.

Maness NE. Production practice of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and Sage (*Salvia officinalis* L.). Oklahoma State University; 1981.

Manly BFJ. *Randomization, Bootstrap And Monte Carlo Methods in Biology*. Chapman & Hall/ CRC; 1997.

Mantzavinos D, Burrows DM., Willey R, Lo Biundo G, Zhang SF, Livingston AG, Metcalfe IS. Chemical treatment of an anionic surfactant wastewater: electrospray-ms studies of intermediates and effect on aerobic biodegradability. *Water Research* 2001;35:3337–44.

Médail F, Quezel P. Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean basin. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 1997;84:112–27.

Médail F, Verlaque R. Ecological characteristics and rarity of endemic plants from southeast France and Corsica: Implications for biodiversity conservation. *Biological Conservation* 1997;80:269–81.

Meers E, Samson R, Tack F, Ruttens A, Vandegehuchte M, Vangronsveld J, Verloo M. Phytoavailability assessment of heavy metals in soil by single extractions and accumulation by *Phaseolus vulgaris*. *Environ. Exp. Bot.* 2007;60:385–96.

Melo EEC, Nascimento Clistenes WA do, Accioly AM de A, Santos ACQ. Phytoextraction and fractionation of heavy metals in soil after multiple applications of natural chelants. *Sci. agric. (Piracicaba, Braz)* 2008;65:61–8.

Metson A. *Methods of chemical analysis for soil survey samples*. Dept. of Scientific and industrial research. Soil bureau bulletin 12. Wellington : D.S.I.R: New Zealand; 1956.

Meyer S, Cartelat A, Moya I, Cerovic ZG. UV-induced blue-green and far-red fluorescence along wheat leaves: a potential signature of leaf ageing. *J. Exp. Bot.* 2003;54:757–69.

- Molinier R. Etudes phytosociologiques et écologiques en Provence occidentale. Université de Paris, Faculté des sciences: Paris; 1935.
- Nath R, Pavur R. A new statistic in the one-way multivariate analysis of variance. *Comput. Stat. Data Anal.* 1985;2:297–315.
- Neumann G, George TS, Plassard C. Strategies and methods for studying the rhizosphere-the plant science toolbox. *Plant and Soil* 2009;321:431–56.
- Neumann G, Romheld V. Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant and Soil* 1999;211:121–30.
- Owen TC. Thiol detection, derivatization and tagging at micromole to nanomole levels using propiolates. *Bioorganic Chemistry* 2008;36:156–60.
- Palacio-Barco E. Développement d'une méthode alternative pour la caractérisation fonctionnelle par spectrofluorescence des composés organiques dissous dans les écosystèmes. Aix-Marseille Université: Marseille; 2010.
- Perez-Rama M, Vaamonde ET, Alonso JA. Capillary zone electrophoresis for analysis of phytochelatins and other thiol peptides in complex biological samples derivatized with monobromobimane. *Electrophoresis* 2005;26:610–20.
- Petitjean P, Henin O, Gruau G. Dosage du carbone organique dissous dans les eaux douces naturelles : intérêt, principe, mise en oeuvre et précautions opératoires. Rennes : Geosciences Rennes; 2004.
- Phillips J, Hayman D. Improved procedures for clearing roots and staining parasitics and arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 1970;55:158–&.
- Potesil D, Petrlova J, Adam V, Vacek J, Klejdus B, Zehnalek J, Trnkova L, Havel L, Kizek R. Simultaneous femtomole determination of cysteine, reduced and oxidized glutathione, and phytochelatin in maize (*Zea mays* L.) kernels using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A* 2005;1084:134–44.
- Quevauviller P. Operationally defined extraction procedures for soil and sediment analysis I. Standardization. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 1998;17:289–98.
- Quevauviller P, Lachica M, Barahona E, Rauret G, Ure A, Gomez A, Muntau H. Interlaboratory comparison of EDTA and DTPA procedures prior to certification of extractable trace elements in calcareous soil. *Science of The Total Environment* 1996;178:127–32.
- Robert P, Escoufier Y. A Unifying Tool for Linear Multivariate Statistical Methods: The RV-Coefficient. *Applied Statistics* 1976;25:257.
- Schwob I, Bessiere JM, Masotti W, Viano J. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. *Biochemical Systematics and Ecology* 2004;32:735–45.

Sutour S. Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthes de corse et de kumquats. Université de Corse; 2010.

Tang X-Y, Cui Y-S, Duan J, Tang L. Pilot study of temporal variations in lead bioaccessibility and chemical fractionation in some Chinese soils. *Journal of Hazardous Materials* 2008;160:29–36.

Testiati E. Contamination des sols par des éléments traces métalliques en zone méditerranéenne côtière : étude de leur mobilité et du transfert à la phytoécologie. Aix-Marseille Université; 2012.

Thomas G. Exchangeable cations. In: *Methods of soil analysis*. AL Page et al. eds. Agronomy 9. 1982. p. 154–7.

Tremblay N, Wang Z, Cerovic ZG. Sensing crop nitrogen status with fluorescence indicators. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 2012;32:451–64.

Vadas TM, Ahner BA. Extraction of Lead and Cadmium from Soils by Cysteine and Glutathione. *Journal of Environmental Quality* 2009;38:2245–52.

Vergnoux A. Impact des incendies et de leur répétition sur la matière organique et minérale des sols forestiers du Massif des Maures. Aix-Marseille Université: Marseille; 2009.

World Meteorological Organization. Météo France; 2012.

Xiong JB, Mahmood Q, Yue M. The potential of *Sedum alfredii* Hance for the biosorption of some metals from synthetic wastewater. *Desalination* 2011;267:154–9.

Yokoyama Y, Ozaki O, Sato H. Separation and determination of amino acids, creatinine, bioactive amines and nucleic acid bases by dual-mode gradient ion-pair chromatography. *Journal of Chromatography A* 1996;739:333–42.

Zacharis CK, Tzanavaras PD, Themelis DG. Ethyl-propiolate as a novel and promising analytical reagent for the derivatization of thiols: Study of the reaction under flow conditions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2009;50:384–91.

Zhang H-H, Tang M, Chen H, Zheng C-L, Niu Z-C. Effect of inoculation with AM fungi on lead uptake, translocation and stress alleviation of *Zea mays* L. seedlings planting in soil with increasing lead concentrations. *European Journal of Soil Biology* 2010;46:306–11.

Résultats et discussions

"Le travail de la pensée ressemble au forage d'un puits ; l'eau est trouble d'abord, puis elle se clarifie"

Proverbe chinois

Chapitre 3 :

**Contamination des sols par les ETMM,
transferts au romarin *in situ* et évaluation
des risques d'exposition humaine**

Dans cette première partie présentant les résultats et discussions des travaux de thèse, la caractérisation des sols du transect (G0 à G6) et de la référence (S3) est présentée et discutée, ainsi que les niveaux de contamination en ETMM et l'estimation de leur mobilité dans les sols. Ces résultats seront confrontés aux concentrations en ETMM mesurées dans les racines et les parties aériennes des romarins sur les différents sites, afin d'appréhender les phénomènes de transfert à la plante. Enfin, à partir de ces niveaux de contamination, une approche des risques d'expositions des riverains et usagers sera discutée.

3.1. Caractéristiques physico-chimiques des sols

Les caractéristiques physico-chimiques des sols influencent fortement la solubilisation des ETMM dans ces sols. Parmi ces paramètres, la granulométrie (tableau 3.1) joue un rôle important, puisque les argiles et limons présentent des capacités importantes pour la sorption des éléments traces métalliques. Les textures des sols étudiés ont été déterminées à partir d'un triangle des textures en considérant les pourcentages de leurs compositions granulométriques.

Ainsi, les sols de G0, G1 et G3 sont classés comme limoneux, ceux de G2 et G4 sont limoneux-fin (mais en limite de limono-argileux fin), ceux de G5 limono-argileux fin, ceux de G6 limono-argileux, et enfin ceux de S3 sont limono-sableux. Les sols G1 et S3 présentent des proportions d'argiles plus faibles que les autres, et S3 se distingue par sa forte fraction sableuse et sa faible fraction limoneuse.

D'autres paramètres ont également été analysés, il s'agit de la capacité d'échange cationique, ou CEC, de l'azote total Kjeldahl (NTK), du carbone total et du pH (tableau 3.2). Les CEC moyennes s'étendent de 14 à 42,4 cmol^+/kg , avec deux sites qui se démarquent par une CEC faible : G1 et S3. La CEC correspond à la quantité de charges positives portées par les cations, susceptibles d'être fixées par les charges négatives présentes sur certains éléments du sol (Kabata-Pendias, 2004). Une CEC faible signifie que le potentiel de rétention, ou sorption des ETMM sur les phases solides du sol est faible, et donc que potentiellement la quantité d'ETMM dans la phase aqueuse du sol soit plus importante, rendant ces derniers plus labiles et disponibles dans le sol. Mais les équilibres dynamiques des métaux dans le sol doivent être abordés en prenant en compte d'autres paramètres en plus de la CEC. Les deux sites G1 et S3 présentent un pourcentage en azote total significativement plus faible que les autres sites étudiés. Concernant le carbone

total, seul S3 possède des teneurs significativement inférieures à celles trouvées dans les sols des autres sites. Les valeurs de pH des sols sont comprises entre 7,8 et 8,1, ce qui est typique des zones calcaires (Marschner, 1998).

Tableau 3.1 : Granulométrie moyenne (\pm écart-type) en g/kg des sols des différents sites étudiés (n=5). De G0 à G6 ; points du transect, et S3 : référence.

Granulométrie (g/kg)*					
Sites	Argiles	Limons fins	Limons grossiers	Sables fins	Sables grossiers
G0	239 \pm 42a	303 \pm 17a	147 \pm 30a	116 \pm 31ac	194 \pm 23a
G1	165 \pm 29bc	248 \pm 62abd	174 \pm 30ab	284 \pm 84b	127 \pm 58ab
G2	258 \pm 17a	366 \pm 15c	182 \pm 11ab	70 \pm 9c	122 \pm 28b
G3	222 \pm 41ab	299 \pm 41ac	152 \pm 43abc	115 \pm 86abc	210 \pm 85ab
G4	267 \pm 18a	335 \pm 28ac	207 \pm 48b	74 \pm 10c	115 \pm 63ab
G5	292 \pm 38a	346 \pm 27bc	190 \pm 17ab	81 \pm 6ac	89 \pm 23b
G6	280 \pm 74a	198 \pm 40d	102 \pm 12c	110 \pm 18a	307 \pm 114ac
S3	142 \pm 56c	77 \pm 32e	34 \pm 12d	246 \pm 28b	499 \pm 80c

Les valeurs d'une même colonne suivies par une lettre identique ne sont pas significativement différentes (test Wilcoxon, $p < 0,05$)

Tableau 3.2 : Principales caractéristiques chimiques des sols (Capacité d'échange cationique, azote total Kjeldahl (en pourcentage), carbone total (en pourcentage), phosphore échangeable et pH). De G0 à G6 : points du transect, et S3 : référence

Caractéristiques physico-chimiques du sol*					
Sites	CEC (cmol ⁺ /kg)	N %	C %	P _{échangeable}	pH
G0	31,6 \pm 6,6ac	0,72 \pm 0,18a	9,6 \pm 5,7ab	0,057 \pm 0,014	7,9 \pm 0,2ab
G1	15,7 \pm 1,1bd	0,29 \pm 0,04bd	9,4 \pm 1,9a	0,014 \pm 0,041	8,1 \pm 0,08ab
G2	41,8 \pm 8,5c	0,55 \pm 0,10ac	12,6 \pm 3,1a	0,030 \pm 0,010	7,8 \pm 0,3a
G3	24,6 \pm 6,2acd	0,44 \pm 0,05c	11,1 \pm 1,5a	0,012 \pm 0,002	8,1 \pm 0,06b
G4	41,7 \pm 15,7ac	0,66 \pm 0,26ac	14,2 \pm 6,1a	0,013 \pm 0,006	7,9 \pm 0,1a
G5	42,4 \pm 13,9c	0,54 \pm 0,15ac	11,2 \pm 1,9a	0,013 \pm 0,006	7,9 \pm 0,1ab
G6	27,3 \pm 1,6a	0,43 \pm 0,13cd	9,8 \pm 2,9a	0,010 \pm 0,002	7,9 \pm 0,1a
S3	14,0 \pm 8,4d	0,28 \pm 0,09d	3,6 \pm 2,8b	0,013 \pm 0,005	8,1 \pm 0,1ab

*moyenne \pm écart-type (n=5). Les valeurs d'une même colonne suivies par une lettre identique ne sont pas significativement différentes (test Wilcoxon, $p < 0,05$)

La figure 3.1 présente l'analyse en composante principale (ACP) réalisée pour les 40 échantillons de sols et prenant en compte les caractéristiques des sols. Les deux premières composantes (Dim.1 et Dim.2) contribuent pour 71,8% de la variance totale. La première composante explique 43,6% de la variance totale, et on note des contributions positives de la CEC (>0,9), de argiles, limons, N, C (>0,7), et une contribution négative des sables et du pH (>-0,6). La deuxième composante explique 25,1% de la variance totale avec des contributions positives de K, Ca et Mg échangeables (>0,6). Cette ACP montre que la CEC est principalement liée à la présence d'argile et de limons, ce qui est tout à fait cohérent. Elle confirme également le rôle des paramètres granulométriques, de C et de N dans la discrimination des sols entre les sites.

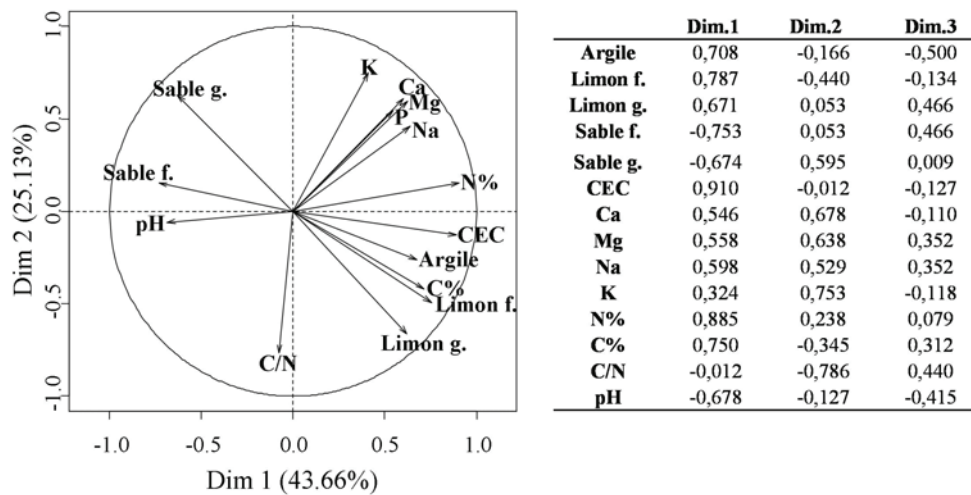


Figure 3.1 : Analyse en composante principale (ACP) des caractéristiques des sols du transect et de référence. A droite, tableau de contribution des variables aux dimensions de l'ACP.

Des relevés de terrain (communication personnelle, Catherine Keller 2013) effectués sur les sites du transect, ont révélé que les sols du transect sont caractérisés par la présence de colluvion. Ils ont été classés comme colluviosol pour G1 et G2, colluviosol polyphasé pour G3, calcosol-colluvial pour G4 et G5, et calcosol à colluvion de surface pour G6. Les horizons au niveau desquels les prélèvements ont été réalisés, ont été classés comme limoneux pour G1, limono-argilo-sableux pour G2, G3, G4 et G5, et limono-sablo-argileux pour G6.

Ces sols colluviaux, ou aussi nommés sols de bas de pente, sont formés à partir des matériaux arrachés par l'érosion des pentes situées au dessus. La situation et la pente des zones de prélèvements peuvent ainsi jouer un rôle dans les caractéristiques des sols. Les sites G2, G3, et

G5 sont situés sur des pentes importantes (>45%) (annexe 1), G0 et G4 sur des pentes moyennes entre 30 et 35%, et G1 et S3 sont situés sur des zones moins pentues entre 20 et 25% de pente. Ainsi G1 et S3, zones moins pentues sont certainement moins soumises aux effets de colluvions. S3 est situé au nord du transect, plus près du littoral sableux, et un dépôt éolien historique de sable de plage est suspecté dans cette zone. Ceci peut expliquer la fraction sableuse plus importante dans les sols de S3. La fraction moyenne majoritaire (50%) de sable grossier dans les sols de S3 peut également être à l'origine des faibles proportions de C, N, argiles et limons. En effet les phénomènes de drainage et lessivage sont plus importants dans ces sols, limitant les effets d'accumulation de matière organique et de particules fines en surface, et expliquant la CEC plus faible. Sur le site G1, la plus faible pente est certainement aussi à l'origine des plus faibles proportions de particules fines en surface, et en particulier d'argiles expliquant la plus faible CEC, car les phénomènes d'accumulation en surface liés aux effets de colluvion sont plus limités que sur les autres sites du transect.

Ainsi, les sites choisis peuvent présenter des différences significatives concernant certains paramètres physico-chimiques des sols, avec une distinction particulière pour G1 et S3. De plus, les résultats montrent de fortes variabilités pour ces paramètres sur un même site, mettant en évidence l'hétérogénéité des sols dans le massif des Calanques.

3.1.1. ETMM pseudo-totaux

Les résultats des concentrations en ETMM, et Fe et Mn, pseudo-totaux dans les sols montrent très clairement l'influence de l'ancien site industriel de l'Escalette sur la contamination diffuse dans le massif (figure 3.2). En effet, les sites les plus éloignés (G4, G5, G6 et S3) présentent, essentiellement pour As, Pb, Sb et Zn, des concentrations significativement inférieures aux sites plus proches de l'usine (G0, G1, G2 et G3). D'autre part, dans le cas des zones fortement contaminées une déviation standard relative pouvant dépasser 50% est observée entre les échantillons d'un même site, or, une forte hétérogénéité de la contamination est caractéristique des contaminations anthropiques et particulièrement des contaminations liées au dépôts atmosphériques des activités industrielles (Yaylali-Abanuz, 2011 ; Testiati et al., 2013).

Les concentrations des sols étudiés se situent dans une gamme de concentration étendue pour les éléments traces, puisque les concentrations minimales et maximales mesurées sont de [4 et 2738]; [21 et 19646]; [1,5 et 759]; [46 et 5843] mg/kg pour As, Pb, Sb et Zn respectivement (annexe 4). La multiplicité et la forte hétérogénéité de la contamination permettent difficilement de faire un classement des sites par niveau de contamination. Cependant, les concentrations en ETMM mesurées sur S3 peuvent être considérées proches du fond local de pollution pour le massif des Calanques, et ce, pour tous les éléments. En effet, bien qu'aucune information ne soit disponible sur la nature du fond géochimique des Calanques, la cartographie de la concentration de ces éléments sur une zone étendue autour de l'ancienne usine réalisée dans le cadre du projet Marséco, a permis d'estimer des valeurs pouvant faire office de fond géochimique local. Pour se faire, la zone prospectée a été divisée en 250 carrés de 250 m de côtés. Au centre de chaque carré, la couche supérieure de sol (0-15 cm) a été collectée dans un carré de 1 m². Les ETMM ont été analysés dans chaque échantillon de sol avec un spectromètre de fluorescence X portable (Niton XLT 792) et tous les résultats ont été compilés dans une base de donnée (cf paragraphe 1.5.3.3, figures 1.22 à 1.25). Ces analyses de terrain ont permis d'estimer le fond de contamination de la zone en considérant les 1^{ers} percentiles 0,05 (n=250) qui sont de <10, <10, 40, <50 et 53 mg/kg pour As, Cu, Pb, Sb et Zn respectivement. A la vue de ces résultats, il apparaît que le sol du site S3 est assez représentatif de la contamination de fond que l'on peut retrouver dans les Calanques, mettant en avant que les autres sites sont contaminés, même en Cu.

Des facteurs de contamination (FC) peuvent donc être calculés en utilisant comme concentrations de références en ETMM, les concentrations moyennes déterminées pour les sols du site S3. Ces FC correspondent aux ratios obtenus en divisant la concentration de chaque ETMM dans les échantillons de sol par la valeur de fond (concentration dans un sol non pollué, ici S3) (Rashed, 2010). Les FC calculés pour les sites du transect sont présentés dans le tableau 3.3. L'analyse de ces facteurs de contamination confirme la plus importante contamination pour G0, avec des FC supérieurs à 200 pour As et Pb, > 100 pour Sb et >40 pour Zn. Ces FC diminuent légèrement au niveau de G2 pour As, Pb, Sb et Zn ; puis leurs valeurs sont divisées par un facteur supérieur à 2 sur G1 et G3. Les sites G4 et G5 présentent des valeurs de FC similaires entre 10 et 15 pour As et Pb, et < 5 pour Sb et Zn. Enfin, G6 apparaît peu contaminé avec des FC < 2 pour Pb, Sb et Zn, mais presque 10 pour As. Il est à noter que les FC calculés pour Cu restent constantes pour les sites du transect (entre 4 et 5), sauf pour G6 où il est d'environ 2. Ces FC sont inférieurs à ceux

déterminés par Testiati (2012) sur le site même de l'usine au niveau des crassiers et le long de la cheminée rampante (FC entre 800 et 70 pour As, entre 1500 et 800 pour Pb et entre 2600 et 870 pour Sb). Cependant, pour Pb et As sur les sites G0, G1, G2 et G3, les FC sont supérieurs ou équivalents à ceux relevés dans l'usine au niveau des bâtiments en ruine et au sud de l'usine (zones certainement moins directement soumises aux dépôts de fumées).

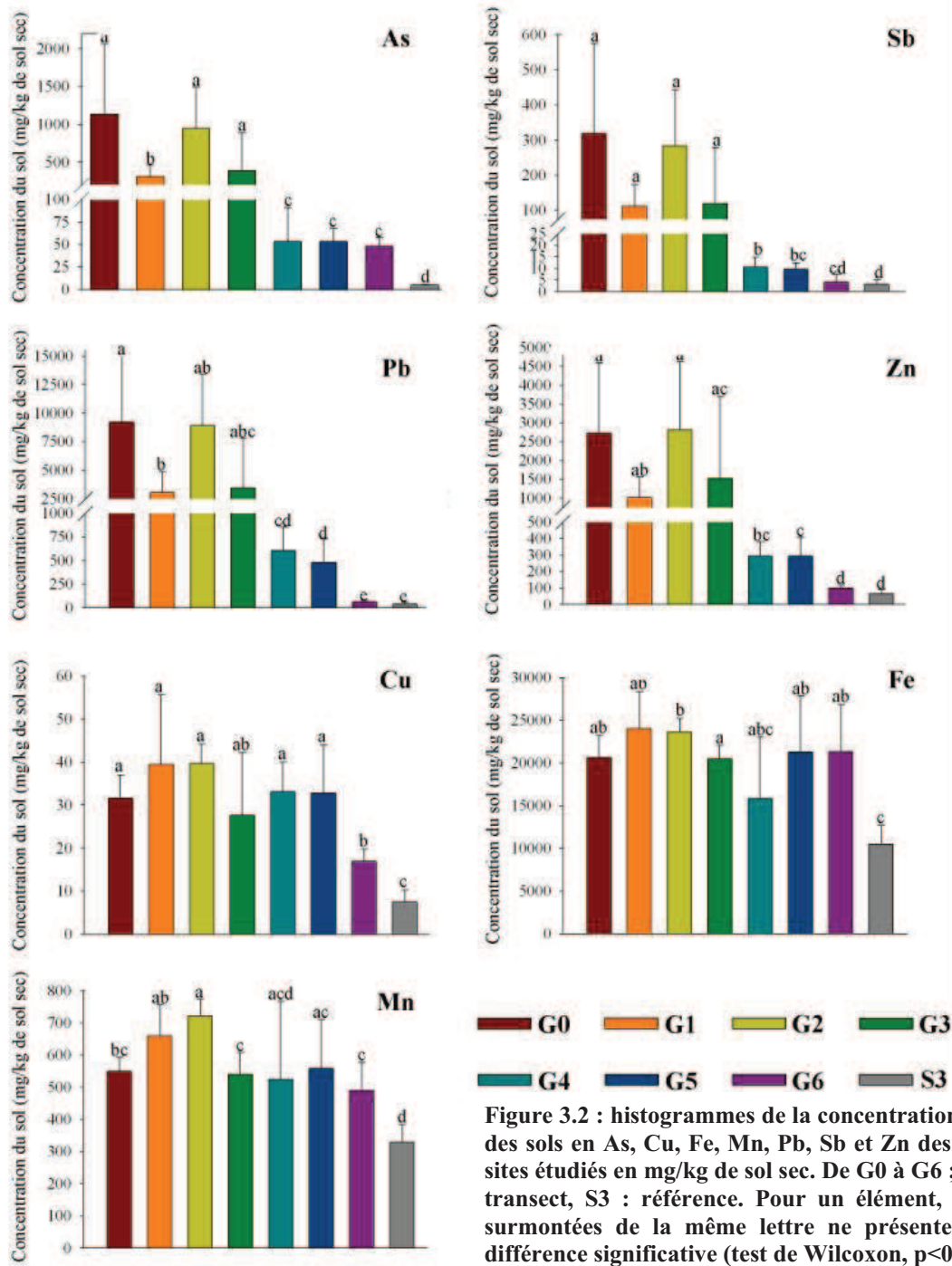


Figure 3.2 : histogrammes de la concentration moyenne des sols en As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn des différents sites étudiés en mg/kg de sol sec. De G0 à G6 ; points du transect, S3 : référence. Pour un élément, les barres surmontées de la même lettre ne présentent pas de différence significative (test de Wilcoxon, $p < 0,05$).

De plus, afin de déterminer le niveau de contamination global de chaque site en tenant compte de la contamination multiple en éléments traces et métalloïdes, l'indice de charge polluante (Pollution Load Index : PLI) a été calculé pour les sites du transect de G0 à G6, grâce à l'équation suivante : $\sqrt[n]{FC_{As} \times FC_{Cu} \times FC_{Pb} \times FC_{Sb} \times FC_{Zn}}$, où FC correspond aux facteurs de contamination et n au nombre d'éléments pris en compte, 5 dans le cas présent (Rashed, 2010).

Les résultats montrent une contamination globale décroissante de G0>G2>G3>G1>G4>G5>G6 avec respectivement des PLI de 61,4>60,6>29>26,4>6,3>5,9>2,3 (tableau 3.3). Ce classement (similaire à celui des FC pour As, Pb, Sb et Zn) met en évidence que, dans le cas des 4 sites les plus contaminés, la distance n'est pas le seul critère influençant le niveau de contamination. En effet, une contamination plus importante a été relevée sur le site G2 que sur le site G1, alors que ce dernier est plus proche de l'ancienne usine. Concernant G2, deux phénomènes peuvent être à l'origine de la contamination très élevée mesurée (proche de celle trouvée à la sortie de la cheminée). La localisation de ce site G2 dans un couloir emprunté par le vent dominant (mistral) constitué par le vallon de la Garenne, et au niveau du rétrécissement et de l'élévation assez brutale de ce vallon, ainsi que la présence d'une falaise en amont du site (cf figures 2.9 et 2.10), peuvent être à l'origine des concentrations en ETMM plus importantes. En effet, cette position géographique de G2 directement dans l'axe nord-ouest depuis G0 (sortie cheminée, cf figure 2.9), axe principal de mistral (cf figure 2.3) et les phénomènes de tourbillons atmosphériques potentiellement créés au niveau du rétrécissement et de l'élévation du vallon, sont certainement à l'origine d'importants dépôts atmosphériques historiques issus de la cheminée. De plus, la forte pente (45%) et la présence d'une falaise au dessus de la zone de prélèvement (annexe 1) peuvent également avoir eu une influence sur l'accumulation de particules contaminées au niveau des sols de G2, les phénomènes de colluvions étant importants et la présence de végétation dans la zone de prélèvement influençant la rétention des particules emportées par les eaux lors des épisodes pluvieux, dont celles contaminées en ETMM. En revanche le site G1, quoique plus proche de l'usine, se situe en milieu plus ouvert dans le vallon de la Garenne, sur une pente plus faible (20%) et non totalement directement dans l'axe nord-ouest depuis G0. Sur le site G3, encore plus éloigné de l'usine, situé au niveau du col de Moutte (cf figure 2.8), un des 5 échantillons de sol présente des concentrations en ETMM particulièrement élevées (facteur environ 7 fois plus élevé que la moyenne des 4 autres sols), et ce sol est à l'origine d'un PLI plus élevé que sur G1 puisqu'en ne le prenant pas en compte, le PLI de G3 tombe à 13,5. En effet, cet échantillon

présentait des concentrations en As, Pb, Sb et Zn de 1277; 11110; 399; 5396 mg/kg, respectivement. Ces concentrations sont équivalentes à celles retrouvées sur le site G0. Cette contamination très localisée est difficilement explicable (des prélèvements de contrôle ayant été réalisés), une autre source de contamination (plomb de balle de chasse par exemple) est exclue puisque As, Sb et Zn sont également plus concentrés. Mais la présence d'une petite falaise au dessus du romarin pourrait être à l'origine d'une accumulation de contaminants dans le sol de surface ou au niveau des racines, via les phénomènes de dépôts atmosphériques et de lessivages et de colluvions. Une fois encore, la position géographique du site G3 à la sortie du vallon de la Garenne au niveau du col de Moutte, et la pente de la zone de prélèvement (50%) peuvent expliquer la valeur de PLI importante de ce site. L'ampleur géographique et l'importance de la contamination diffuse est mise en évidence par ces résultats, d'autant plus que les PLI calculés sur G0 et G2 sont plus élevés que ceux trouvés sur certains des sites de l'ancienne usine (en dehors des crassiers et de la cheminée rampante) où des PLI de 44, 55 et 15 ont été calculés (Testiati, 2012). Pour les sites G4, G5 et G6, la diminution des valeurs des PLI semble reliée au facteur d'éloignement de l'Escalette.

Tableau 3.3 : facteurs de contamination moyens pour les métaux et métalloïdes sur les sites de G0 à G6 (points du transect) calculés en fonction de la concentration de S3 (site référence), et valeur du PLI (indice de charge polluante)

Sites	Facteurs de contamination par élément					PLI
	As	Cu	Pb	Sb	Zn	
G0	230,9	4,2	214,6	101,9	41,2	61,4
G1	62,4	5,2	70,6	35,9	15,4	26,4
G2	193,3	5,2	208,3	90,7	42,7	60,6
G3	79,4	3,7	80,3	38,2	23,1	29,0
G4	10,8	4,4	14,1	3,4	4,5	6,3
G5	10,8	4,3	11,2	3,1	4,4	5,9
G6	9,8	2,2	1,4	1,3	1,5	2,3

Toutes ces observations sont très probablement liées à la composition de la galène traitée dans l'ancienne usine, qui contenait de grandes quantités d'As, Pb, Sb et Zn (Palero-Fernandez and Martin-Izard, 2005). La nature de la galène exploitée et les techniques métallurgiques utilisées à l'Escalette, ont généré les pollutions historiques émises par cette ancienne usine (cf paragraphe

1.5.3.), et en particulier la présence d'As, de Pb et Sb volatilisés et/ou sorbés sur les particules et rejetés lors des étapes de réduction dans la cheminée rampante. Les concentrations de ces éléments dans les encroûtements prélevés au niveau des ruines de la cheminée, ont présenté des valeurs très importantes (Testiati, 2012) : > 120 000 mg/kg pour Pb, > 86 000 mg/kg pour As, autour de 2 000 mg/kg pour Sb, > 6 000 pour Zn, et autour de 180 mg/kg pour Cu (cf tableau 1.4). Concernant Cu, les plus faibles facteurs de contamination et valeurs de PLI, peuvent être expliqués par un rejet moins important de Cu par la cheminée de l'usine ou à son association à des particules plus fines, transportées sur de plus longues distances. Parmi les huit sites, seul S3, n'étant pas sous l'influence des vents dominants par rapport à l'Escalette, présente des concentrations en Cu significativement plus faibles que les autres (figure 3.2). Une variation du fond géochimique entre S3 et les autres sites pourrait également être envisagée puisque, comme vu précédemment, ce site présente des caractéristiques physico-chimiques assez différentes de celles des autres sites.

La contamination des sols autour de l'usine ne fait pas de doute, mais peu de valeurs indicatrices existent permettant d'estimer l'importance de cette contamination. Elle peut toutefois être comparée aux valeurs médianes des concentrations estimées dans les sols agricoles français (Baize et al., 2007), ainsi qu'à des seuils nationaux proposés pour les ETMM dans les sols en fonction de leurs utilisations, et enfin aux concentrations sans effets prévisibles pour l'environnement (PNEC) proposées par l'INERIS (tableau 3.4). Seules les valeurs concernant As, Cu, Pb et Zn sont présentées, car aucune valeur n'a été trouvée dans la littérature pour Sb. Les concentrations mesurées dans les sols de S3 sont en dessous des seuils nationaux considérés ici, mais sont supérieures aux PNEC et aux médianes des concentrations dans les sols agricoles français pour As, Pb et Zn. De plus, la forte contamination des sites proches de l'usine est une fois de plus mise en évidence, puisque pour As, Pb et Zn, toutes les concentrations mesurées sur les sols du transect sont supérieures aux valeurs médianes françaises, aux valeurs guides des pays considérés, ainsi qu'aux PNEC. Les ratios de concentration entre le site G0 et les PNEC sont supérieurs à 500, 700, 100 et 10 pour As, Pb, Zn et Cu, respectivement. Ces ratios par rapport aux PNEC sont encore supérieurs à 200, 300 et 50 concernant As, Pb, et Zn respectivement, pour les sols de G3.

Tableau 3.4 : Seuils de concentrations en ETMM dans les sols exprimé en mg/kg (sol sec), définis en Russie (pour un sol neutre i.e. pH> 5,5), en Hollande (valeur de référence), au Canada (pour les zones industrielles) et en Turquie ; valeurs des PNEC (Predictable Non Effect Concentration) et valeurs medianes dans les sols agricoles français.

Elements	Concentrations des éléments dans le sol en (mg/kg sol sec)					Sols agricoles français ⁽⁴⁾
	Russie ⁽¹⁾	Pays-Bas ⁽¹⁾	Canada ⁽¹⁾	Turkey ⁽²⁾	PNEC ⁽³⁾	
As	10	20	50	-	1,8	
Cu	-	-	-	140	2,7	13,8
Pb	-	-	-	300	12	25,6
Sb	-	-	-	-	-	
Zn	220	-	800	300	21	59

⁽¹⁾Komnitsas and Modis, 2006; ⁽²⁾Yenilmez et al., 2011; ⁽³⁾INERIS, 2010, 2005a & b, 2003;

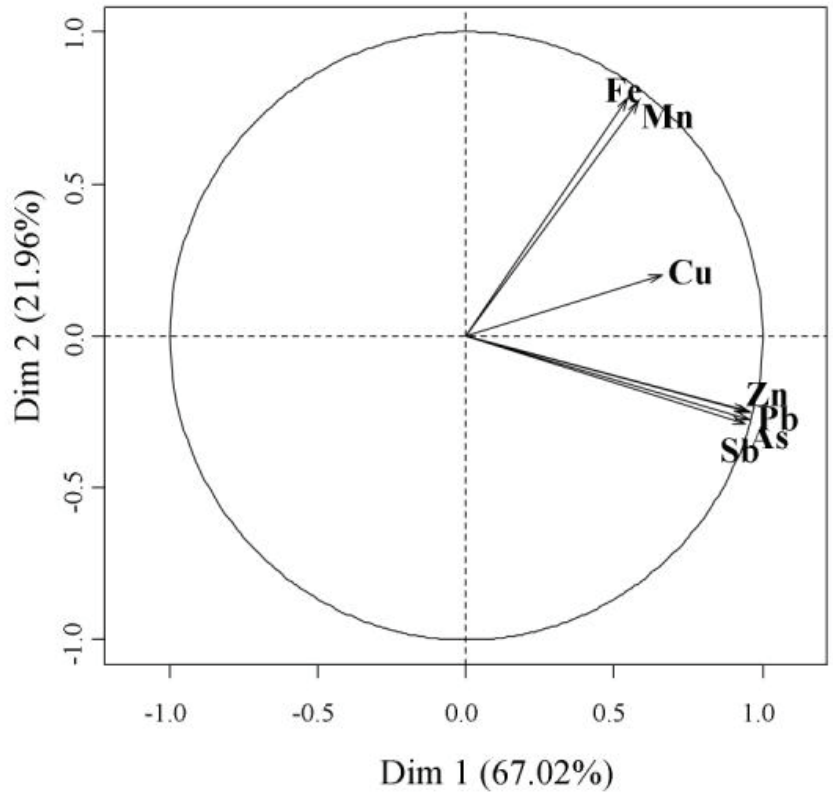
⁽⁴⁾Baize et al., 2007.

Une analyse en composante principale (figure 3.3), réalisée pour les 40 échantillons de sol et prenant en compte les concentration en métaux et métalloïdes, a permis de mettre en évidence deux grands groupes d'éléments dont les concentrations sont fortement corrélées (contribution des 2 premières composantes pour 89% de la variance totale) : d'une part As, Pb, Sb et Zn (formant l'axe 1, Dim.1 contribuant pour 67% à la variance totale) avec des contributions positives (>0,9) pour As, Pb, Sb et Zn ; et d'autre part Fe et Mn (formant l'axe 2, Dim.2 contribuant pour 22% à la variance totale) avec des contributions positives (>0,5) pour Fe et Mn. En effet, la contamination en As, Pb, Sb et Zn est très importante puisque les facteurs de concentrations mesurés pour les sites les plus contaminés (par rapport à S3) sont supérieurs à 200 pour As et Pb, supérieurs à 100 et 40 pour Sb et Zn respectivement, alors qu'ils sont de 5 pour Cu (tableau 3.3). Cette discrimination entre 2 groupes correspond à l'origine des éléments considérés : Fe et Mn sont d'origine naturelle (géo et pédogenèse), alors que As, Pb, Sb et Zn ont été montrés d'origine anthropique et reliés directement aux émissions des fumées de l'usine de l'Escalette. En considérant les ratios entre les valeurs moyennes des concentrations sur les sites du transect pour Pb, As, Sb et Zn, on obtient des valeurs autour de 10 pour Pb/As, de 3 pour Pb/Zn et de 30 pour Pb/Sb. Dans les encroûtements de cheminée, ces valeurs de ratios sont de 2 pour Pb/As, 18 pour Pb/Zn et de 60 pour Pb/Sb. De plus, dans les sols très contaminés le long de la cheminée en ruine (Testiati et al, 2013), ces ratios sont d'environ de 15 pour Pb/As, 3,5 pour Pb/Zn et 18 pour Pb/Sb. Sauf pour Pb/Sb, on retrouve les mêmes ordres de grandeurs de ces

ratios le long du transect, ce qui peut venir encore confirmer pour ces contaminants, une origine principale liée aux dépôts atmosphériques issus des émissions de la cheminée de l'ancienne usine de l'Escalette.

	Dim.1	Dim.2	Dim.3
As	0,942	-0,291	-0,141
Cu	0,660	0,202	0,722
Fe	0,545	0,545	-0,207
Mn	0,584	0,774	-0,095
Pb	0,959	-0,250	-0,060
Sb	0,954	-0,275	-0,100
Zn	0,949	-0,248	-0,025

Figure 3.3 : analyse en composante principale (ACP) de la contamination en ETMM pseudo totale des sols. A gauche : tableau de contribution des variables aux dimensions de l'ACP



3.1.2. ETMM mobilisables

Des extractions à l'EDTA permettant d'approcher les concentrations d'ETMM mobilisables, c'est-à-dire une partie des ETMM liés à la matière organique et de ceux adsorbés (échangeables) et/ou co-précipités avec les oxydes de fer et de manganèse, ont été réalisées (Baize et al., 2006; Quevauviller, 1998). Les concentrations d'ETMM mobilisables sur les sites contaminés restent élevées, avec des valeurs maximales mesurées de 522, 6360, 58 et 1038 $\mu\text{g/g}$ pour As, Pb, Sb et Zn respectivement (annexe 5). On observe, comme dans le cas des métaux pseudo-totaux, un gradient de concentrations mobilisables dans tous les sols du transect : $\text{Pb} > \text{Zn} > \text{As} > \text{Sb} > \text{Cu}$. Le tableau 3.5 montre les pourcentages d'ETMM mobilisables pour chaque site. Le plomb, le zinc, le cuivre et le manganèse présentent une fraction mobilisable importante puisqu'elle est, en moyenne, de 41,5 % (maximum 57 %) pour Pb et 19% (maximum 33%) pour Zn, de 24,5%

(maximum 36%) pour Cu et de 10% (maximum 13%) pour Mn et les fractions mobilisables de As, Sb et Fe sont plus faibles avec une moyenne de 5% (maximum 11%), de 2,4% (maximum de 4,2%), et de 0,48% (maximum 1%), respectivement. Pour tous les éléments, sauf As, la fraction mobilisable ne semble pas influencée par le niveau de contamination. En effet, l'arsenic présente une fraction mobilisable maximale de 11% sur G0, site très contaminé, et minimale de 0,2% sur G6, site peu contaminé. Pour cet élément la fraction mobilisable semble diminuer lorsque la contamination diminue, excepté sur le site S3 où elle est en moyenne de 9,8%, mais c'est le site de référence et l'écart type des résultats est important. Il est à noter que les valeurs de plus de 40 % de Pb mobilisable et plus de 20% de Zn mobilisable dans ces sols peuvent avoir des répercussions importantes au niveau des risques environnementaux. Ainsi, sur le site G3 situé au niveau du col de Moutte, ces pourcentages mobilisables peuvent représenter des concentrations jusqu'à plus de 4000 mg/kg de Pb et plus de 1000 mg/kg de Zn.

Tableau 3.5 : fraction mobilisable moyenne (\pm écart-type) des ETMM et métaux du sol (en pourcentage) pour As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn des sites étudiés. De G0 à G6 ; points du transect, S3 : référence.

Eléments	Sites							
	G0	G1	G2	G3	G4	G5	G6	S3
As	10,9 \pm 5,6	7,3 \pm 3,2	7,4 \pm 1,5	3,9 \pm 3,0	0,9 \pm 0,5	0,8 \pm 0,8	0,2 \pm 0,3	9,8 \pm 7,9
Cu	19,7 \pm 3,4	35,9 \pm 6,7	28,6 \pm 5,4	21,7 \pm 4,4	22,2 \pm 7,3	21,6 \pm 7,8	15,2 \pm 7,6	30,8 \pm 27,0
Fe	0,5 \pm 0,2	0,3 \pm 0,2	0,6 \pm 0,5	0,2 \pm 0,07	0,6 \pm 0,4	0,4 \pm 0,2	0,15 \pm 0,03	1,0 \pm 0,5
Mn	11,8 \pm 2,2	8,2 \pm 3,4	7,5 \pm 1,9	5,5 \pm 1,2	13,3 \pm 4,6	13,2 \pm 5,1	9,3 \pm 2,2	13,3 \pm 3,5
Pb	30,6 \pm 5,1	54,7 \pm 9,9	43,7 \pm 8,7	41,4 \pm 3,5	36,0 \pm 7,4	57,0 \pm 25,9	21,1 \pm 16,0	45,4 \pm 46,7
Sb	4,2 \pm 2,1	2,8 \pm 1,1	3,1 \pm 0,8	1,6 \pm 1,1	1,3 \pm 0,9	1,3 \pm 0,6	1,9 \pm 1,9	2,6 \pm 1,5
Zn	17,2 \pm 3,3	13,9 \pm 3,7	21,2 \pm 5,7	16,5 \pm 2,7	33,4 \pm 20,9	21,8 \pm 19,9	11,4 \pm 8,3	19,2 \pm 19,6

Cependant, la contamination étant très hétérogène, il est difficile de mettre en évidence des tendances. L'analyse par couple de données (ETMM pseudo total/ETMM mobilisable pour chaque sol) semble plus pertinente. La figure 3.4 montre la concentration en ETMM mobilisable du sol en fonction de la concentration pseudo-totale en ETMM (échelle logarithmique) pour As, Pb, Sb et Zn. La concentration en ETMM mobilisable est linéairement et très fortement corrélée à la concentration en ETMM pseudo totale avec un coefficient de corrélation ($p < 0,05$) supérieur à 0,9 pour As, Pb, Sb et Zn. Ainsi, lorsque la concentration en As, Cu, Pb, Sb et Zn pseudo-totale

augmente, leur concentration mobilisable augmente également.

Cependant, le potentiel à représenter les valeurs d'ETMM bio-disponibles par les extractions à l'EDTA est contesté. Des études ont mis en évidence que l'utilisation d'extractants moins forts permettait de mieux approcher ces valeurs (Chojnacka et al., 2005). Ainsi, des extractions au nitrate de calcium ont également été réalisées, afin de déterminer les fractions d'ETMM échangeables qui pourraient être une estimation plus proche des fractions de métaux phytodisponibles.

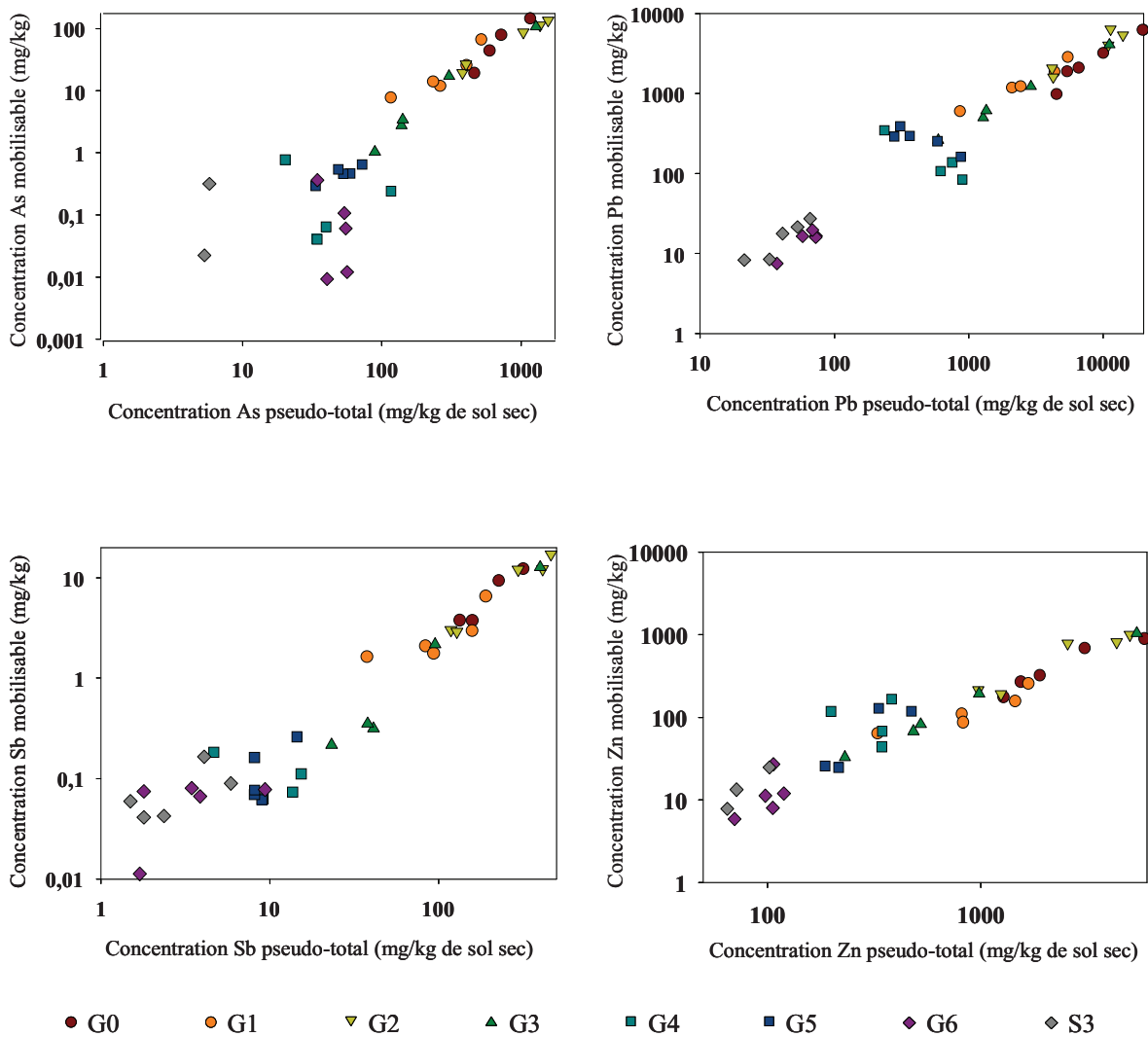


Figure 3.4 : concentrations des ETMM mobilisables du sol (mg/kg) en fonction de leur concentration pseudo-totale dans le sol (mg/kg). Echelle logarithmique. de G0 à G6 ; points du transect, S3 : référence.

3.1.3. ETMM échangeables

Les ETMM échangeables correspondent aux ions faiblement adsorbés sur la phase solide du sol et échangeables avec la solution du sol (Morel, 1997). Ils peuvent être extraits par des solutions faiblement acides et complexantes tel que le nitrate de calcium (Quevauviller, 1998).

Les résultats des concentrations en métaux et métalloïdes échangeables sont faibles puisque les valeurs maximales mesurées sont de 1,42; 0,27; 1,5; 6,27; 1,79; 2,75 et 10,8 µg/g pour As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn respectivement (annexe 6). Les pourcentages échangeables sont donc eux aussi faibles, puisqu'ils sont généralement inférieurs à 1%. Trois éléments présentent des fractions échangeables particulièrement basses : le fer, le plomb et l'arsenic (tableau 3.6). Les fractions échangeables moyennes semblent corrélées aux concentrations en ETMM pseudo-totales du sol. Une corrélation linéaire positive significative (test de Pearson, $p < 0,05$) de 0,66 a été mise en évidence entre la concentration échangeable et la concentration pseudo-totale pour As, Cu et Pb, de 0,84 pour Zn et de 0,93 pour Sb (figure 3.5, échelle logarithmique). Ainsi, plus la concentration pseudo-totale en ETMM augmente dans le sol, plus la concentration échangeable est importante. Ces corrélations sont moins importantes pour As, Cu, Pb et Zn que pour les ETMM mobilisables, ce qui peut être lié à un effet plus grand de la composition du sol dans ce cas.

Tableau 3.6 : fraction échangeable moyenne (\pm écart-type) du sol (en pourcentage) de As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn pour les différents sites étudiés (de G0 à G6 ; points du transect, S3 : référence)

Eléments	Sites							
	G0	G1	G2	G3	G4	G5	G6	S3
As	0,08 \pm 0,05	0,03 \pm 0,02	0,04 \pm 0,02	0,07 \pm 0,04	0,22 \pm 0,26	0,16 \pm 0,09	0,02 \pm 0,05	1,13 \pm 0,80
Cu	0,27 \pm 0,08	0,34 \pm 0,06	0,30 \pm 0,05	0,32 \pm 0,06	0,28 \pm 0,13	0,60 \pm 0,38	0,34 \pm 0,05	0,23 \pm 0,09
Fe	0,002 \pm 0,003	0,0001 \pm 0,0001	0,001 \pm 0,000	0,0002 \pm 0,0001	0,001 \pm 0,001	0,002 \pm 0,002	0,0003 \pm 0,0002	0,0001 \pm 0,0001
Mn	0,56 \pm 0,24	0,20 \pm 0,07	0,28 \pm 0,14	0,35 \pm 0,09	0,76 \pm 0,68	1,04 \pm 0,48	0,48 \pm 0,27	0,32 \pm 0,18
Pb	0,008 \pm 0,03	0,01 \pm 0,01	0,008 \pm 0,001	0,006 \pm 0,004	0,03 \pm 0,03	0,22 \pm 0,22	0,001 \pm 0,003	0,02 \pm 0,01
Sb	0,54 \pm 0,25	0,22 \pm 0,11	0,26 \pm 0,07	0,26 \pm 0,07	0,17 \pm 0,23	0,29 \pm 0,18	0,08 \pm 0,06	0,30 \pm 0,24
Zn	0,10 \pm 0,06	0,19 \pm 0,34	0,11 \pm 0,07	0,10 \pm 0,07	0,67 \pm 1,14	0,24 \pm 0,22	0,20 \pm 0,12	0,33 \pm 0,64

Ces faibles pourcentages de fractions échangeables et les corrélations moins importantes entre métaux échangeables et métaux pseudo-totaux, semblent traduire le faible rôle des surfaces minérales ou organiques dans la répartition des formes chimiques des ETMM dans les sols du transect.

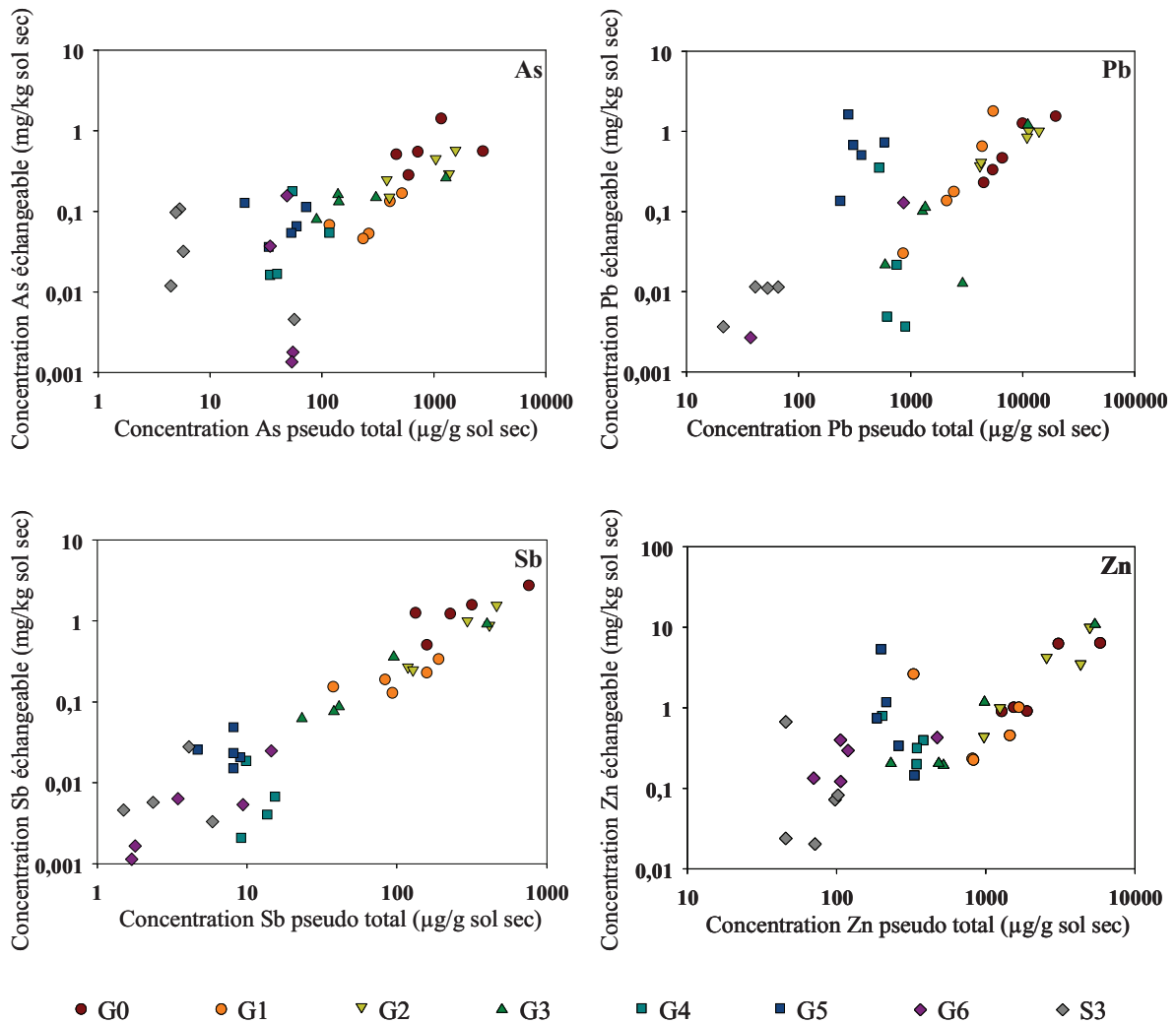


Figure 3.5 : Concentrations en ETMM échangeables du sol (mg/kg) en fonction de leur concentration pseudo-totale dans le sol (µg/g). Echelle logarithmique. De G0 à G6 ; points du transect, S3 : référence.

En général, certains paramètres physico-chimiques du sol peuvent être liés à la quantité échangeable et/ou mobilisable (Testiati, 2012). Ainsi des tests de corrélation ont été appliqués sur les différents paramètres des sols et les concentrations en ETMM (pseudo-totales, échangeables, mobilisables). Les coefficients de corrélation de Pearson ($p < 0,05$) entre les différents paramètres des sols du transect et de S3, sont présentés dans le tableau 3.7. Aucune corrélation significative n'est observée entre les concentrations métalliques et la CEC, exceptée une faible corrélation positive ($r = 0,36$) pour Pb mobilisable et Zn mobilisable. Aucune relation significative n'est

également relevée entre le carbone organique des sols et les concentrations métalliques. Le pH est quant à lui faiblement corrélé négativement avec la concentration pseudo-totales en ETMM (entre -0,41 et -0,53), avec Pb et Zn mobilisables, signifiant que l'augmentation du pH diminue la mobilité de Pb et Zn. Ceci est cohérent puisque la diminution du pH est connue pour favoriser la disponibilité des ETMM, par l'augmentation des ions H⁺ entrant en compétition avec les cations métalliques pour les charges négatives des colloïdes du sol (Greger, 2004). Pour les ETMM mobilisables, une corrélation négative a été mise en évidence, cette fois ci pour As, Pb, Sb et Zn signifiant qu'une augmentation du pH engendre une réduction de la fraction échangeable de ces éléments. Des corrélations significatives importantes et positives (>0,9) sont observées pour les métaux totaux entre eux, et également entre ces métaux pseudo-totaux et les fractions mobilisables (>0,8), et significatives positives avec celles échangeables (>0,6). De même, les corrélations sont significatives et positives pour les métaux échangeables entre eux (>0,6), mobilisables entre eux (>0,7), et entre fractions échangeables et mobilisables (>0,5).

Tableau 3.7 : Valeurs de corrélation (test de Pearson p<0,05) entre les paramètres physico-chimiques du sol (CEC, carbone organique, pH) et les concentrations pseudo-totales, échangeables et mobilisables de As, Pb, Sb et Zn, pour tous les sites étudiés.

		Caractéristiques sol			ETMM pseudo-totaux				ETMM échangeables				ETMM mobilisables				
		CEC	C	pH	As	Pb	Sb	Zn	As	Pb	Sb	Zn	As	Pb	Sb	Zn	
Caractéristiques du sol	CEC	1															
	C	0,72	1														
	pH	-0,55	-0,56	1													
ETMM pseudo-totaux	As	ns	ns	-0,43	1												
	Pb	ns	ns	-0,41	0,99	1											
	Sb	ns	ns	-0,41	1	0,99	1										
	Zn	ns	ns	-0,53	0,96	0,96	0,97	1									
ETMM échangeables	As	ns	ns	-0,43	0,66	0,69	0,65	0,61	1								
	Pb	0,36	ns	-0,46	0,66	0,67	0,66	0,65	0,59	1							
	Sb	ns	ns	-0,34	0,94	0,93	0,93	0,86	0,85	0,66	1						
	Zn	ns	ns	-0,7	0,73	0,73	0,74	0,84	0,64	0,61	0,71	1					
ETMM mobilisables	As	ns	ns	ns	0,93	0,87	0,91	0,81	0,56	0,6	0,89	0,59	1				
	Pb	ns	ns	-0,36	0,92	0,97	0,93	0,91	0,62	0,68	0,84	0,69	0,77	1			
	Sb	ns	ns	ns	0,93	0,88	0,91	0,82	0,53	0,58	0,89	0,58	1	0,79	1		
	Zn	0,36	ns	-0,58	0,91	0,93	0,92	0,97	0,64	0,64	0,81	0,86	0,73	0,92	0,73	1	

ns : corrélations non significatives

Ainsi, il apparaît que tout au long du transect les concentrations en As, Pb, Sb et Zn, ainsi que leurs formes chimiques dans les sols, sont significativement et positivement corrélées. Cette observation semble venir confirmer les hypothèses proposées précédemment, concernant une origine anthropique principale commune pour la contamination des sols du transect en ces 4 ETMM, qui est très certainement liée aux émissions atmosphériques de l'ancienne usine.

3.2. ETMM dans le romarin

3.2.1. ETMM, Fe et Mn dans les racines du romarin

La figure 3.6 montre les concentrations moyennes en As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn dans les racines des romarins prélevés sur les sites étudiés du transect et de S3. Les concentrations mesurées dans les racines sont comprises entre 0,9 et 85; 1,7 et 48; 104 et 3340; 2,6 et 108; 0,8 et 1983; 0,02 et 35 et entre 5,4 et 803 mg/kg de MS pour As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn respectivement (annexe 7). Les concentrations les plus élevées en ETMM sont retrouvées dans les individus provenant des sites contaminés (de G0 à G3). Les rapports $[\text{racine}]_{\text{transect}}$ et $[\text{racine}]_{\text{S3}}$ représentant en quelque sorte les facteurs de contamination dans les racines, sont du même ordre de grandeur que les facteurs de concentration dans les sols du transect puisqu'ils sont supérieurs à 100 pour As, Pb et Zn, de 20 pour Zn et inférieur à 5 pour Cu, Fe et Mn. Ces observations mettent en évidence la capacité d'accumulation des ETMM par les racines de romarin. Ainsi, les résultats montrent peu de différences significatives entre les sites concernant les éléments majeurs (Fe et Mn) et le cuivre, pour lequel les FC dans les sols sont inférieurs à 5 (tableau 3.3). Pour Fe, la faible variation de concentration pseudo-totale dans le sol est probablement à l'origine de cette observation. Cependant, la concentration de cet élément dans les racines de S3, site présentant la concentration pseudo-totale en Fe la plus faible, est significativement plus élevée que celle mesurée dans les racines de G4, G5 et G6. Ceci peut être expliqué du fait de la concentration en Fe mobilisable sur ce site est plus importante sur ce site (annexe 5). Les concentrations en Mn dans les racines, présentent quant à elles peu de différences significatives, avec malgré tout une tendance à être plus élevées sur les sites les plus contaminés (G0, G1 et G2). Concernant Cu, les concentrations racinaires sont en moyennes équivalentes sur tous les sites, excepté sur G2. Ceci est probablement lié à des concentrations moyennes de Cu mobilisable plus importante sur ce site.

Les capacités d'accumulation des ETMM par les romarins sont particulièrement mises en évidence pour As, Pb, Sb et Zn, éléments pour lesquels la contamination est importante. En effet, pour Pb, Sb et Zn une différence significative est mise en évidence entre les 4 sites très contaminés (G0, G1, G2 et G3) et les sites moins et peu contaminés (G4, G5, G6 et S3) (figure 3.6). Pour As, seules les concentrations moyennes des racines des 3 premiers sites (G0, G1 et G2) présentent des concentrations significativement supérieures à celles des 5 autres sites.

Le romarin semble capable d'accumuler les ETMM dans ses parties racinaires. Ce qui peut être intéressant pour stabiliser les ETMM dans le sol, ce qui sera abordé plus longuement dans le chapitre 5.

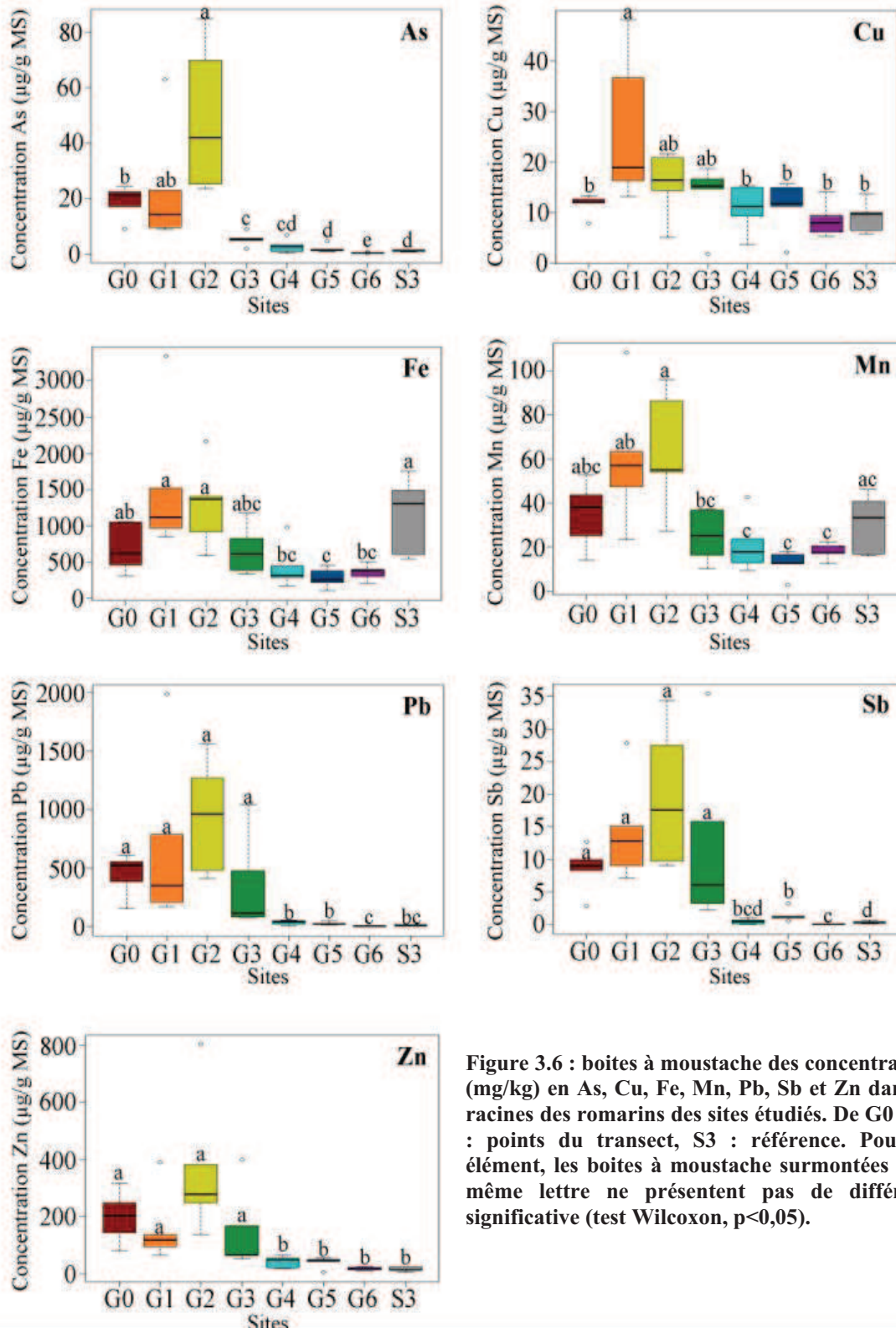


Figure 3.6 : boîtes à moustache des concentrations (mg/kg) en As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn dans les racines des romarins des sites étudiés. De G0 à G6 : points du transect, S3 : référence. Pour un élément, les boîtes à moustache surmontées de la même lettre ne présentent pas de différence significative (test Wilcoxon, $p < 0,05$).

Pour cela, la faible accumulation des ETMM dans les parties aériennes est préconisée. Or, certaines plantes sont capables d'accumuler de façon importante des ETMM dans leurs parties aériennes. Ces éléments pouvant être toxiques à forte, voire même à faible dose, il semble essentiel de connaître l'aptitude de l'espèce étudiée à transférer les ETMM des racines vers les parties aérienne, et cela d'autant plus dans le cas d'une espèce comestible.

3.2.2. ETMM, Fe et Mn dans les parties aériennes du romarin

Les concentrations en métaux et métalloïdes ont été mesurées dans les feuilles et les tiges de romarins (annexe 8). Les résultats sont présentés figure 3.7. Aucun individu ne présente de concentrations dans les feuilles ou les tiges supérieures à 1000 $\mu\text{g/g}$ de Cu ou Pb et à 10000 $\mu\text{g/g}$ de Zn, le romarin n'est donc pas une espèce hyperaccumulatrice au sens de Baker et Brooks (1989). En effet, les concentrations maximales mesurées dans les parties aériennes sont de 1,8; 21; 1266; 42; 22; 3,4 et 90 $\mu\text{g/g}$ de matière sèche (MS) pour As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn respectivement (annexe 7). Ces valeurs ne sont pas forcément atteintes sur les sites les plus contaminés (par exemple : 10,7 $\mu\text{g/g}$ de Pb dans les parties aériennes d'un individu de G3 et 7,7 dans celles d'un individu de G0 ; ou 0,67 $\mu\text{g/g}$ de As dans celles d'un individu de G1 et 0,39 pour un de G0) et des concentrations plus importantes peuvent être observées dans les feuilles ou les tiges seules. Par exemple, les dosages ont révélé des concentrations maximales de 27 $\mu\text{g/g}$ de Pb sont mesurées dans les tiges, et de 130 $\mu\text{g/g}$ de Zn dans les feuilles.

Les résultats montrent pour les éléments majeurs, c'est-à-dire Fe et Mn, que les concentrations moyennes dans les feuilles et dans les tiges sont peu différentes quel que soit le niveau de contamination du site. Cependant, une grande dispersion des résultats est observable dans les tiges des romarins de G0 et G1 (figure 3.7). Il est également observé une concentration moyenne plus importante dans les tiges que dans les feuilles pour Fe, et une concentration plus importante dans les feuilles que dans les tiges pour Mn, excepté sur G0. Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par El-Rjoob et al. (2008) concernant Fe, puisqu'ils ont mis en évidence des concentrations en Fe plus importantes dans les feuilles que dans les tiges de romarin. Pour ce qui est des oligo-éléments, il est observé pour Cu des concentrations moyennes dans les feuilles et les tiges proches, et surtout, des concentrations moyennes variant peu entre les romarins des différents sites. Concernant le Zn, les résultats montrent également une faible variation de la

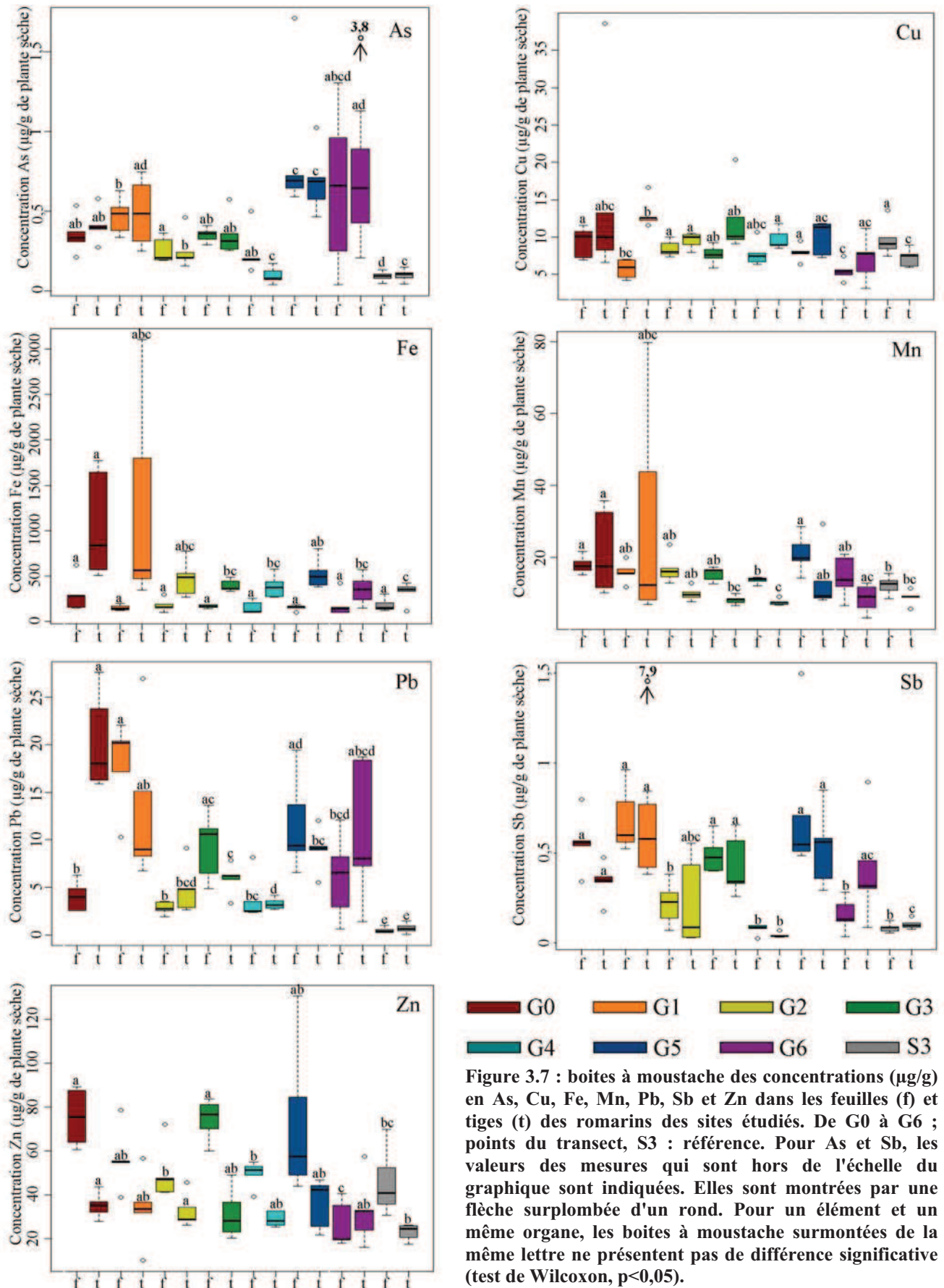
concentration moyenne dans les deux organes, quelque soit le site d'origine de l'individu. Ainsi, au niveau de la concentration dans les tiges, seul les concentrations obtenues sur S3 diffèrent significativement des concentrations mesurées sur les deux sites les plus contaminés : G0 et G2.

Le zinc semble préférentiellement accumulé dans les feuilles, puisque les moyennes de cet élément dans les feuilles des individus des différents sites sont toujours supérieures à celles mesurées dans les tiges, excepté pour G6.

Concernant les xénobiotiques (As, Pb, Sb), pour lesquels la contamination est la plus importante, les résultats ne permettent pas de mettre clairement en évidence une tendance à accumuler les ETMM dans les feuilles et les tiges. Pour As et Sb, aucun stockage préférentiel dans un organe plutôt qu'un autre n'est mis en évidence, puisque les concentrations moyennes dans les feuilles et les tiges sont généralement proches et ce, quelque soit le niveau de contamination du site. Alors que dans le cas de Pb, aucun patron de répartition préférentielle n'a pu être établi concernant la localisation de cet élément dans un organe plutôt qu'un autre (figure 3.7).

Les résultats sous cette forme ne permettent pas de faire de lien entre la concentration en ETMM du sol et leur concentration dans les parties aériennes. Ceci peut être lié en partie à la forte hétérogénéité de la contamination sur un même site, ainsi qu'à des capacités d'accumulations différentes entre individus de romarin qui peuvent varier en fonction de leur âge (non déterminé), de leur stade phénologique, etc.

Par conséquent, concernant As, Pb, Sb et Zn, qui sont les éléments dont les FC sont les plus importants dans les sols du transect, les données de couples "sol-plante" ont été utilisées (figure 3.8) afin de prendre en compte l'effet d'hétérogénéité du sol et de mettre en évidence un lien entre les valeurs transformées en log de la contamination du sol et l'accumulation de ces éléments dans les parties aériennes de l'individu ayant poussé sur ce sol. En observant les nuages de points obtenus entre les couples sol-plante, pour les 4 éléments une relation non linéaire est observée, ressemblant à une relation sol-plante de type accumulateur, selon Baker (1981) pour Pb, Sb et Zn (cf figure 1.14).



Concernant As, aucune relation non linéaire n'a pu être mise en évidence. Cependant, dans ce cas, la tendance viserait à une diminution de la variabilité de la concentration en As dans les parties aériennes avec l'augmentation de la concentration dans le sol. Pour les trois autres éléments, jusqu'à un certain niveau de contamination, les concentrations en ETMM du sol et les concentrations dans les parties aériennes semblent corrélées linéairement, puis au dessus de ce niveau de contamination, et pour une vaste gamme de concentration, la concentration en Pb, Sb et Zn dans les parties aériennes se stabilise et forme un plateau. Ce type de comportement a régulièrement été mis en évidence notamment pour Cd et Zn (Hamon et al., 1999; Dudka and Adriano, 1997; Green, 2003). Les concentrations en Pb, Sb et Zn dans les parties aériennes de romarin ont pu être modélisées par l'équation de Mitscherlich (corrélations significatives, $p < 0,001$), comme cela a déjà été établi par Azizian et al. (2013, 2011) d'après l'équation du plateau de Mitscherlich proposée par Logan and Chaney, (1987) de telle sorte que :

$$y = a + b(1 - e^{-u})$$

où, $y = \log$ (concentration en ETMM dans les parties aériennes ($\mu\text{g/g}$)), $x = \log$ (concentration en ETMM du sol ($\mu\text{g/g}$)), a = l'intersection du modèle avec y , c'est-à-dire la concentration de fond en ETMM dans les tissus de la plante, b = asymptote (plateau) de la concentration en ETMM dans les parties aériennes, u = pente de la droite dans la région entre l'intersection avec l'axe y et l'asymptote, avec $u = (x - a) / b$ pour Pb et $u = (x - a)$ pour Sb et Zn.

Les valeurs de l'asymptote correspondant au plateau de concentration de Pb, Sb et Zn dans les parties aériennes de romarin ont été calculées à partir des données de b (en \log de la concentration) obtenues statistiquement. Ces valeurs sont de $7,9 \mu\text{g/g}$, $0,37 \mu\text{g/g}$ et $51,3 \mu\text{g/g}$ pour Pb, Sb et Zn respectivement. Le plateau peut être le fait de mécanismes ayant lieu dans le sol, limitant la présence des ETMM dans la solution du sol, ou à des mécanismes physiologiques mis en place par la plante (Hamon et al., 1999). Dans le cas présent, le plateau observé est très probablement lié à un mécanisme mis en place par la plante et non à une diminution de la concentration en ETMM dans la solution du sol, puisque les fractions mobilisables et échangeables sont corrélées linéairement à la concentration pseudo-totale du sol (figures 3.4 et 3.5). Il peut ainsi s'agir de mécanismes physiologiques limitant la translocation, ou de l'évitement par les racines des zones de sol plus contaminées.

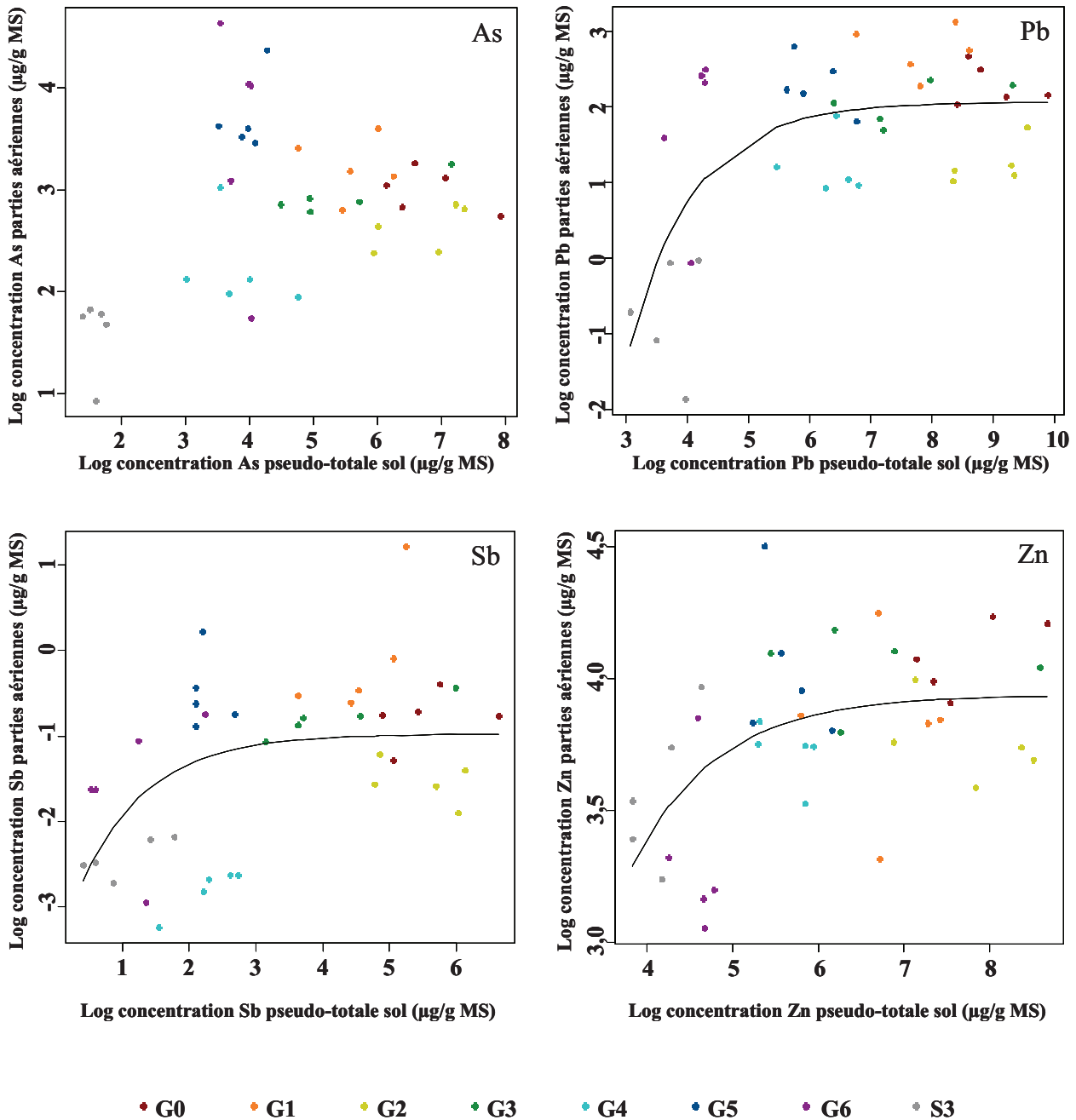


Figure 3.8 : concentrations log-transformées en As, Pb, Sb et Zn ($\mu\text{g/g}$) dans les parties aériennes en fonction des concentrations log-transformées de sol pseudo-totale ($\mu\text{g/g}$). De G0 à G6 ; points du transect, S3 : référence

En comparant ces résultats avec ceux obtenus par Testiati et al. (2013) dans les parties aériennes de romarins prélevées sur le site de l'ancienne usine de l'Escalette, il apparaît que le romarin est capable d'accumuler des concentrations de Pb, par exemple, beaucoup plus importantes dans ses parties aériennes. En effet, des concentrations dans les parties aériennes de romarin allant de 32 à 153 mg/kg ont été mis en évidence pour des concentrations pseudo-totales de Pb dans le sol

comprises entre 1640 et 24400 mg/kg et entre 429 et 5530 mg/kg pour la fraction mobilisable du Pb. Dans les sols étudiés du transect, la valeur maximale de concentration de Pb pseudo-totale est de 19600 mg/kg (G0), les valeurs maximales suivantes étant situées autour de 10000 mg/kg (sur les sites de G1 à G3). Un changement de comportement de la plante, passant de plante accumulatrice à plante excluante, selon Baker (1981), pourrait expliquer les concentrations importantes trouvées par Testiati et al. (2013). En effet, les importants niveaux de contamination du sol mesurés sur le site même de l'Escalette (de 11000 à 60000 mg/kg de Pb dans la zone des crassiers où ont été prélevés les romarins présentant des concentrations entre 130 et 150 mg/kg dans les parties aériennes), pourraient être à l'origine d'un dépassement du seuil de contamination du sol, au-delà duquel les mécanismes de contrôle de la translocation sont rompus, ne restreignant plus le transport des ETMM vers les parties aériennes (Baker, 1981). Cependant, la concentration la plus élevée dans les parties aérienne (153 mg/kg) correspond à un individu associé à un sol présentant une concentration pseudo-totale en Pb de 1850 mg/kg (Testiati, 2012) équivalent au niveau de contamination mesuré sur G4, où les concentrations dans les parties aériennes ne sont comprises qu'entre 5,4 et 10,6 mg/kg. De plus, les concentrations en ETMM mobilisables présentées par Testiati (2012) sont comprises dans les mêmes gammes de concentrations que celles mesurées dans cette étude. Ainsi, un autre mécanisme semble être impliqué dans le phénomène de plateau observé. Il pourrait s'agir d'évitement de la contamination par les racines, comme cela a été mis en évidence pour *Zea mays L.* pour Cd, Cu et Zn (Logan et al., 1997). Cette explication est d'autant plus envisageable que le romarin est une espèce possédant un réseau racinaire dense et pouvant aller en profondeur et que la contamination des sites étudiés est essentiellement superficielle. En effet, des analyses des concentrations en ETMM dans les différents horizons des sols de G1 à G6 ont été réalisées dans le cadre du projet Marséco (résultats de C. Keller non publiés). Elles mettent en évidence des concentrations en ETMM décroissantes avec la profondeur. Toutefois, ce type d'analyse n'a pas été réalisé sur les sols étudiés par Testiati et al. (2013), ne permettant pas de mettre en évidence leur contamination en profondeur et donc de valider cette hypothèse.

Les facteurs de bioconcentration (BCFs) dans les parties aériennes ont également été calculés. Il s'agit du rapport entre la concentration dans les parties aérienne et la concentration dans le sol ($[M_{\text{partie aérienne}}]/[M_{\text{sol pseudo-totale}}]$). Ainsi, des valeurs de BCFs supérieurs à 1 signifient que la plante est capable d'accumuler, dans ses parties aériennes des concentrations au moins équivalentes à

celles retrouvées dans le sol. Généralement, les plantes présentant des BCFs supérieurs à 1 sont dites hyperaccumulatrices, puisqu'elles sont capables d'absorber et de transloquer activement les ETMM vers les parties aériennes, mais les plantes tolérantes ont tendance à restreindre la translocation des ETMM des racines vers les parties aériennes (Fitz and Wenzel, 2002). Le tableau 3.8 présente les valeurs de BCFs moyens calculés pour As, Pb, Sb et Zn sur tous les sites. Les valeurs sont largement inférieures à 1 pour tous les éléments et tous les sites. Les individus des sites les plus contaminés (G0 et G2) présentent les BCFs les plus faibles, et ce pour les 4 éléments présentés. Le zinc est l'élément dont les valeurs de BCF sont les plus importantes, avec des BCFs moyens allant de 0,028 pour G0 à 0,58 pour S3. Ces résultats permettent de confirmer le fait que le romarin n'est pas une espèce hyperaccumulatrice.

Tableau 3.8 : valeurs des facteurs de bioconcentration moyens (\pm écart-type) des parties aériennes de romarin, ($[M_{parties\ aériennes}]/[M_{sol\ pseudo-total}]$) pour As, Pb, Sb et Zn sur les sites étudiés. De G0 à G6 ; points du transect, S3 : référence)

Sites	Facteur de bioconcentration par élément			
	As	Pb	Sb	Zn
G0	0,0005 \pm 0,0003	0,0015 \pm 0,0009	0,0020 \pm 0,0011	0,0283 \pm 0,0131
G1	0,0021 \pm 0,0016	0,0082 \pm 0,0081	0,0105 \pm 0,0058	0,0649 \pm 0,0509
G2	0,0004 \pm 0,0002	0,0005 \pm 0,0002	0,0011 \pm 0,0009	0,0239 \pm 0,0184
G3	0,0019 \pm 0,0012	0,0054 \pm 0,0046	0,0087 \pm 0,0053	0,1111 \pm 0,0954
G4	0,0051 \pm 0,0040	0,0073 \pm 0,0049	0,0064 \pm 0,0014	0,1552 \pm 0,0618
G5	0,0152 \pm 0,0048	0,0279 \pm 0,0173	0,0737 \pm 0,0404	0,2307 \pm 0,1221
G6	0,0209 \pm 0,0209	0,1237 \pm 0,0617	0,0781 \pm 0,0443	0,3008 \pm 0,1293
S3	0,0198 \pm 0,0070	0,0148 \pm 0,0086	0,0349 \pm 0,0148	0,5809 \pm 0,1357

La tolérance du romarin aux ETMM, présent sur tous les sites étudiés, même les plus contaminés, et qui est également présent sur des sols extrêmement contaminés dans l'enceinte même de l'ancienne usine de l'Escalette, ne fait pas de doute. L'étude de sa capacité d'accumulation dans les parties aériennes montre un comportement de type "accumulateur" selon Baker (1981). Cependant, les résultats mettent en évidence que le romarin n'est pas une espèce hyperaccumulatrice puisque les concentrations accumulées dans les parties aériennes sont très inférieures à celles définissant les hyperaccumulateurs, et que les facteurs de bioconcentrations

déterminés dans ses parties aériennes sont très faibles. Son utilisation pour un processus de phytoextraction n'est donc pas envisageable. S'agissant d'une plante comestible, fréquemment ramassée dans les Calanques, cette observation est rassurante pour les usagers. Toutefois, des concentrations de plus de 20 µg/g de Pb ont été mesurées dans les parties aériennes. Une étude plus approfondie, ayant pour but d'estimer les risques d'expositions des populations a donc été réalisée.

3.3. Evaluation des risques d'exposition des riverains et usagers

Le romarin est une espèce comestible, dont les parties aériennes, et particulièrement les feuilles, sont prisées à la fois en temps qu'herbe aromatique et qu'herbe médicinale. En effet, de part ces propriétés odorantes, le romarin fait partie du mélange d'herbes formant les herbes de Provence, largement utilisé comme condiment. Mais il possède également des propriétés antioxydantes importantes, lui procurant de nombreux intérêts en phytothérapie. Pour cela, il peut être utilisé soit en usage externe, soit par ingestion sous forme de poudre séchée, d'huile essentielle, mais également de décoction ou d'infusion (Mességué, 1992). Ainsi, le romarin est une espèce qui peut être cueillie et consommée par les populations locales dans le massif des Calanques. Il est donc important d'estimer le risque lié à la consommation de romarins aux alentours de l'ancienne usine de l'Escalette. Pour cela, les concentrations des feuilles, mesurées précédemment seront comparées aux réglementations en vigueur (tableau 3.9). Les résultats présentés ci-dessous ont fait l'objet d'une publication acceptée dans Science of the Total Environment en 2013 (annexe 9).

L'Union Européenne ne propose pas de valeurs maximales d'ETMM pour les herbes aromatiques et les épices. Cependant, une législation existe concernant les teneurs en arsenic et plomb dans les herbes médicinales

Les valeurs trouvées dans les feuilles de romarin des différents sites sont en dessous de ces valeurs réglementaires pour As. Concernant Pb, les concentrations moyennes dans les feuilles des individus de G1, G3, G5 et G6 dépassent les valeurs réglementaires pour les plantes médicinales, avec une valeur maximale mesurée dans les feuilles de 22µg/g sur G1. Des valeurs supérieures à 5 µg/g dans les feuilles ont également été mises en évidence sur quelques individus des autres sites : un individu sur G0 (6,3 µg/g) et un individu sur G4 (8,1 µg/g). Dans tous les cas, sauf S3,

les valeurs sont proches de la limite préconisée. Ainsi, les résultats montrent que les romarins situés autour de l'Escalette ne respectent pas les limites de concentration en Pb proposées par la réglementation concernant les herbes médicinales. Cependant, il se trouve que les feuilles des romarins des sites les plus contaminés (G0 et G2), contiennent des valeurs moyennes de Pb inférieures à celles mesurées sur les sites moins contaminés comme G1 et G5. La récolte de romarin n'est donc pas conseillée sur une zone étendue autour de l'ancienne usine.

Tableau 3.9 : concentrations moyennes (\pm écart-type) en As et Pb ($\mu\text{g/g}$) dans les feuilles des différents sites (de G0 à G6 ; points du transect, S3 : référence), comparé aux valeurs réglementaires concernant les herbes médicinales.

Source	Concentrations moyennes par élément ($\mu\text{g/g}$)	
	As	Pb
Site G0	0,35 \pm 0,12	4,1 \pm 1,6
Site G1	0,47 \pm 0,012	18,0 \pm 4,7
Site G2	0,26 \pm 0,08	2,8 \pm 0,7
Site G3	0,35 \pm 0,05	9,4 \pm 3,6
Site G4	0,25 \pm 0,15	3,8 \pm 2,5
Site G5	0,87 \pm 0,47	11,6 \pm 5,1
Site G6	0,64 \pm 0,51	6,1 \pm 4,5
Site S3	0,09 \pm 0,03	0,5 \pm 0,3
Valeurs réglementaires pour les plantes médicinales *	5	5

*Kosalec et al., 2009

Les romarins peuvent également être consommés sous forme d'infusion des sommités fleuries. Des infusions ont donc été réalisées à partir de romarins des sites G0 (sols les plus contaminés) et S3 (sols référence). Les résultats obtenus ont été comparés aux recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et de l'organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) (tableau 3.10). Les résultats des concentrations en ETMM dans les infusions, montrent que le transfert des ETMM durant le processus d'infusion est limité. Cependant, il y a significativement plus de As et Sb dans les infusions obtenues avec les romarins du site G0 qu'avec ceux du site S3. Au contraire, la concentration de Cu dans les tisanes est significativement plus élevée dans celles obtenues avec les romarins du site S3 (97 $\mu\text{g/L}$ contre

27 µg/l pour celles de G0), alors que la concentration moyenne dans les feuilles des romarins de S3 et G0 n'est pas significativement différente (9,7 et 8,5 µg/g respectivement).

Tableau 3.10 : concentrations (en µg/L) moyennes (±écart-type) en As, Cu, Pb, Sb et Zn dans les infusions de romarins de G0 et S3, et valeurs réglementaires concernant les eaux de boisson. Pour un même colonne, les valeurs suivies de la même lettre ne présentent pas de différence significative (test de Wilcoxon, p<0,05)

Source	Eléments (µg/L)				
	As	Cu	Pb	Sb	Zn
Site G0	2,7±1,1 a	27±7 a	3,7±1,5 a	0,9±0,3 a	23±10 a
Site S3	0,35±0,06 b	97 ±23 b	1,1±0,3 a	0,42±0,06 b	28±6 a
Réglementation					
eaux de boisson	10	2000	10	5	-
FAO/WHO*					

*FAO/WHO Food Standards Programme, 2008; Conseil de l'Union Européenne, 1998

Le calcul du ratio de transfert des ETMM (en pourcentage) dans les infusions met en évidence que l'efficacité d'extraction est élément-dépendante et, dans la plupart des cas, également dépendante de la concentration dans les feuilles (tableau 3.11). Ainsi excepté pour As, dont le ratio de transfert est proche de 12 dans les deux cas, le pourcentage d'éléments libérés est significativement différent entre les deux sites. En effet, les pourcentages de transfert qui sont de 6,6 ; 2,0 ; 3,4 et 0,64 pour les infusions de G0, sont de 19,4 ; 5,5 ; 10,8 et 2,5 pour celles de S3, pour Cu, Pb, Sb et Zn respectivement. Pour ces éléments, excepté le cuivre, le ratio de transfert dans les infusions est plus important quand la contamination des feuilles est moindre.

La concentration en ETMM dans les infusions obtenues à partir des feuilles de romarins d'un site très contaminé et d'un site non contaminé, est inférieure à la limite autorisée par le Codex Alimentarius concernant les eaux de boissons (FAO/WHO, 2008), et ceci pour les 4 éléments considérés (pas de valeur pour Zn). Néanmoins, la spéciation des ETMM dans les infusions est à prendre en compte, puisque leur toxicité et leur biodisponibilité en est largement dépendante, particulièrement pour As (Crecelius, 1977), Pb (Oomen et al., 2003) et Sb (Sundar and Chakravarty, 2010). Une précédente étude (Arpadjan et al., 2008) a montré que dans les infusions As est principalement associé à des bio-macromolécules (de 72 à 98%). De même, la majeure partie du plomb a été estimée être liée sous forme de complexes stables. Il est supposé que les ligands organiques présents dans les infusions sont en grande partie des composés

polyphénoliques (Toda, 2011). Mais comme ce sont des espèces chimiques peu absorbables (Manach et al., 2004), il est probable que l'arsenic et le plomb présents dans les infusions ne soient quasiment pas biodisponibles et donc présentent un faible risque de toxicité.

Tableau 3.11 : taux de transfert moyens (en pourcentage) (\pm écart-type) des ETMM dans les infusions.

Source	taux de transfert par élément				
	As	Cu	Pb	Sb	Zn
G0	13,9 \pm 5,0	6,2 \pm 1,3	1,8 \pm 0,9	3,4 \pm 1,1	0,64 \pm 0,20
S3	9,4 \pm 4,7	21,9 \pm 7,1	5,4 \pm 2,2	11,0 \pm 4,1	2,6 \pm 2,6

Cependant, ces résultats ne sont valables que dans le cas de la préparation d'infusion, et non de décoction qui consiste à faire bouillir la plante dans de l'eau. En effet, il semblerait que l'extraction des ETMM soit plus importante lors de la préparation d'une décoction que lors de la préparation d'une infusion (Abou-Arab and Abou Donia, 2000). De plus, dans le cas présent, les infusions ont été réalisées avec des feuilles entières, or il est possible que l'utilisation de feuilles broyées puisse augmenter le transfert des ETMM par augmentation de la surface de contact eau-plante.

Les tableaux 3.12 et 3.13 présentent respectivement les quantités minimales de feuilles (en g de MS), pour chaque site, et d'infusion (en L) uniquement pour G0 et S3, à consommer pour atteindre les doses journalières admissibles (DJA) (INERIS, 2009) en As, Cu, Pb and Sb (pas de valeur pour Zn). Pour Cu, et Sb, les quantités de feuilles sèches à ingérer pour dépasser les limites recommandées sont supérieures à 100 g/j, pour tous les sites. Pour Pb et As, ces quantités sont plus faibles pour tous les sites, excepté pour S3 dans le cas du plomb. En effet, pour la majorité des sites une consommation de 50g/j de feuilles sèches suffit à dépasser les limites recommandées en Pb, et de moins de 10 g/j pour dépasser les DJA pour l'arsenic. Sur G1 et G6, ces quantités sont encore plus faibles puisqu'elles sont respectivement de 11 et 18 g/j pour le plomb et de 8,9 et 4,5 pour As. Ces valeurs représentent des quantités relativement faibles, même si la consommation journalière des feuilles sèches ou fraîches de romarin est rarement aussi importante, car elle est essentiellement liée à son utilisation en cuisine comme herbe aromatique. Concernant les infusions, qui n'ont été réalisées qu'à partir des individus de G0 et S3, les quantités nécessaires pour dépasser les recommandations sont supérieures à 50 L pour Cu, Pb et

Sb sur les deux sites. Concernant As, ces valeurs sont beaucoup plus faibles pour les deux sites, puisque l'absorption de 1,5 L d'infusion de romarin de G0 et de 12 L d'infusion de romarin de S3 suffisent à dépasser les DJA. Ainsi, dans tous les cas, les masses et les volumes restent supérieurs à la quantité d'infusion couramment ingérée par les consommateurs et préconisée par la pharmacopée, qui recommande de boire quotidiennement 250 à 500 ml de tisane de romarin à 5 g/L. Ceci laisse supposer que le risque d'exposition des populations cueillant et consommant le romarin présent dans les Calanques et notamment dans les collines autour de l'ancienne usine de l'Escalette, est faible, voire inexistant s'il n'y a pas d'ingestion exceptionnelle, et en considérant chaque élément séparément, pour peu que les cueilleurs lavent les feuilles avant utilisation. Cependant, les populations locales sont exposées à ces contaminants via d'autres sources que le romarin. En effet, d'autres espèces comestibles et sujettes à la cueillette existent dans le massif des Calanques (asperges sauvages, salades, etc) la chasse est également pratiquée, et certains habitants des zones proches de l'ancienne usine cultivent des légumes au niveau de leur potager. Un risque pour la santé ne peut donc pas être complètement exclu, puisque certains des éléments présents sont cumulatifs. C'est le cas du plomb par exemple, qui peut être stocké dans les os, en se substituant au calcium sur son récepteur (Pounds et al., 1991) et être remobilisé en cas d'augmentation du renouvellement osseux, dû à l'ostéoporose notamment, avec pour conséquence une intoxication au plomb (Berlin et al., 1995). De plus, les conséquences possibles d'une exposition à long terme au mélange d'éléments toxiques présents dans les romarins (effet de multicontamination), même à de faibles concentrations, ne sont pas connues.

Tableau 3.13 : quantités minimales d'infusion de romarin (en L) de G0 et S3, à consommer pour atteindre les doses journalières admissibles (DJA) de As, Cu, Pb et Sb (pas de valeurs disponibles pour Zn)

	Site	Eléments			
		As	Cu	Pb	Sb
DJA (mg/j) pour un adulte de 60 kg ^a		0,0042	8,4	0,21	0,36
Tisane à boire (L)	G0	1,5	313	57	386
	S3	12	86	190	862

^a(INERIS, 2009)

Tableau 3.12 : quantités minimales de feuilles de romarin (g de MS) de chacun des sites étudiés (de G0 à G6 ; points du transect, S3 : référence) à consommer pour atteindre les doses journalières admissibles (DJA) de As, Cu, Pb et Sb (pas de valeurs pour Zn)

	Sites	Eléments			
		As	Cu	Pb	Sb
DJA (mg/j) pour un adulte de 60 kg ^a		0,0042	8,4	0,21	0,36
	G0	12	900	51	643
	G1	8,9	1463	11	524
	G2	16	993	73	1648
Feuilles de romarin à consommer (g)	G3	12	1079	55	4786
	G4	17	1079	55	4786
	G5	4,8	1058	18	481
	G6	7,7	1540	34	1383
	S3	46	866	736	4328

^aINERIS, 2009

3.4. Conclusion

A la vue des résultats, il apparaît que le massif des Calanques et plus particulièrement les collines de Marseillevéyre ont été fortement impactés par les activités de l'ancienne usine de l'Escalette, dont les particules présentes dans les fumées ont été emportées par le vent sur des distances moyennes (importantes à l'échelle du massif des calanques). Ainsi, plus de 80 ans après la fermeture de l'usine, la pollution diffuse en Pb, As, Sb et Zn dans les sols alentours, reste très élevée et la mobilité de ces éléments n'est pas négligeable comme pour Pb dont la fraction mobilisable représente près de 50% de la concentration pseudo-totale. Il est à noter l'existence de corrélations significatives et positives entre les concentrations en As, Pb, Sb et Zn pseudo-totales et les fractions mobilisables et échangeables des ces ETMM dans les sols du transect. De plus, certains sites, pourtant relativement éloignés de la source de pollution présentent des PLI plus élevées que des zones adjacentes aux ruines de l'usine. Sur toute cette zone impactée, des romarins sont présents. Leur importante biomasse, leur caractère pérenne en font de bons candidats pour la phytoremédiation. Les résultats ont montré que cette espèce semble stocker

préférentiellement les ETMM dans ces racines. En effet, les concentrations racinaires semblent liées aux concentrations dans le sol (pseudo-totales et mobilisables), alors que les concentrations dans les parties aériennes restent faibles et semblent être assez stables même à des niveaux de contamination du sol importants. Cependant, les résultats mis en évidence par de précédentes études réalisées sur le site même de l'Escalette, ont montré des concentrations élevées d'ETMM dans les romarins (plus de 100 µg/g de plomb dans les parties aériennes). Il est probable que les racines des individus présents sur la zone de contamination diffuse (sur le transect) aient accès à des sols moins contaminés, puisque la contamination est superficielle et n'atteint pas les horizons profonds du sol, entraînant une "dilution" des ETMM dans les parties aériennes. Ainsi, concernant les risques pour la santé humaine en cas de consommation de romarin issu dans la zone de pollution diffuse, ces risques ne semblent pas importants pris isolément. Les quantités de feuilles sèches et d'infusions à consommer pour atteindre les doses journalières admissibles en As, Pb, Sb et Zn, sont largement supérieures à une consommation habituelle de romarin. Cependant, le caractère cumulatif de certains de ces éléments, notamment le plomb, le fait que les habitants de la zone de l'Escalette soient soumis aux ETMM par d'autres sources, particulièrement les particules de sol soulevées par le vent et la multiplicité des contaminations dont les effets sur l'organisme sont peu connus, ne sont pas à négliger. De plus, la pollution étant également liée à des dépôts atmosphériques, il aurait été intéressant de faire des mesures de contamination sur des échantillons de feuilles non lavées afin de déterminer l'apport d'ETMM par cette voie.

Références bibliographiques

Abou-Arab AAK, Abou Donia MA. Heavy Metals in Egyptian Spices and Medicinal Plants and the Effect of Processing on Their Levels. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:2300–4.

Arpadjan S, Celik G, Taşkesen S, Güçer S. Arsenic, cadmium and lead in medicinal herbs and their fractionation. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 2008;46:2871–5.

Azizian A, Amin S, Maftoun M, Emam Y, Noshadi M. Response of lettuce to Cd-enriched water and irrigation frequencies. *Afr. J. Environ. Sci. Technol.* 2011;5:884–93.

Azizian A, Amin S, Maftoun M, Emam Y, Noshadi M. Response of Corn to Cadmium and Drought Stress and Its Potential Use for Phytoremediation. *J. Agric. Sci. Technol.* 2013;15:303–10.

- Baize D, Saby N, Deslais W. Teneurs en huit éléments en traces (Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Zn) dans les sols agricoles en France. ADEME - INRA - GIS sol; 2007.
- Baize D, Saby N, Walter C. Le cuivre extrait à l'EDTA dans les sols de France-Probabilité de carences et de toxicités selon la BDAT. *Etude Gest. Sols* 2006;13:259–68.
- Baker A. Accumulators and excluders - strategies in the response of plants to heavy-metals. *J. Plant Nutr.* 1981;3:643–54.
- Baker AJM, Brooks RR. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1989;1:81–126.
- Berlin K, Gerhardsson L, Borjesson J, Lindh E, Lundstrom N, Schutz A, Skerfving S, Edling C. Lead-intoxication caused by skeletal disease. *Scand. J. Work. Environ. Health* 1995;21:296–300.
- Chojnacka K, Chojnacki A, Górecka H, Górecki H. Bioavailability of heavy metals from polluted soils to plants. *Sci. Total Environ.* 2005;337:175–82.
- Conseil de l'Union Européenne. Directive 98/83/CE du conseil du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation Humaine. *Journal officiel*; December 5, 1998.
- Crecelius EA. Changes in the chemical speciation of arsenic following ingestion by man. *Environ. Health Perspect.* 1977;19:147–50.
- Dudka S, Adriano DC. Environmental Impacts of Metal Ore Mining and Processing: A Review. *J. Env. Qual* 1997;26:590–602.
- El-Rjoob A-WO, Massadeh AM, Omari MN. Evaluation of Pb, Cu, Zn, Cd, Ni and Fe levels in *Rosmarinus officinalis labiatae* (Rosemary) medicinal plant and soils in selected zones in Jordan. *Environ. Monit. Assess.* 2008;140:61–8.
- FAO/WHO Food Standards Programme. Codex alimentarius Commission. Report of the Thirty-first Session. 2008.
- Fitz WJ, Wenzel WW. Arsenic transformations in the soil–rhizosphere–plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. *Highlights Ecb10 - Nov. Bioact. Subst. Bioremediation Technol.* 2002;99:259–78.
- Green ID. The transfer and fate of cadmium and zinc from sewage sludge amended agricultural soil in an arthropod food chain. Thèse; Bournemouth University, Fern Barrow, Poole, Dorset, BH12 5BB, UK; 2003.
- Greger M. Metal availability, uptake, transport and accumulation in plants. In: *Heavy Met. Stress Plants Biomol. Ecosyst.* 2nde ed. MNV Prasad: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2004. p. 1–27.
- Hamon RE, Holm PE, Lorenz SE, McGrath SP, Christensen TH. Metal uptake by plants from sludge-amended soils: caution is required in the plateau interpretation. *Plant Soil* 1999;216:53–64.

- INERIS. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Plomb et ses dérivés. 2003.
- INERIS. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Cuivre et ses dérivés. 2005a.
- INERIS. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Zinc et ses dérivés. 2005b.
- INERIS. Point sur les valeurs toxicologiques de référence (VTR). March 2009.
- INERIS. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Arsenic et ses dérivés. 2010.
- Kabata-Pendias A. Soil-plant transfer of trace elements—an environmental issue. *Biogeochem. Process. Role Heavy Met. Soil Environ.* 2004;122:143–9.
- Komnitsas K, Modis K. Soil risk assessment of As and Zn contamination in a coal mining region using geostatistics. *Sci. Total Environ.* 2006;371:190–6.
- Kosalec I, Cvek J, Tomic S. Contaminants of medicinal herbs and herbal products. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 2009;60:485–501.
- Logan T., Chaney RL. Non linear rate response and relative crop uptake of sludge cadmium for land application of sludge risk assessment. In: *Heavy Met. Environ.* Lindberg, S.E. and Hutchinson, T.C.: Edinburgh; 1987. p. 387–8.
- Logan TJ, Lindsay BJ, Goins LE, Ryan JA. Field Assessment of Sludge Metal Bioavailability to Crops: Sludge Rate Response. *J. Environ. Qual.* 1997;26:534–50.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004;79:727–47.
- Marschner H. Soil-Root Interface: Biological and Biochemical Processes. *Soil Chem. Ecosyst. Heal.* 1998;special issue:191–231.
- Mességué M. *Mon herbier de santé.* Robert Laffont; 1992.
- Morel JL. Assessment of phytoavailability of trace elements in soils. *Analisis* 1997;25:M70–M72.
- Oomen AG, Tolls J, Sips AJAM, Groten JP. In vitro intestinal lead uptake and transport in relation to speciation. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2003;44:116–24.
- Palero-Fernandez FJ, Martin-Izard A. Trace element contents in galena and sphalerite from ore deposits of the Alcudia Valley mineral field (Eastern Sierra Morena, Spain). *J. Geochem. Explor.* 2005;86:1–25.
- Pounds J, Long G, Rosen J. Cellular and molecular toxicity of lead in bone. *Environ. Health Perspect.* 1991;91:17–32.

Quevauviller P. Operationally defined extraction procedures for soil and sediment analysis I. Standardization. *Trac Trends Anal. Chem.* 1998;17:289–98.

Rashed MN. Monitoring of contaminated toxic and heavy metals, from mine tailings through age accumulation, in soil and some wild plants at Southeast Egypt. *J. Hazard. Mater.* 2010;178:739–46.

Sundar S, Chakravarty J. Antimony Toxicity. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 2010;7:4267–77.

Testiati E. Contamination des sols par des éléments traces métalliques en zone méditerranéenne côtière : étude de leur mobilité et du transfert à la phytoécologie. Aix-Marseille Université; 2012.

Testiati E, Parinet J, Massiani C, Laffont-Schwob I, Rabier J, Pfeifer H-R, Lenoble V, Masotti V, Prudent P. Trace metal and metalloid contamination levels in soils and in two native plant species of a former industrial site: Evaluation of the phytostabilization potential. *J. Hazard. Mater.* 2013;248–249:131–41.

Toda S. Polyphenol Content and Antioxidant Effects in Herb Teas. *Chin. Med.* 2011;02:29–31.

Yaylali-Abanuz G. Heavy metal contamination of surface soil around Gebze industrial area, Turkey. *Microchem. J.* 2011;99:82–92.

Yenilmez F, Kuter N, Emil MK, Aksoy A. Evaluation of pollution levels at an abandoned coal mine site in Turkey with the aid of GIS. *Appl. Remote Sens. Gis Monit. Coal Fires Mine Subsid. Environ. Impacts Coal-Mine Clos. Reclam.* 2011;86:12–9.

Chapitre 4 :

**Mécanismes de tolérance mis en place par
le romarin en présence d'ETMM**

Les résultats précédents ont mis en évidence la tolérance du romarin à des concentrations en ETMM très élevées dans les sols, et sa capacité d'accumulation de ces mêmes éléments, en particulier dans les racines. Afin de comprendre les mécanismes de tolérance développés par cette espèce plusieurs phytométabolites, connus pour leur implication dans la séquestration et la lutte contre le stress oxydatif lié aux métaux, ont été analysés dans les différents organes des romarins prélevés *in situ*. Ces phytométabolites sont en particulier des acides aminés et peptides et les thiols. Certains marqueurs physiologiques ont également été suivis, notamment la chlorophylle et les phénols, ainsi que la composition des huiles essentielles, constituées de molécules aux propriétés antioxydantes, afin de mettre en évidence les modifications métaboliques et physiologiques liées à un stress métallique.

4.1. Implication des acides aminés et des thiols

Les concentrations en acides aminés libres, c'est-à-dire les acides aminés non intégrés dans des protéines, ont été mesurées. La technique employée ne nous permet pas de distinguer les acides aminés complexés aux ETMM de ceux qui ne le sont pas mais il est probable que la méthode d'extraction et d'analyse soit à l'origine d'une rupture des liaisons (Raab et al., 2004). Cette étude se focalise sur trois acides aminés ainsi qu'un peptide connus pour être impliqués dans la tolérance des plantes aux ETMM, à savoir l'histidine, la cystéine, la glycine et le glutathion. La glycine n'a pas pu être mesurée dans les échantillons de G0 et S3 (tableau 4.1). Pour ces deux derniers sites, seules les feuilles et les tiges ont été analysées. Dans les échantillons de G2 la cystéine et le glutathion n'ont pas été détectés. Ceci peut être dû au fait que ces deux molécules sont rapidement dégradées à l'air (fiche produit sigma-aldrich). En effet, suite à des problèmes répétés au niveau du passeur automatique d'échantillons du système analytique utilisé, les extraits de G2 ont subi plusieurs cycles de congélation-décongélation et ont été laissés à l'air pendant une période plus importante que les autres échantillons.

Les résultats sont présentés tableau 4.1. Les concentrations mesurées sont comprises entre [79 et 18950], [3,5 et 71], [1,2 et 200] et [42 et 1160] nmol/g de masse de matière fraîche (MF) des parties aériennes, pour la glycine, l'histidine, la cystéine et le glutathion, respectivement. Dans les racines, elles sont comprises entre [30 et 42800], [1,0 et 72], [7,7 et 270] et entre [70 et 4300] nmol/g MF pour la glycine, l'histidine, la cystéine et le glutathion, respectivement. Ces valeurs

sont cohérentes avec les concentrations trouvées dans la littérature chez *Lupinus albus* et *Sedum alfredii* en présence de cadmium (Costa and Spitz, 1997; Sun et al., 2007).

Tableau 4.1: concentrations moyennes en nmol/g MF (+/- écart type) d'histidine, glycine, cystéine et glutathion mesurées dans les feuilles, tiges et racines des romarins prélevés sur les sites étudiés. De G0 à G6 : points du transect, S3 : référence.

Acide aminé	Organes	Sites							
		G0	G1	G2	G3	G4	G5	G6	S3
Glycine	Tiges	na	140±29,6	328,7±69,	2511±262	489±210	20792±769	522±162	na
	Feuilles	na	64,7±4,01	115±7,07	174±36,2	510±657	7661±3296	458±162	na
	Racines	na	124±97,7	146±130	2983±116	12553±1887	13243±310	1068±75	na
Histidine	Tiges	88,6±15,	56,0±15,0	97,2±31,3	21,9±10,9	37,0±15,7	64,5±21,1	124±33,6	137±46,7
	Feuilles	nd	31,8±0,41	nd	nd	7,5±10,5	6,1±1,0	nd	4,9±3,7
	Racines	na	49,5±10,7	34,7±29,9	2,8±5,7	8,2±11,0	33,0±10,2	14,6±21,	na
Cystéine	Tiges	93,5±11,	35,3±10,8	nd	108±101	1,7±2,5	244±82,3	nd	69,0±16,
	Feuilles	206±55,6	48,2±16,9	nd	54,3±29,7	2,7±4,0	110±29,6	nd	132±85,5
	Racines	na	13,9±11,9	nd	109±83,7	5,9±13,2	97,0±59,0	53,9±120	na
Glutathion	Tiges	435±154	374,3±80,	nd	505±117	808±261	455±50,3	274 ±145	42,4±27,
	Feuilles	66,4±37,	287±402	nd	493±137	896±492	807±524	136±159	56,4±10,
	Racines	na	223±67,9	nd	272±165	1269±1913	312±181	221±334	na

na : non analysé, nd : non détecté

Les résultats montrent une corrélation linéaire positive (test de Pearson, $p < 0,05$) notable ($r > 0,8$) entre la concentration en glutathion dans les racines et les concentrations en glycine et cystéine dans les racines également (tableau 4.2). Ceci peut être expliqué par le fait que la cystéine et la glycine sont des précurseurs du glutathion. Des études ont montré que la synthèse de cystéine augmente lorsque la synthèse de glutathion SH réduit (GSH) est stimulée (figure 4.1). La relation entre la synthèse de glycine et de glutathion est moins claire (Noctor et al., 1998), mais dans le cas des racines de romarin, il semble qu'à la fois la synthèse de cystéine et de glycine soit corrélée à la synthèse de glutathion. Dans les parties aériennes, seules les concentrations en cystéine et en glycine sont corrélées, ceci positivement ($r > 0,7$). Comme précisé précédemment, ces deux acides aminés sont des précurseurs du glutathion, une corrélation avec la concentration en glutathion serait donc attendue, d'autant plus que la synthèse de ces trois molécules semble liée. Cependant, l'absence de corrélation entre la concentration de ces deux acides aminés et la concentration du glutathion dans les parties aériennes pourrait être liée à l'utilisation de ce dernier

dans la synthèse de phytochélatines. En effet, des études ont mis en évidence que l'augmentation de phytochélatines était liée à une diminution du glutathion en présence de Cd (Scheller et al., 1987).

Dans les parties aériennes, une corrélation négative notable entre les concentrations en glutathion et en histidine a été mise en évidence (test de Pearson, $p < 0,05$, $r = -0,57$). L'histidine est connue pour former des complexes pouvant transporter et rendre inactif le nickel dans les plantes qui sont capables d'hyperaccumuler cet élément comme *Thlaspi caerulescens* (Kramer et al., 1996). La capacité de cet acide aminé à former des complexes a également été mise en évidence pour le cuivre (Liao et al., 2000) et le zinc (Salt et al., 1999), laissant penser qu'il puisse être impliqué dans la tolérance à d'autres ETMM, notamment ceux formant des cations bivalents. Si c'est le cas, la diminution de la concentration de glutathion quand celle d'histidine augmente pourrait être liée à une compétition entre les voies de biosynthèse de ces deux molécules concernant l'approvisionnement en glutamate (figure 4.1) (Stepansky and Leustek, 2006; Noctor et al., 2012).

Tableau 4.2 : coefficients de corrélation (test de Pearson, $p < 0,05$) entre les concentrations en acide aminé dans les parties aériennes et dans les racines

Organe	Acide aminé	Partie aérienne				Racines			
		Glycine	Cystéine	Glutathion	Histidine	Glycine	Cystéine	Glutathion	Histidine
Parties aériennes	Glycine	1	0,76	n.s	n.s	0,39	n.s	n.s	n.s
	Cystéine		1	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
	Glutathion			1	-0,57	0,41	n.s	n.s	n.s
	Histidine				1	n.s	n.s	n.s	0,61
Racines	Glycine					1	n.s	0,88	n.s
	Cystéine						1	0,80	n.s
	Glutathion							1	n.s
	Histidine								1

n.s : non significatif, les valeurs de corrélation présentées sont significatives à $p \leq 0,05$

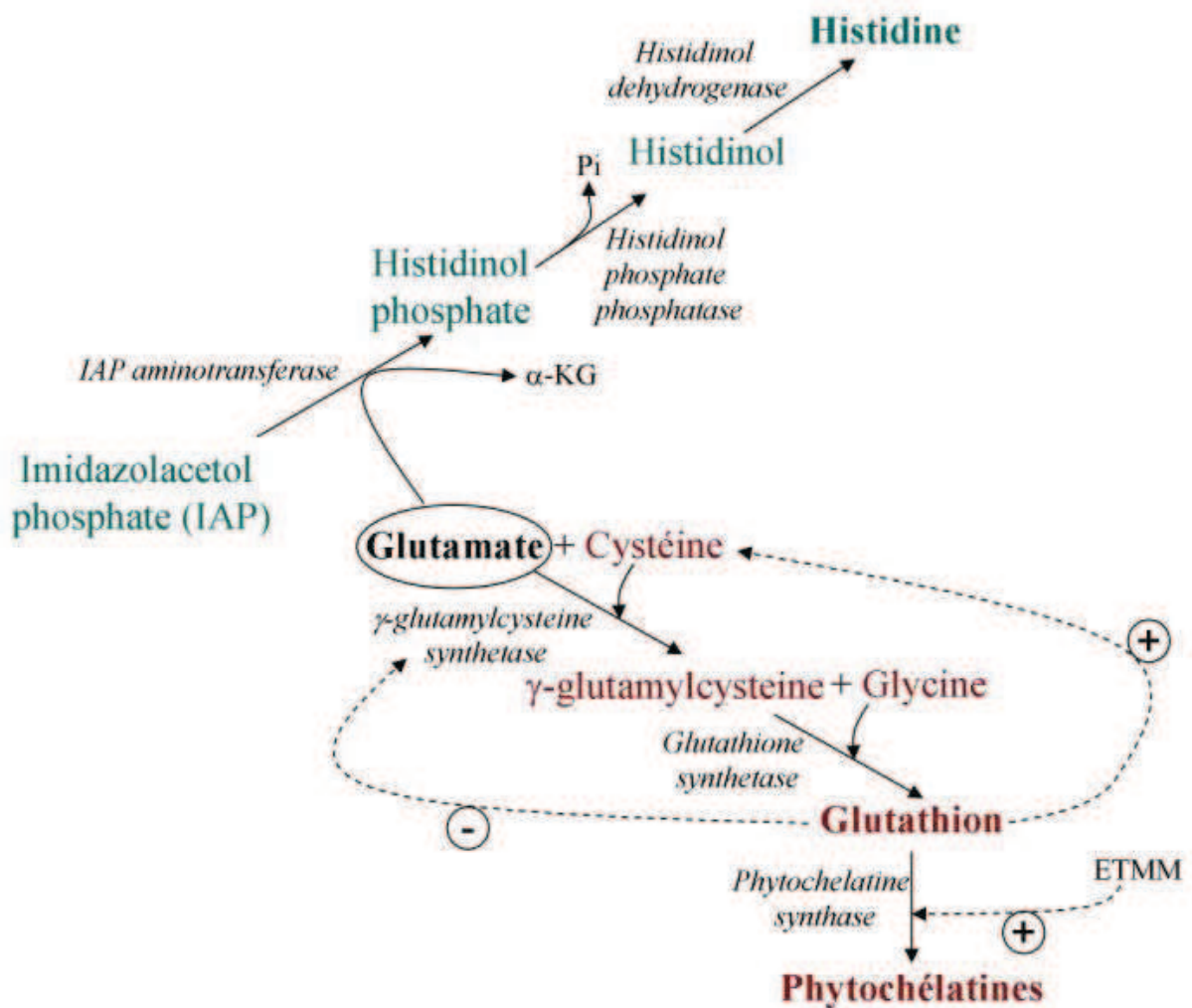


Figure 4.1 : schéma récapitulatif des voies de biosynthèse de l'histidine (en bleu), du glutathion et des phytochélatines (en rouge). Les enzymes impliquées dans les transformations sont en noir et en italique, les sous produits en noir. Les régulations positives (+) et négatives (-) connues sont indiquées par les flèches pointillées. P_i : phosphate inorganique, α -KG : alpha ketoglutarate. (D'après Noctor et al., 1998; Cobbett, 2000; Stepansky and Leustek, 2006).

Généralement, le facteur limitant la synthèse de glutathion est la présence de cystéine, mais dans le cas où la quantité de cet acide aminé est suffisant dans la plante, c'est le glutamate qui devient limitant (Noctor et al., 1996). Or, des études ont mis en évidence que l'inhibition de la synthèse d'histidine pouvait entraîner l'augmentation de glutamate libre dans la plante (Stepansky and Leustek, 2006). Il est donc probable que la corrélation négative observée entre l'histidine et le glutathion dans les plantes soit liée à ce phénomène.

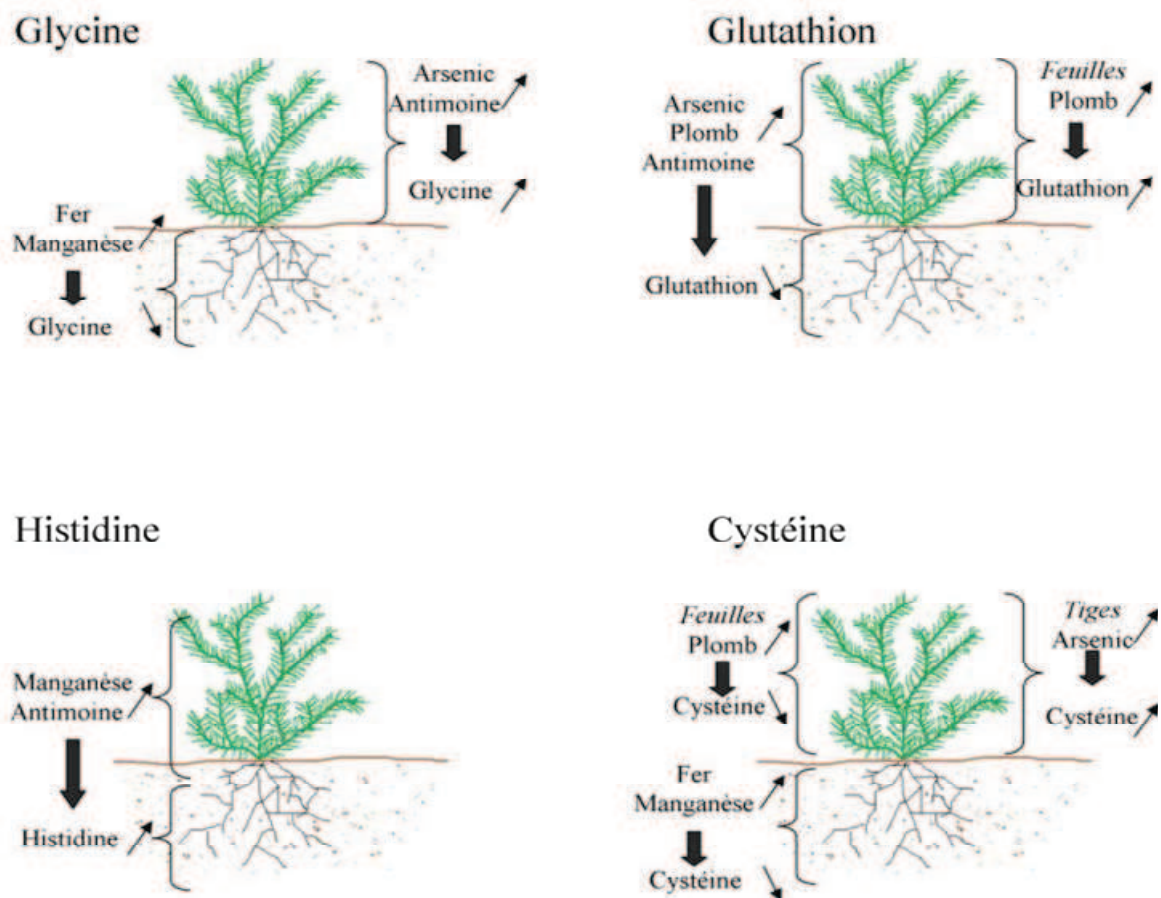


Figure 4.2 : Schéma récapitulatif des corrélations significatives mises en évidence entre les concentrations en acides aminés et les concentrations en métaux et métalloïdes dans les différents organes du romarin

Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la concentration en ETMM du sol et la concentration en acide aminé dans le romarin. Quelques corrélations significatives, bien que faibles, ont par contre été mises en évidence entre les concentrations en acides aminés et les concentrations en ETMM dans le romarin. Ces corrélations significatives sont résumées figure 4.2. La grande complexité des voies de biosynthèse des acides aminés, ainsi qu'un biais lié à des difficultés analytiques (temps d'analyse long, baisse de la sensibilité liée à l'extraction de composés pouvant encrasser la colonne, etc.), peuvent être à l'origine de ces faibles corrélations. Malgré cela, des hypothèses, à confirmer par des expérimentations complémentaires, seront proposés ci-dessous afin de tenter d'expliquer l'implication de certains acides aminés et peptides dans la tolérance du romarin et la translocation des ETMM des racines vers les parties aériennes.

4.1.1. Histidine

La concentration en histidine dans les racines est corrélée positivement avec la concentration en manganèse et en antimoine dans les parties aériennes (test de Pearson, $p < 0,05$, $r = 0,43$ et $0,44$ respectivement). L'histidine est un acide aminé connu pour être impliqué dans le transfert de certains ETMM, notamment le nickel, des racines vers les parties aériennes via le xylème, (Kerkeb and Kramer, 2003; Kramer et al., 1996), mais il ne semble pas que ce soit le cas du manganèse qui semble être majoritairement transporté sous forme non complexée (White, 1981). Toutefois, le manganèse est connu pour activer une enzyme impliquée dans la synthèse d'histidine chez les bactéries (Morona et al., 2002) et les champignons (Subramanyam and Venkateswerlu, 1979). L'augmentation de la concentration en histidine dans les racines pourrait ainsi être liée à l'activation de cette enzyme en présence de Mn dans la racine. De plus, le fait que cet élément soit apparemment transporté rapidement et en grande partie vers les parties aériennes (Page et al., 2006) pourrait expliquer la corrélation entre sa concentration dans les parties aériennes et la concentration en histidine dans les racines. Concernant l'antimoine, son mode de translocation des racines vers les parties aériennes n'est pas élucidé. Son transport sous forme complexé à l'histidine ne peut donc pas être exclu pour expliquer la corrélation positive mise en évidence entre la concentration en Sb dans les parties aériennes et la concentration en histidine dans les racines. Cependant, cette corrélation pourrait n'être que le fait de la corrélation existant entre Sb et Mn dans les parties aériennes. En effet, des corrélations notables ont été observées entre les concentrations en Sb et celles en Mn et Fe dans les parties aériennes (test de Pearson $p < 0,05$, $r = 0,77$ et $0,67$ respectivement), ainsi qu'une forte corrélation entre Mn et Fe dans les parties aériennes ($r = 0,85$) laisse penser que ces trois éléments sont transloqués, au moins en partie, de façon similaire. L'implication de l'histidine dans ce phénomène est peu probable puisque des travaux montrent que le fer est transporté essentiellement sous forme de Fe^{3+} complexé à l'acide citrique (Tiffin, 1966). Le manganèse, malgré une faible affinité pour le citrate (Tiffin, 1967), et l'antimoine existant sous forme trivalente également, pourraient donc être transférés des racines aux parties aériennes sous forme complexé à l'acide citrique.

4.1.2. Glycine, cystéine et glutathion

La glycine et la cystéine sont des précurseurs du glutathion, lui-même précurseur des phytochélatines, peptide impliqué dans la tolérance des plantes aux ETMM (Grill et al., 1985). De ce fait, leur synthèse et concentration dans les plantes peuvent être corrélées à la présence d'ETMM. Dans les parties aériennes, une corrélation positive faible (test de Pearson $p < 0,05$), mais significative, a été mise en évidence entre la concentration en arsenic dans les feuilles et les tiges et la concentration en glycine dans les feuilles ($r = 0,41$), ainsi qu'avec la concentration en cystéine dans les tiges ($r = 0,55$). Pourtant, l'arsenic est connu pour inhiber certaines réactions métaboliques faisant intervenir des phosphates, telles que celles de la voie des pentoses phosphate, à l'origine du précurseur de la cystéine. Mais, dans les espèces tolérantes la présence de ce métalloïde induit une activation de la cystéine synthase et la Ser acétyltransférase, deux enzymes impliquées dans la biosynthèse de cet acide aminé (Finnegan and Chen, 2012), permettant d'expliquer la corrélation positive observée dans ce cas entre la concentration en As et la concentration en cystéine. Une faible corrélation négative entre la concentration en arsenic dans les tiges et la concentration en glutathion dans les racines a également été mise en évidence dans le romarin ($r = -0,53$). L'arsenic est capable d'engendrer la synthèse de phytochélatines dans les plantes (Cobbett and Goldsbrough, 2002). Le complexe formé peut être séquestré dans la vacuole jouant ainsi un rôle dans la détoxification et la tolérance des plantes à l'arsenic (Briat, 2010). La synthèse de phytochélatines par le romarin en présence d'As pourrait être à l'origine de l'augmentation de la concentration en glycine et cystéine, puisque ces deux acides aminés sont des précurseurs du glutathion, lui-même précurseur des phytochélatines. La synthèse de ce métabolite dans les parties aériennes est probable puisqu'une partie importante de l'As absorbé est transporté dans le xylème sous forme non complexée (As(III) et As(V)) (Pickering et al., 2000). Cependant, le transfert des racines vers les parties aériennes via le xylème semble également possible sous forme de complexe avec le glutathion et la phytochélatine PC₂ (Raab et al., 2005). Ceci pourrait être en partie à l'origine de la diminution de la concentration en glutathion dans les racines lorsque la concentration en As augmente dans les tiges. Cette corrélation est également mise en évidence pour l'antimoine et le plomb. Des études ont montré que Pb est capable de former des complexes stables avec le glutathion et les phytochélatines (Alberich et al., 2007; Cruz et al., 2001) et que ces polypeptides, capables d'être transporté dans le xylème (Rennenberg et al., 1979; Gong et al., 2003) entraînent également en jeu dans la tolérance à l'antimoine

(Wysocki et al., 2003). Cependant le transfert des racines vers les parties aériennes sous forme complexée aux phytochélatines de Pb et Sb n'a pas été mis en évidence dans notre étude.

Concernant le plomb, son augmentation dans les feuilles semble être corrélée à une augmentation du glutathion ($r = 0,51$) et à une baisse de la cystéine ($r = -0,41$) dans les feuilles. Le plomb étant capable de stimuler la synthèse de phytochélatines (Gupta et al., 1995), les phénomènes inverses (c'est-à-dire une augmentation de la cystéine et une diminution du glutathion) seraient attendus. La présence de plomb peut être à l'origine de l'inhibition de l'activité de certaines enzymes, notamment des enzymes de la voie des pentoses phosphates (Sharma and Dubey, 2005). Or, la cystéine est synthétisée à partir du 3-phosphoglycérate (Briant, 2003) produit lors du cycle des pentoses phosphates (Fast and Papoutsakis, 2012). Ainsi, la présence de plomb dans les feuilles peut engendrer une diminution de la concentration de cystéine, par inhibition de la synthèse de son précurseur, et une synthèse plus importante de glutathion afin de lutter contre le stress oxydatif généré par la présence de cet élément. En effet, il a été montré précédemment qu'en présence de Pb, la teneur en glutathion était doublée chez *Sesbania drummondii* (Thomas Ruley et al., 2004).

Dans les racines, une corrélation négative a été mise en évidence entre les concentrations en fer et manganèse d'une part, et les concentrations en glycine (test de Pearson $p < 0,05$, $r = -0,4$ et $-0,44$ respectivement) et en cystéine (test de Pearson $p < 0,05$, $r = -0,52$ et $-0,63$ respectivement), d'autre part. Le fer et le manganèse ne sont pas capables d'induire la synthèse de phytochélatines (Feix and Tremel-Schaub, 2005). La diminution de la glycine et de la cystéine, précurseurs des phytochélatines, ne devrait pas être liée à leur utilisation dans le cadre de la synthèse de ce polypeptide. Cependant, ces métaux essentiels peuvent devenir toxiques lorsqu'ils sont en excès, engendrant la production de glutathion (GSH) par la plante (Jozefczak et al., 2012). Dans le cas présent, une majorité des systèmes racinaires des romarins présente des concentrations en fer supérieures aux concentrations normalement trouvées dans les plantes. Ce n'est cependant pas le cas du manganèse (Epstein, 1994). Il est donc peu probable que cette corrélation soit liée à la synthèse de GSH due à un excès de ces deux éléments, d'autant plus que l'augmentation de la synthèse de glutathion est généralement accompagnée d'une augmentation de la synthèse de cystéine. Par contre, la glycine et la cystéine sont capables de former des complexes avec les métaux (Kiss and Gergely, 1991; Jozefczak et al., 2012), il est alors possible que Fe et Mn aient été complexés par ces deux acides aminés, afin d'être stockés dans les cellules. D'autre part, bien

qu'il n'y ait pas de corrélation entre les concentrations en glycine et en cystéine, d'une part, et d'autre part, les concentrations en Pb, As, Sb et Zn dans les racines, la baisse observée avec l'augmentation de la concentration en Fe et Mn pourrait être simplement liée à la corrélation positive significative notable existant entre les concentrations racinaires en Pb, As, Sb et Zn et celles de Fe (test de Pearson $p < 0,05$, $r = 0,61$; $0,64$; $0,45$ et $0,38$ pour Pb, As, Sb et Zn respectivement) et de Mn ($r = 0,69$; $0,79$; $0,60$ et $0,60$ pour Pb, As, Sb et Zn respectivement). Cependant, une corrélation notable ayant été mise en évidence précédemment entre les concentrations en cystéine/glycine et la concentration en GSH ($r = 0,80$ et $0,88$ pour la cystéine et la glycine, respectivement) dans les racines, le fait qu'il n'y ait pas de corrélation négative mise en évidence avec le glutathion paraît surprenant également.

4.1.3. Thiols libres

Les thiols libres ont été quantifiés dans les feuilles et les tiges de romarin. Les résultats des concentrations en thiols dans les parties aériennes sont présentés figure 4.3. Ils mettent en évidence une baisse de la concentration en thiols libres dans les romarins exposés à de fortes concentrations en ETMM (G2) et à de faibles concentrations en ETMM (G6). Pour les romarins exposés à des concentrations en ETMM intermédiaires, les concentrations en thiols libres dans les parties aériennes ne sont pas significativement différentes (G1, G3, G4 et G5). Les concentrations les plus faibles sont obtenues pour les romarins de G1 avec une moyenne de $8,7 \pm 2,3 \mu\text{mol -SH/g MS}$. La moyenne obtenue sur G6 est de $14,9 \pm 6,3 \mu\text{mol -SH/g MS}$ et les moyennes des autres sites sont comprises entre 24 et $30,3 \mu\text{mol -SH/g MS}$. Ces concentrations sont très supérieures à celles trouvées pour les thiols totaux par Moreno et al. (2007) dans le romarin. En effet, cette étude a mis en évidence des concentrations d'environ $0,25 \mu\text{mol -SH/g MF}$. Cependant, ces résultats peuvent difficilement être comparés puisqu'ils ont dosés les thiols totaux et non libres, ont préparé leurs extraits à partir de romarin frais et non sec, et ont utilisé des techniques d'extraction et de dérivation des thiols différentes pour un dosage spectrométrique autre (Moreno-Jiménez et al., 2006). De plus, contrairement à ce qui est mis en évidence dans ce cas, les résultats de Moreno et al. (2007) ne montraient pas de diminution de la concentration en thiols avec l'augmentation de la contamination en ETMM. En effet, les concentrations en thiols dans les individus mis en croissance sur un sol contaminé par l'accident d'Aznalcóllar (Espagne) et des individus mis en culture sur le même sol mais auxquels des boues minières ont été ajoutées, ne

différait que de 9%. Cependant, ni le niveau de contamination du sol, ni les concentrations en ETMM ajoutées n'étaient précisés. Il est donc possible que le fait que les concentrations en thiols ne soient pas significativement différentes entre les deux conditions présentées par Moreno et al. (2007) soit en cohérence avec ce qui est observé dans le cas présent, à savoir une concentration en thiols libres stable pour une gamme de concentration en ETMM importante.

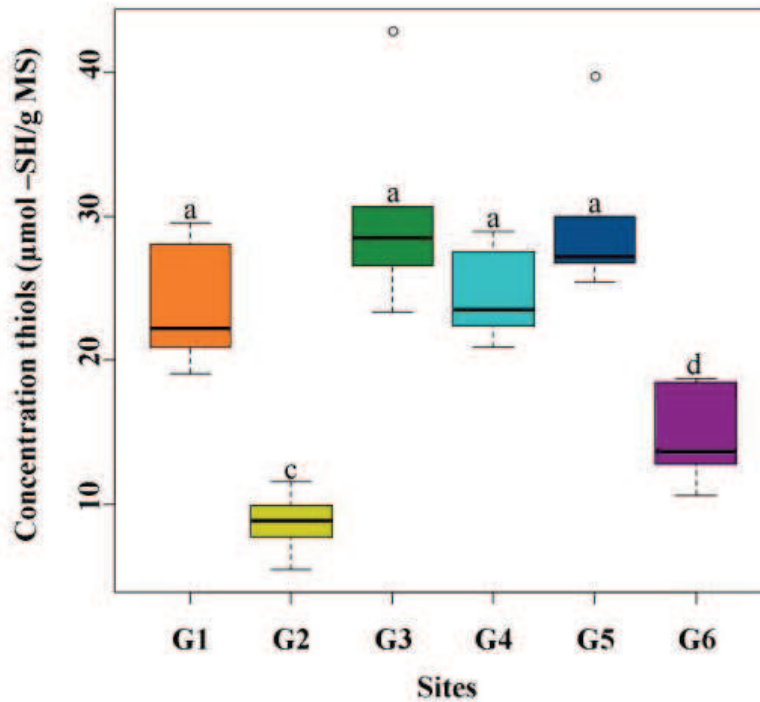


Figure 4.3 : boîte à moustache des concentrations en thiols dans les parties aériennes de romarin des sites de G1 à G6 du transect. Les boîtes à moustache surmontées de la même lettre ne présentent pas de différence significative (test de Wilcoxon, $p < 0,05$)

Les concentrations en thiols libres totaux dans les parties aériennes sont corrélées positivement mais faiblement avec les concentrations en glutathion (test de Pearson, $p < 0,05$, $r = 0,44$ et $r = 0,69$ pour les feuilles ou les tiges respectivement) et en cystéine (test de Pearson, $p < 0,05$, $r = 0,51$ dans les feuilles). La concentration de thiols non protéiques dans les plantes soumises à des stress métalliques, notamment par le cadmium, est formée en grande partie par le glutathion et la cystéine (Alvarez-Legorreta et al., 2008). Ainsi, la faible corrélation entre leur concentration et la concentration en thiols libres peut être liée à la présence non négligeable de thiols protéiques, à la formation de complexes avec les ETMM (Vadas and Ahner, 2009) et/ou à la synthèse de phytochélatines en présence d'ETMM (Grill et al., 1985).

Une corrélation négative a également été mise en évidence entre la concentration en thiols et la concentration en histidine dans les parties aériennes (test de Pearson, $p < 0,05$, $r = -0,54$). Cette corrélation a déjà été mise en évidence dans la partie sur les acides aminés entre la concentration en glutathion et la concentration en histidine dans les parties aériennes, avec l'hypothèse que cela puisse être dû à une compétition des deux voies de biosynthèse pour le glutamate.

Concernant la synthèse de thiols en fonction de la contamination, des corrélations négatives significatives mais assez faibles ont été mises en évidence entre la concentration en As, Pb, Sb et Zn dans le sol, et la concentration en thiols libres dans les parties aériennes (test de Pearson, $p < 0,05$, $r = -0,44$; $-0,45$, $-0,43$ et $-0,36$ respectivement). Ces corrélations sont faibles, mais mettent toutefois en évidence une diminution des thiols libres dans les parties aériennes avec l'augmentation de la contamination. Ceci peut être lié à la formation de complexes thiols-ETMM dans les parties aériennes, ou à une séquestration plus importante des ETMM au niveau racinaire lorsque la contamination du sol augmente, puisque la concentration en As, Pb, Sb et Zn racinaire augmente de façon linéaire alors qu'elle atteint rapidement un plateau dans les parties aériennes (figures 3.6 et 3.8). En effet, l'hypothèse de la diminution de la concentration en thiols libres liée à une complexation des ETMM dans les feuilles est contredite par des corrélations positives entre ces deux dernières variables (test de Pearson, $p < 0,05$, $r = 0,55$; $0,55$ et $0,67$ pour Pb, Sb et Zn respectivement). La présence d'ETMM dans les feuilles semble être à l'origine d'une augmentation de la concentration en thiol libres dans ces mêmes organes, preuve que la biosynthèse de thiols est favorisée par la présence de Pb, Sb et Zn, soit pour agir comme antioxydant, soit pour la détoxification par séquestration. L'hypothèse de la diminution de la synthèse de thiols liée à une augmentation de la séquestration dans les racines lorsque la concentration en ETMM racinaire augmente est cohérente avec les corrélations négatives significatives mises en évidence entre la concentration racinaire en As, Pb et Zn et la concentration en thiols dans les tiges ($r = -0,61$; $-0,45$ et $-0,49$ respectivement).

Ainsi, il semble que lorsque la concentration en ETMM (Pb, Sb et Zn en particulier) augmente dans le sol, la séquestration au niveau racinaire est plus importante, limitant le transfert de ces éléments vers les parties aériennes. Ceci est confirmé par le fait que les romarins provenant des sites les plus contaminés ne sont pas ceux dont les concentrations en ETMM dans les feuilles sont les plus élevées.

4.2. Détermination de marqueurs physiologiques chez le romarin

Parmi les métabolites primaires chez la plante, les chlorophylles sont particulièrement intéressantes à étudier comme indication des aptitudes photosynthétiques de la plante (Blankenship, 2010). Parmi les métabolites secondaires, les composés phénoliques sont largement impliqués dans les réponses de défense de la plantes et notamment dans sa tolérance aux ETMM (Michalak, 2006). La recherche parmi ces molécules de biomarqueurs de stress métallique chez le romarin, et notamment au niveau des parties aériennes et de façon non-destructive, pourrait non seulement apporter des informations sur l'état physiologique de la plante poussant sur sol contaminé, mais peut-être également permettre une biosurveillance des sites pollués. Des indices de chlorophylles, phénols, flavonols et anthocyanes ont donc été mesurés grâce à un équipement portatif de mesures des réponses lumineuses des phytométabolites (Multiplex, Société Force-A, Orsay). Ces indices ne peuvent pas être convertis en concentrations car des dosages des différents phytométabolites mesurés, n'ont pas été effectués en parallèle en laboratoire. Cependant, ces indices dont la mesure est affranchie de la géométrie de l'échantillon, permettent une comparaison entre les populations de romarins sur les différents sites. Il est donc possible de quantifier les variations : augmentation ou diminution de ces métabolites entre les différentes conditions de terrain à un temps t. Cependant, les variations de ces phytométabolites étant liées au stade phénologique (del Baño et al., 2003), à la température (Todorov et al., 2003) et à la lumière (Engelsma, 1979), les mesures des romarins de G0 et S3 ayant été effectuées à une période différente, elles ne sont pas prises en compte dans l'analyse qui suit.

La figure 4.4 présente les boîtes à moustaches obtenues pour les indices de chlorophylles, de flavonols, de phénols et d'anthocyanes à partir des résultats des 5 romarins des sites de G1 à G6. Les résultats des indices de flavonols et d'anthocyanes mettent clairement en évidence deux groupes: G1, G2, G3 et G4 d'une part et G5 et G6 d'autre part (avec un point de G4 proche des valeurs obtenues sur G5 et G6). Ces observations pourraient être liées à la floraison des romarins sur les sites G5 et G6. En effet, il est difficile de s'affranchir de la présence des fleurs lors des étapes de mesures *in situ* et les anthocyanes sont des pigments couvrant une palette de couleur allant de rouge à bleu, qui sont responsables de la couleur de nombreuses fleurs (Davies et al., 2003). De plus, il a été démontré que les teneurs en flavones augmentent au cours de l'anthogénèse chez le romarin (del Baño et al., 2004). Or, la couleur bleu des fleurs semble être le résultat de la formation de co-pigment entre les anthocyanes et les flavones (Yabuya et al., 1997;

Fukui et al., 2003). L'indice d'anthocyanes plus élevé pour G5 et G6 peut donc être attribué à la présence de fleurs. Concernant la diminution de l'indice de flavonols sur ces deux sites, elle peut être liée au fait que les anthocyanes et les flavonols (comme le kaempférol et la quercétine) sont issus de la voie de biosynthèse des flavonoïdes et constituent deux groupes de produits terminaux. Ils sont donc synthétisés à partir du même précurseur (Gou et al., 2011). Des études sur le modèle végétal *Arabidopsis thaliana* ont mis en évidence que le flux métabolique de flavonol et d'anthocyanes est contrôlé par une compétition pour le substrat entre la flavonols synthase (enzyme catalysant la synthèse des flavonols) et la dihydroflavonol réductase (enzyme catalysant la première étape de synthèse des anthocyanes) (Gou et al., 2011). Pour éviter une compétition non nécessaire pour le substrat, une régulation temporelle et spatiale des gènes exprimant ces enzymes semble mise en place par la plante (Noda et al., 2004). Ainsi, la diminution rapide de flavonols, accompagnée de l'accumulation d'anthocyanes pendant la floraison, a déjà été mise en évidence chez *Eustoma grandifolium* (Noda et al., 2004).

Concernant les chlorophylles, les indices ne mettent pas en évidence de différences significatives en fonction de la concentration en ETMM dans le sol. Toutefois une corrélation significative négative faible (test de Pearson, $p < 0,05$, $r = -0,47$) existe entre la concentration en Pb dans les feuilles et l'indice de chlorophylles (figure 4.5). Cette réponse a déjà été mise en évidence chez d'autres espèces végétales en présence de Pb (Hamid et al., 2010) et d'autres ETMM comme Cu, Zn et Cd (Shakya et al., 2007). Le plomb inhibe, entre autre, l'activité de l'acide δ -aminolevulinique déshydratase et de la protochlorophyllide reductase qui sont des enzymes associées à la synthèse des chlorophylles (Van Assche and Clijsters, 1990). Ces inhibitions résultent de l'interaction des ETMM, et de Pb en particulier avec les groupements thiols et acide carboxylique des enzymes (Seregin and Ivanov, 2001; Sharma and Dubey, 2005). Les groupements thiols sont souvent présents au niveau des centres réactionnels des enzymes et assurent la stabilité de leur structure tertiaire. L'activité de plus de 100 enzymes serait bloquée par ce type d'interaction (Seregin and Ivanov, 2001). La présence de Pb peut également être à l'origine d'inhibition de métalloenzymes, en se substituant au métal essentiel (Sharma and Dubey, 2005). La réduction de chlorophylle en présence de Pb peut également être liée à l'augmentation de l'activité de la chlorophyllase. En effet, cette enzyme participe à l'hydrolyse des chlorophylles (Jacob-Wilk et al., 1999).

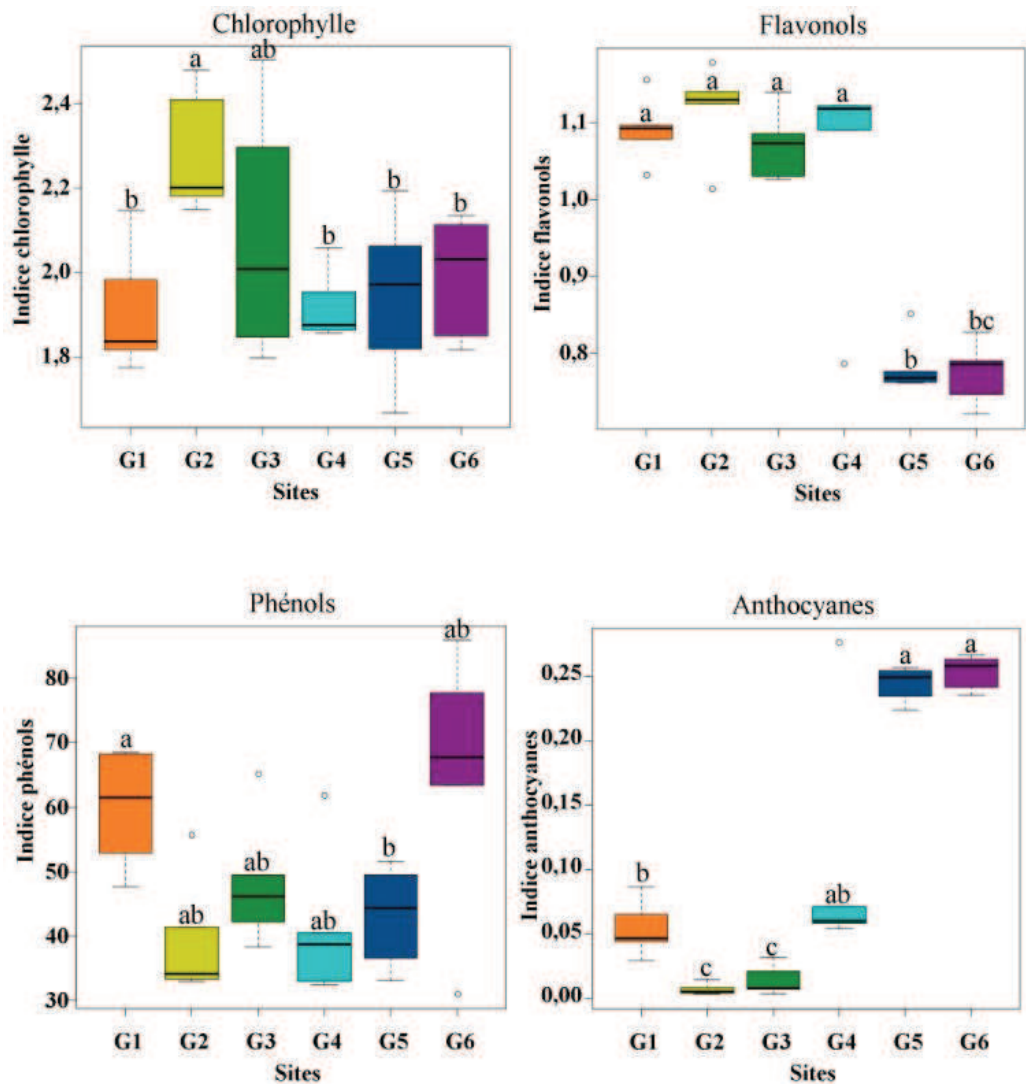


Figure 4.4 : boîtes à moustache des indices de chlorophylles, flavonols, phénols et anthocyanes obtenus pour les sites de G1 à G6 du transect. Les boîtes à moustache surmontées de la même lettre ne présentent pas de différence significative (test de Wilcoxon, $p < 0,05$)

Pour les phénols, les boîtes à moustaches ne mettent pas, comme pour les chlorophylles, en évidence de différences significatives entre les sites contaminés ou non. Cependant, une corrélation significative positive (test de Pearson, $p < 0,05$, $r = 0,54$, figure 4.5) existe entre la concentration en Pb dans les feuilles de romarin et les indices de phénols. L'augmentation des composés phénoliques en présence de Pb a déjà été démontrée (Hamid et al., 2010). Les phénols peuvent améliorer la tolérance des plantes aux ETMM de deux façons : soit par chélation, soit par leur action antioxydante. Ils sont ainsi capables de limiter le stress oxydatif lié à la présence d'ETMM (Michalak, 2006).

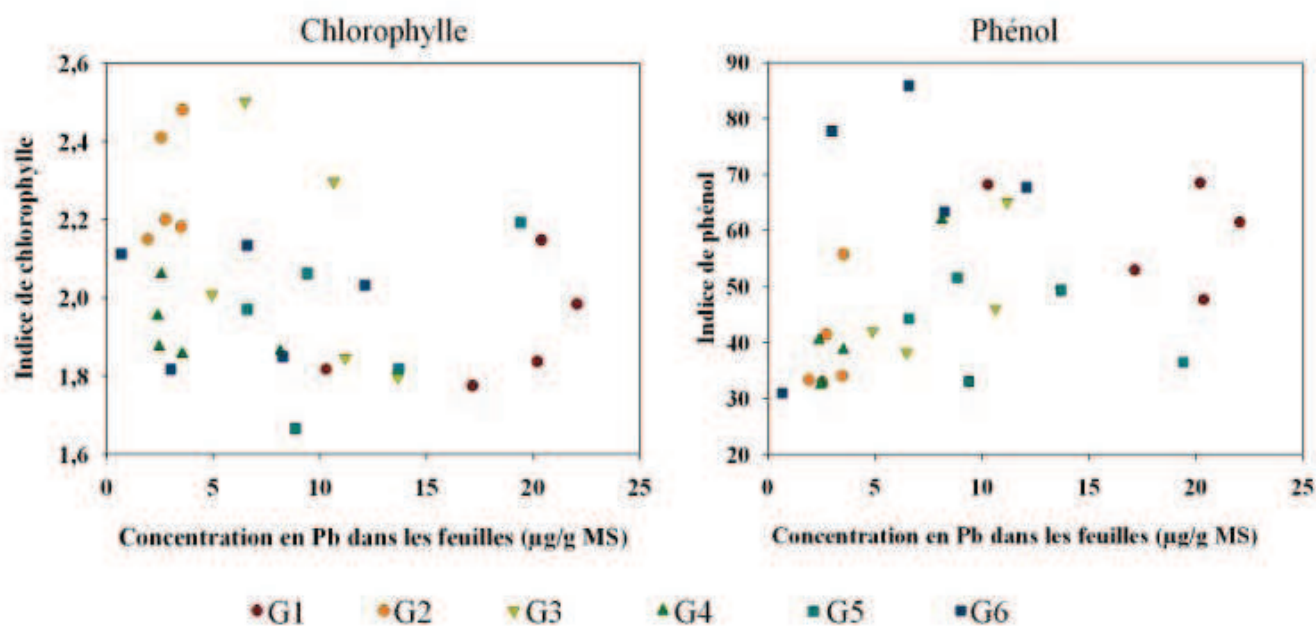


Figure 4.5 : concentrations en Pb dans les feuilles de romarin en fonction des indices de chlorophylles et de phénols mesurés sur les individus des sites de G1 à G6.

4.3. Modification de la composition des huiles essentielles

L'extraction et l'analyse des huiles essentielles (HE) n'ont été effectuées que sur les romarins du site le plus contaminé (G0) et du site référence (S3). Les résultats ont fait l'objet d'une publication (annexe 9).

Pour toutes les huiles essentielles obtenues, un rendement d'environ 1% a été obtenu sur les deux sites, G0 et S3. Ces rendements correspondent aux rendements moyens trouvés dans la littérature et obtenus avec la même méthode d'extraction, qui sont compris entre 0,10 et 2,13 % (Angioni et al., 2004; Boutekdjiret et al., 2003). La composition chimique est la même pour les romarins des deux sites avec 46 composés identiques identifiés (représentant plus de 98% de la composition totale) (Tableau 4.3). Les composants majeurs sont le camphre, l' α -pinène et le 1,8-Cinéole pour les deux sites, signifiant que les populations de romarin des deux sites appartiennent au même chémotype. La composition chimique des huiles essentielles pour les deux populations (G0 et S3) est la même. Aucune variation ne semble intervenir dans la régulation de la voie de biosynthèse spécifique des terpénoïdes en présence de contamination en ETMM.

Tableau 4.3 : Composition chimique moyenne, exprimée en pourcentage, des huiles essentielles pour chaque population de romarin des sites G0 et S3. Les composés majeurs sont en gras.

Composés identifiés	Pourcentage de chaque composé dans chaque population	
	G0*	S3*
α -Thujène	0,3±0,2	0,3±0,1
α-Pinène	20±6	19±7
Camphène	10±2	8±2
Thuja 2,4 diène	0,3±0,1	0,14±0,12
Octen-3-one	1,4±0,6	1,6±0,2
β -Pinène	0,07±0,07	0,25±1,19
1-Octen-3-ol	0,02±0,03	0,08±0,10
Myrcène	11±7	6,9±7,2
Sabinène	0,06±0,04	0,17±0,07
α -Phellandrène	2±1	0,76±0,63
<i>o</i> -cimène	0,44±0,95	0,01±0,00
1,8-Cinéole	11±5	14±6
Limonène	6±2	3,7±6,7
δ -3-Carène	0,01±0,00	2±3
E- β -Ocymène	0,28±0,22	0,02±0,02
γ -Terpinène	0,4±0,3	0,5±0,2
<i>p</i> -Cymène	2,1±0,6	1,6±0,9
Linalol	0,8±0,7	0,5±0,2
<i>p</i> -Cyménone	0,5±0,2	0,5±0,2
Myrcénol	0,38±0,35	0,7±0,2
α -Campholénal	0,25±0,22	0,3±0,2
Camphre	23±9	26±7
Pinocarvone	0,05±0,05	0,23±0,07
α-Terpinéol	4±2	5±2
Terpinen-4-ol	0,45±0,42	0,8±0,1
Pinocamphone	0,4±0,2	0,4±0,2
Verbénone	1,1±0,4	2,2±0,5
Myrténol	0,9±0,2	1,5±0,3
Bornéol	0,09±0,08	0,17±0,10
Z-Ocyménone	0,5±0,7	0,05±0,05
<i>Cis</i> -Myrtanol	0,03±0,02	0,02±0,01
E-Ocyménone	0,07±0,09	0,05±0,06
<i>Trans</i> -Myrtanol	0,01±0,00	0,02±0,02
Acétate de linalyle	0,44±0,35	0,5±0,3
Acétate de bornyle	0,02±0,02	0,23±0,47
Z-3 Héxényl tiglate	0,06±0,08	0,04±0,05
Méthyl eugénol	0,25±0,24	0,08±0,13
β -Caryophyllène	0,15±0,20	0,04±0,04
β -Farnésène	1,1±0,7	0,65±0,63
Pourcentage de composés identifiés	99,7±0,3	99,7±0,2

*moyenne de 5 huiles essentielles par population

Malgré la faible variation de composition des huiles essentielles obtenues sur les deux sites, une analyse de co-inertie entre la composition des huiles essentielles et la concentration en ETMM du sol a été réalisée (Figure 4.6). Le premier axe représente 92,2% de la variabilité, alors que le deuxième représente 6,3% de la variabilité. Les deux principales composantes, les huiles essentielles et les ETMM, sont bien représentées sur le plan avec un rapport de 99% et de 76% pour les ETMM et les huiles essentielles, respectivement. Ceci met en évidence un lien entre la contamination en ETMM du sol et la composition des huiles essentielles (la corrélation entre la composante principale des ETMM et des HE est d'environ 0,7 pour l'axe 1 et l'axe 2 de la co-inertie). La figure 4.6 montre que As, Sb, Zn et Pb varient de la même façon et sont associés positivement aux cations linalyles et aux sesquiterpènes, alors qu'ils sont négativement corrélés aux lipides et cations bornyles. Cu, Fe et Mn forment un autre groupe qui est positivement associé aux composés phénoliques et négativement aux cations sabinyles. Les informations de certains groupes constituant les HE (cations pinyles, cations 4-terpinyles et les cations α -terpinyles) ne sont pas clairement liés aux ETMM.

Comme information supplémentaire, le détail des composés formant les terpènes est projeté en gris sur la figure 4.6. Sur le site non-contaminé (S3), le verbénone, le pino-carvone et le myrténol (monoterpènes, cations pinyles) ainsi que le sabinène (monoterpène, cation sabilyle) semblent plus représentés. Ils sont connus comme étant des composés odorants provenant des essences volatiles de fleurs et des huiles essentielles des plantes aromatiques. Ils sont considérablement utilisés en parfumerie (Croteau et al., 2000). D'autres composés comme le myrcène (monoterpène, cation linalyle), le β -farnésène et le β -caryophyllène (deux sesquiterpènes) semblent corrélés à la présence de As, Pb, Sb et Zn dans le sol. Une conséquence du stress lié à l'exposition des plantes aux ETMM est la génération d'espèces réactives à l'oxygène (ERO) (Yadav, 2010). Les composés antioxydants sont capables de limiter les effets destructeurs des ERO. Le potentiel antioxydant d'un composé dépend de sa capacité réductrice (Apak et al., 2007). L'observation de méthylation sur les sesquiterpènes, (présents en plus grande quantité dans les HE des romarins du site contaminé G0), pourrait leur conférer un potentiel de réduction plus important (Ben Sghaier et al., 2011) et donc de meilleures propriétés antioxydantes. Les deux types de biomolécules produites en plus grande quantité dans les romarins contaminés sont classés comme des terpénoïdes. Cependant, les sesquiterpénoïdes sont majoritairement produits dans le cytoplasme via la voie des acétates/mévalonates. Les monoterpénoïdes sont produits dans

les plastes via la voie des méthylérythritol phosphate indépendante des mévalonates (Davis and Croteau, 2000). Ce mécanisme n'est cependant pas encore totalement identifié. Ainsi, puisque deux voies de biosynthèse différentes sont impliquées dans la production des monoterpénoïdes et des sesquiterpénoïdes, les altérations de la composition chimique des HE ne semblent pas uniquement liées à l'oxydation induite par les ETMM, mais également à une régulation enzymatique mise en place par la plante pour lutter contre les conséquences négatives de la présence d'ETMM.

4.4. Conclusion

La présence du romarin sur les sites très contaminés en ETMM situés autour de l'ancienne usine de l'Escalette prouve qu'il s'agit d'une espèce tolérante. Les corrélations positives entre la concentration en thiols libres et la concentration en ETMM dans les parties aériennes mettent en évidence leur implication dans la tolérance du romarin (figure 4.7). La formation de complexes thiol-ETMM est possible, mais pour que cette hypothèse soit cohérente avec les résultats, ce phénomène doit être accompagné d'une augmentation de la synthèse de thiols. L'action de ces thiols libres comme antioxydants capables de lutter contre le stress oxydatif engendré par la présence d'ETMM est également envisageable. Il serait intéressant de doser la présence de thiols non libres afin de comprendre le rôle prédominant de ces thiols dans le romarin. Cependant, la faible corrélation entre les thiols libres et les concentrations en cystéine et glutathion, qui constituent généralement une grande part du "pool" de thiols libres dans les végétaux, permet d'avancer l'hypothèse de l'implication de phytochélatines, dont le rôle est essentiellement la détoxification des ETMM par chélation. Le dosage de ces polypeptides permettrait de confirmer ou d'infirmier cette hypothèse.

Cette étude a également permis de mettre en évidence les marqueurs physiologiques pouvant être pris en compte dans le cas du romarin. Ainsi, la comparaison des indices de chlorophylle et de phénols mesurés par une méthode non destructive, simple et rapide, peut donner une indication sur le niveau de contamination des parties aériennes d'un individu. Ce n'est pas le cas des indices de flavones et anthocyanes qui sont fortement influencés par le stade phénologique du romarin.

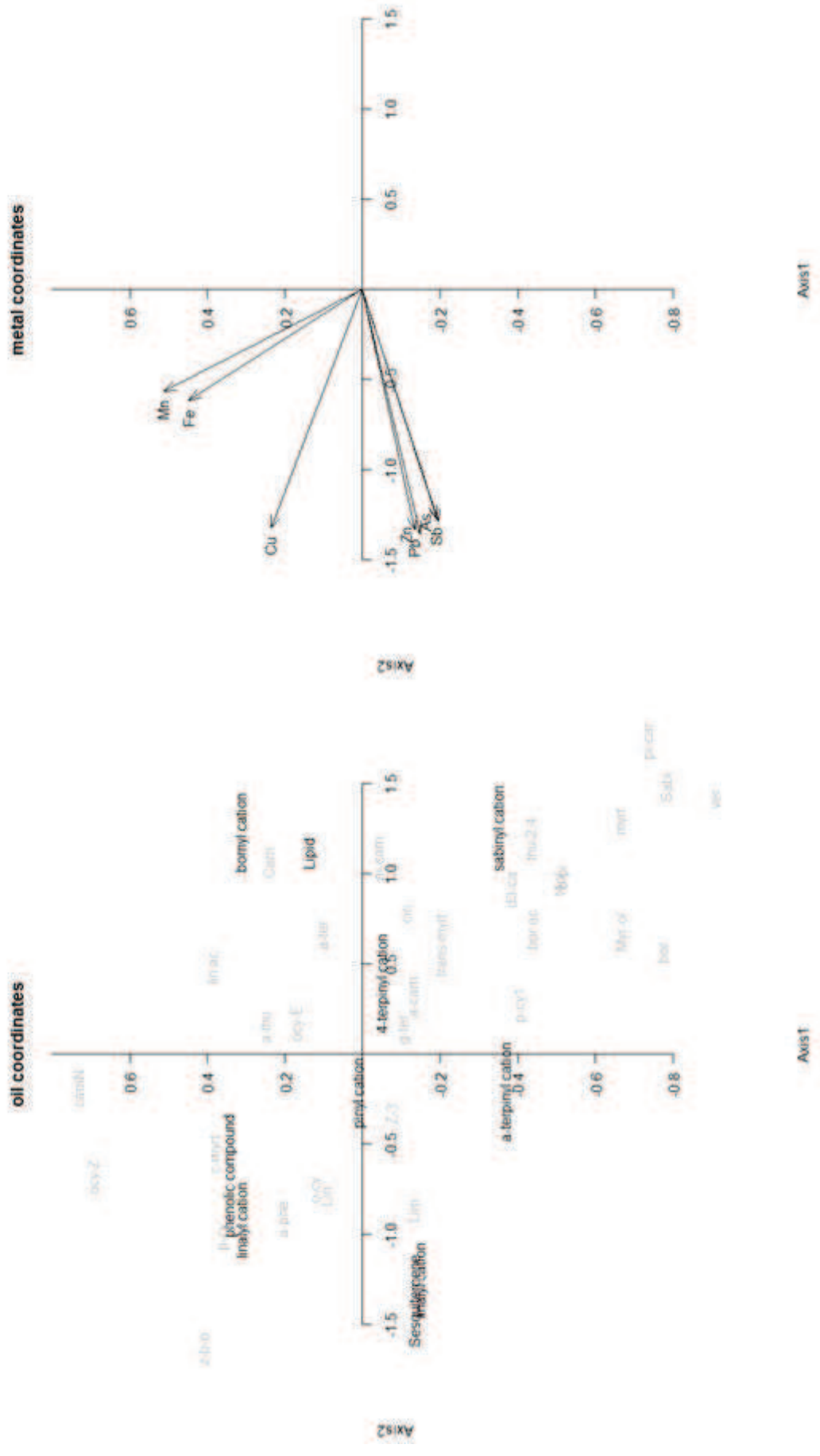


Figure 4.6 : Analyse de co-inertie entre la composition chimique des huiles essentielles et la contamination du sol en ETMM pour les romarins et les sites G0 et S3

Ces marqueurs ne peuvent toutefois pas être considérés comme des bio-indicateur d'un niveau de pollution du sol puisque le romarin semble mettre en place un système de filtre racinaire en cas de contamination importante. En effet, la concentration en ETMM dans les parties aériennes de romarin ne reflète pas le niveau de contamination du sol, contrairement à la concentration racinaire. Il semblerait que les ETMM soient stockés au niveau des racines, ce qui peut être lié à un mécanisme de tolérance mis en place par le romarin afin de limiter le transfert vers les parties aériennes, et ainsi limiter la dégradation de la chlorophylle et donc la diminution de la photosynthèse. Cependant, ce type de phénomène peut également être le fait de symbioses avec des champignons endomycorhiziens (Díaz et al., 1996; Chen et al., 2003), dont l'implication dans la tolérance aux ETMM a déjà été mise en évidence chez d'autres espèces (Hildebrandt et al., 1999).

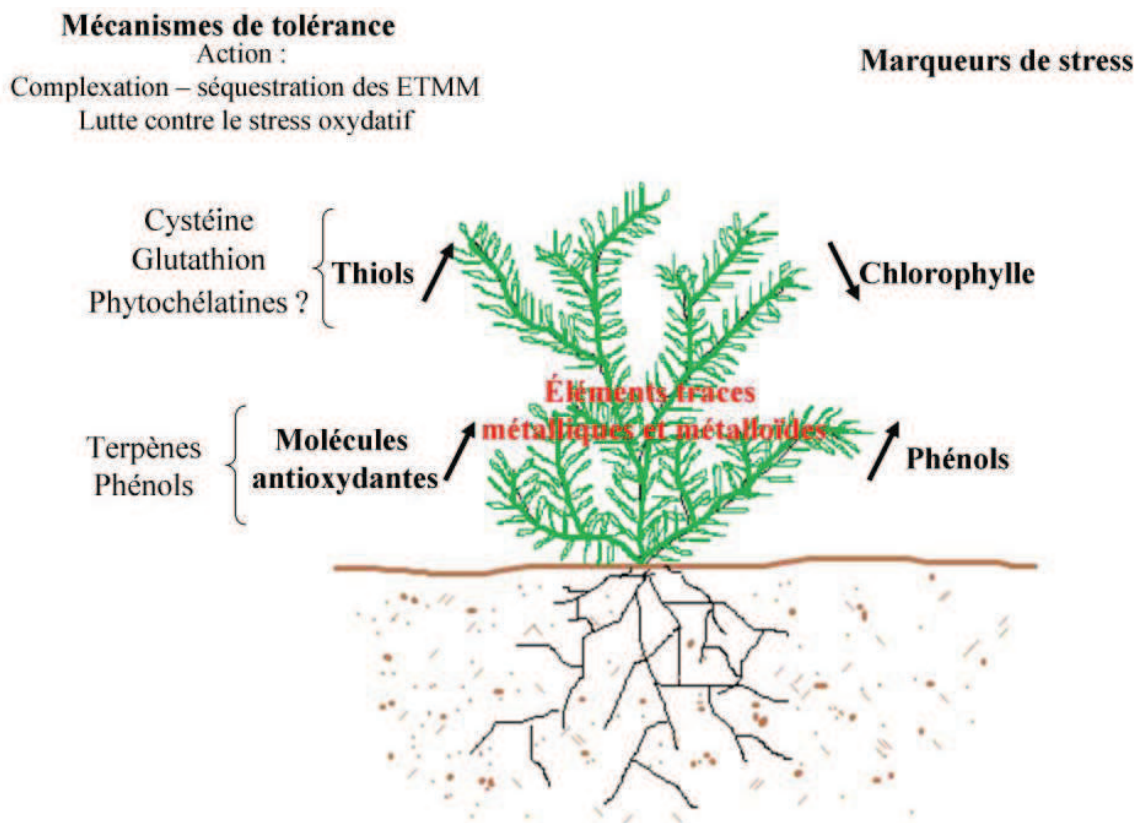


Figure 4.7 : schéma récapitulatif des mécanismes de tolérance mis en place par le romarin en cas de contamination par les ETMM dans le sol et des marqueurs du stress métallique.

Références bibliographiques

- Alberich A, Ariño C, Díaz-Cruz JM, Esteban M. Soft modelling for the resolution of highly overlapped voltammetric peaks: application to some Pb-phytochelatin systems. *Talanta* 2007;71:344–52.
- Alvarez-Legorreta T, Mendoza-Cozatl D, Moreno-Sanchez R, Gold-Bouchot G. Thiol peptides induction in the seagrass *Thalassia testudinum* (Banks ex König) in response to cadmium exposure. *Aquat. Toxicol.* 2008;86:12–9.
- Angioni A, Barra A, Cereti E, Barile D, Coïsson JD, Arlorio M, Dessi S, Coroneo V, Cabras P. Chemical Composition, Plant Genetic Differences, Antimicrobial and Antifungal Activity Investigation of the Essential Oil of *Rosmarinus officinalis* L. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:3530–5.
- Apak R, Güçlü K, Demirata B, Özyürek M, Çelik SE, Bektaşoğlu B, Berker KI, Özyurt D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* 2007;12:1496–547.
- Van Assche F, Clijsters H. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* 1990;13:195–206.
- Del Baño MJ, Lorente J, Castillo J, Benavente-García O, Marín MP, Del Río JA, Ortuño A, Ibarra I. Flavonoid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. postulation of a biosynthetic pathway. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:4987–92.
- Del Baño MJ, Lorente J, Castillo J, Benavente-García O, del Río JA, Ortuño A, Quirin K-W, Gerard D. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 2003;51:4247–53.
- Blankenship RE. Early Evolution of Photosynthesis. *Plant Physiol.* 2010;154:434–8.
- Boutekedjiret C, Bentahar F, Belabbes R, Bessiere JM. Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. *Flavour Fragr. J.* 2003;18:481–4.
- Briant M. Biosynthesis of amino acids. 2003.
- Briat J-F. Arsenic tolerance in plants: “Pas de deux” between phytochelatin synthesis and ABCC vacuolar transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010;107:20853–4.
- Chen B., Li X., Tao H., Christie P, Wong M. The role of arbuscular mycorrhiza in zinc uptake by red clover growing in a calcareous soil spiked with various quantities of zinc. *Chemosphere* 2003;50:839–46.
- Cobbett C, Goldsbrough P. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2002;53:159–82.

- Costa G, Spitz E. Influence of cadmium on soluble carbohydrates, free amino acids, protein content of in vitro cultured *Lupinus albus*. *Plant Sci.* 1997;128:131–40.
- Croteau R, Kutchan T, Lewis N. Natural Products (secondary metabolites). In: *Biochem. Mol. Biol. Plants*. American Society of Plant Physiologists; 2000. p. 1366.
- Cruz BH, Díaz-Cruz JM, Díaz-Cruz MS, Ariño C, Esteban M, Tauler R. Differential pulse polarographic study of the Pb(II) complexation by glutathione. *J. Electroanal. Chem.* 2001;516:110–8.
- Davies K, Schwinn K, Deroles S, Manson D, Lewis D, Bloor S, Bradley JM. Enhancing anthocyanin production by altering competition for substrate between flavonol synthase and dihydroflavonol 4-reductase. *Euphytica* 2003;131:259–68.
- Davis EM, Croteau R. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. *Biosynth. Aromat. Polyketides Isoprenoids Alkaloids* 2000;209:53–95.
- Díaz G, Azcón-Aguilar C, Honrubia M. Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. *Plant Soil* 1996;180:241–9.
- Engelsma G. Effect of Daylength on Phenol Metabolism in the Leaves of *Salvia occidentalis*. *Plant Physiol.* 1979;63:765–8.
- Epstein E. The anomaly of silicon in plant biology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994;91:11–7.
- Fast AG, Papoutsakis ET. Stoichiometric and energetic analyses of non-photosynthetic CO₂-fixation pathways to support synthetic biology strategies for production of fuels and chemicals. *Biotechnol. Bioprocess Eng. Process Syst. Eng.* 2012;1:380–95.
- Feix I, Tremel-Schaub A. Contamination des sols - Transfert des sols vers les plantes. ADEME. ZDP Sciences; 2005.
- Finnegan PM, Chen W. Arsenic Toxicity: The Effects on Plant Metabolism. *Front. Physiol.* 2012;3.
- Fukui Y, Tanaka Y, Kusumi T, Iwashita T, Nomoto K. A rationale for the shift in colour towards blue in transgenic carnation flowers expressing the flavonoid 3',5'-hydroxylase gene. *Phytochemistry* 2003;63:15–23.
- Gong J-M, Lee DA, Schroeder JI. Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatins and cadmium in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003;100:10118–23.
- Gou J-Y, Felippes FF, Liu C-J, Weigel D, Wang J-W. Negative Regulation of Anthocyanin Biosynthesis in *Arabidopsis* by a miR156-Targeted SPL Transcription Factor. *Plant Cell Online* 2011;23:1512–22.

- Grill E, Winnacker E, Zenk M. Phytochelatins - the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 1985;230:674–6.
- Gupta M, Rai U, Tripathi R, Chandra P. Lead induced changes in glutathione and phytochelatin in *hydrilla-verticillata (IF) royle*. *Chemosphere* 1995;30:2011–20.
- Hamid N, Bukhari N, Jawaid F. Physiological responses of *Phaseolus vulgaris* to different lead concentrations. *Pak. J. Bot.* 2010;v. 42(1).
- Hildebrandt U, Kaldorf M, Bothe H. The Zinc Violet and its Colonization by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *J. Plant Physiol.* 1999;154:709–17.
- Jacob-Wilk D, Holland D, Goldschmidt EE, Riov J, Eyal Y. Chlorophyll breakdown by chlorophyllase: isolation and functional expression of the Chlase1 gene from ethylene-treated Citrus fruit and its regulation during development. *Plant J.* 1999;20:653–61.
- Jozefczak M, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A. Glutathione Is a Key Player in Metal-Induced Oxidative Stress Defenses. *Int. J. Mol. Sci.* 2012;13:3145–75.
- Kerkeb L, Kramer U. The role of free histidine in xylem loading of nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea*. *Plant Physiol.* 2003;131:716–24.
- Kiss T, Gergely A. Critical survey of stability constants of complexes of glycine. *Pure Appl. Chem.* 1991;63:597–638.
- Kramer U, Cotter-Howells JD, Charnock JM, Baker AJM, Smith JAC. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 1996;379:635–8.
- Liao MT, Hedley MJ, Woolley DJ, Brooks RR, Nichols MA. Copper uptake and translocation in chicory (*Cichorium intybus* L. cv. *Grasslands Puna*) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. *Rondy*) plants grown in NFT system. I. Copper uptake and distribution in plants. *Plant Soil* 2000;221:135–42.
- Madaan R, Kumar S, Bansal G, Sharma A. Estimation of total phenols and flavonoids in extracts of *actaea spicata* roots and antioxidant activity studies. *Indian J. Pharm. Sci.* 2011;73:666.
- Michalak A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Pol. J. Environ. Stud.* 2006;15:523–30.
- Moreno E, Penalosa J, Esteban E, Carpena RO. Trace elements accumulation and phytotoxicity in Mediterranean shrubs after a treatment with pyritic sludge. In: *Improv. Phytotechnologies. COST Action 859, VGTU Press Technica: Vilnius; 2007. p. 190–2.*
- Moreno-Jiménez E, Gamarra R, Carpena-Ruiz RO, Millán R, Peñalosa JM, Esteban E. Mercury bioaccumulation and phytotoxicity in two wild plant species of Almadén area. *Chemosphere* 2006;63:1969–73.

- Morona JK, Morona R, Miller DC, Paton JC. *Streptococcus pneumoniae* Capsule Biosynthesis Protein CpsB Is a Novel Manganese-Dependent Phosphotyrosine-Protein Phosphatase. *J. Bacteriol.* 2002;184:577–83.
- Noctor G, Arisi A-CM, Jouanin L, Kunert KJ, Rennenberg H, Foyer CH. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J. Exp. Bot.* 1998;49:623–47.
- Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, Marquez-Garcia B, Queval G, Foyer CH. Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ.* 2012;35:454–84.
- Noctor G, Strohm M, Jouanin L, Kunert KJ, Foyer CH, Rennenberg H. Synthesis of Glutathione in Leaves of Transgenic Poplar Overexpressing [gamma]-Glutamylcysteine Synthetase. *Plant Physiol.* 1996;112:1071–8.
- Noda N, Kanno Y, Kato N, Kazuma K, Suzuki M. Regulation of gene expression involved in flavonol and anthocyanin biosynthesis during petal development in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). *Physiol. Plant.* 2004;122:305–13.
- Page V, Weisskopf L, Feller U. Heavy metals in white lupin: uptake, root-to-shoot transfer and redistribution within the plant. *New Phytol.* 2006;171:329–41.
- Pickering IJ, Prince RC, George MJ, Smith RD, George GN, Salt DE. Reduction and Coordination of Arsenic in Indian Mustard. *Plant Physiol.* 2000;122:1171–8.
- Raab A, Feldmann J, Meharg AA. The Nature of Arsenic-Phytochelatin Complexes in *Holcus lanatus* and *Pteris cretica*. *Plant Physiol.* 2004;134:1113–22.
- Raab A, Schat H, Meharg AA, Feldmann J. Uptake, translocation and transformation of arsenate and arsenite in sunflower (*Helianthus annuus*): formation of arsenic-phytochelatin complexes during exposure to high arsenic concentrations. *New Phytol.* 2005;168:551–8.
- Rennenberg H, Schmitz K, Bergmann L. Long-distance transport of sulfur in *Nicotiana tabacum*. *Planta* 1979;147:57–62.
- Salt DE, Prince RC, Baker AJM, Raskin I, Pickering IJ. Zinc Ligands in the Metal Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* As Determined Using X-ray Absorption Spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 1999;33:713–7.
- Scheller HV, Huang B, Hatch E, Goldsbrough PB. Phytochelatin Synthesis and Glutathione Levels in Response to Heavy Metals in Tomato Cells 1. *Plant Physiol.* 1987;85:1031–5.
- Seregin IV, Ivanov VB. Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 2001;48:523–44.
- Sethi A, Sharma RA. Antioxidant activity with total phenolic constituent from *Aerva Tomentosa* Forsk. *Int. J. Pharma Io Sci.* 2011;2:596–603.

- Ben Sghaier M, Skandrani I, Nasr N, Franca M-GD, Chekir-Ghedira L, Ghedira K. Flavonoids and sesquiterpenes from *Teucrium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure–activity relationship study. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2011;32:336–48.
- Shakya K, Chettri MK, Sawidis T. Impact of Heavy Metals (Copper, Zinc, and Lead) on the Chlorophyll Content of Some Mosses. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2007;54:412–21.
- Sharma P, Dubey RS. Lead toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 2005;17:35–52.
- Stepansky A, Leustek T. Histidine biosynthesis in plants. *Amino Acids* 2006;30:127–42.
- Subramanyam C, Venkateswerlu G. The effect of copper on histidine biosynthesis in *Neurospora crassa*. *J. Biosci.* 1979;1:143–9.
- Sun Q, Ye ZH, Wang XR, Wong MH. Cadmium hyperaccumulation leads to an increase of glutathione rather than phytochelatins in the cadmium hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *J. Plant Physiol.* 2007;164:1489–98.
- Thomas Ruley A, Sharma NC, Sahi SV. Antioxidant defense in a lead accumulating plant, *Sesbania drummondii*. *Plant Physiol. Biochem.* 2004;42:899–906.
- Tiffin LO. Iron Translocation I. Plant Culture, Exudate Sampling, Iron-Citrate Analysis. *Plant Physiol.* 1966;41:510–4.
- Tiffin LO. Translocation of manganese, iron, cobalt, and zinc in tomato. *Plant Physiol.* 1967;42:1427–32.
- Todorov DT, Karanov EN, Smith AR, Hall MA. Chlorophyllase Activity and Chlorophyll Content in Wild Type and eti 5 Mutant of *Arabidopsis thaliana* Subjected to Low and High Temperatures. *Biol. Plant.* 2003;46:633–6.
- Vadas TM, Ahner BA. Extraction of Lead and Cadmium from Soils by Cysteine and Glutathione. *J. Environ. Qual.* 2009;38:2245–52.
- White MC. Metal Complexation in Xylem Fluid: II. theoretical equilibrium model and computational computer program. *Plant Physiol.* 1981;67:301–10.
- Wysocki R, Clemens S, Augustyniak D, Golik P, Maciaszczyk E, Tamás MJ, Dziadkowiec D. Metalloid tolerance based on phytochelatins is not functionally equivalent to the arsenite transporter Acr3p. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003;304:293–300.
- Yabuya T, Nakamura M, Iwashina T, Yamaguchi M, Takehara T. Anthocyanin-flavone copigmentation in bluish purple flowers of Japanese garden iris (*Iris ensata Thunb.*). *Euphytica* 1997;98:163–7.
- Yadav SK. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South Afr. J. Bot.* 2010;76:167–79.

Chapitre 5 :

**Evaluation du potentiel de
phytostabilisation *in situ* du romarin
et estimation de la contribution des
symbioses racinaires**

Comme vu précédemment, les ETMM sont accumulés au niveau des racines des romarins. Il est alors intéressant de chercher à approcher les mécanismes liés à ces accumulations, et en particulier le rôle des symbioses racinaires.

5.1. Evaluation de l'accumulation racinaire et des facteurs de bioconcentration et de translocation

5.1.1. Accumulation racinaire

La concentration en ETMM dans les racines de romarin semble corrélée linéairement avec la concentration pseudo-totale du sol (figure 5.1, échelle logarithmique). En effet, une corrélation linéaire et significative (test de Pearson $p < 0,05$) a été mise en évidence pour As, Pb, Sb et Zn avec un coefficient de corrélation de 0,52, 0,56, 0,52 et 0,7 respectivement. Cette proportionnalité entre la concentration en ETMM dans le sol et la concentration dans les racines correspond également à la définition d'une espèce indicatrice selon Baker (1981). Elle suggère également une absorption majoritairement passive pour Zn, et au moins en partie passive pour As, Pb et Sb. Ce type d'absorption se fait le long de la voie apoplastique par convection avec le flux d'eau entrant par le phénomène d'évapotranspiration (Tschan et al., 2009).

Les corrélations entre la concentration en ETMM dans les racines et la concentration mobilisable et échangeable du sol ont été déterminées pour tous les sites (tableau 5.1). Il est considéré que ces concentrations, et particulièrement les concentrations échangeables obtenues par extraction au nitrate de calcium, représentent mieux les concentrations disponibles pour la plante (Chojnacka et al., 2005). Les coefficients de corrélation (test de Pearson, $p < 0,05$) ne mettent pas en évidence de corrélation beaucoup plus forte entre les extraits d'ETMM mobilisables ou échangeables et les ETMM dans les racines. Le contraire est même observé dans le cas de As et de Sb pour les deux types d'extraction et pour Pb dans le cas des concentrations échangeables. Ceci peut être expliqué par le fait que dans le sol, As et Sb sont présents majoritairement sous forme anionique, contrairement aux autres éléments (Anawar et al., 2008; Wilson et al., 2010). Les extractants utilisés sont moins bien adaptés à l'extraction de As et de Sb comme reporté précédemment dans la littérature (Anawar et al., 2008; Ettler et al., 2010).

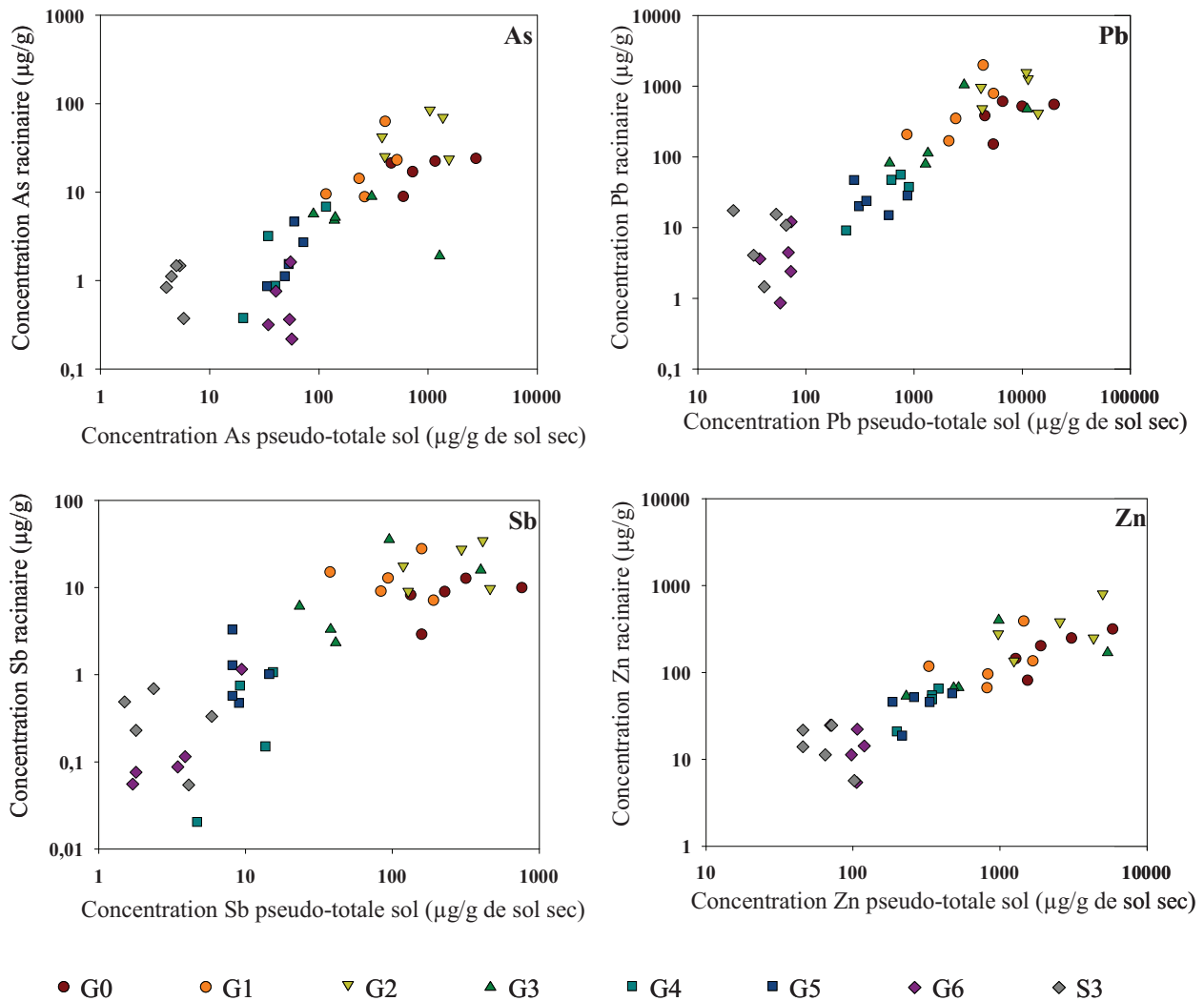


Figure 5.1: concentrations racinaires en fonction des concentrations pseudo-totales dans les sols pour As, Pb, Sb et Zn (échelle logarithmique). De G0 à G6 : points du transect, S3 : site référence

Concernant Pb et Zn, la meilleure corrélation entre la concentration dans les racines et la concentration dans le sol est obtenue avec la fraction mobilisable (extraite à l'EDTA) avec des coefficients de corrélation de 0,63 et 0,73 pour Pb et Zn respectivement. Ces corrélation sont légèrement supérieures à celles obtenues avec la concentration pseudo-totale du sol, elles même supérieures à celles obtenues avec la fraction échangeable. Ces résultats sont en contradictions avec ce qui a pu être mis en évidence dans la littérature, à savoir que l'utilisation d'extractant moins fort que l'EDTA, comme le nitrate de calcium utilisé dans ce cas, permettraient de mieux approcher la fraction phytodisponible (Chojnacka et al., 2005). Cependant, ils sont cohérents avec les travaux réalisés par Testiati (2012) sur des sols provenant de l'enceinte de l'ancienne

usine de l'Escalette, qui observe également une corrélation plus importante entre les concentrations racinaires et la fraction mobile qu'avec la fraction échangeable pour Pb et Zn.

Tableau 5.1 : valeurs des coefficients de corrélation de Pearson ($p < 0,05$) entre les concentrations pseudo-totales, mobilisables et échangeables des sols, et les concentrations racinaires des romarins pour As, Pb, Sb et Zn au niveau des différents sites du transect et de S3.

	[sol] pseudo-totale				[sol] mobilisable				[sol] échangeable			
	As	Pb	Sb	Zn	As	Pb	Sb	Zn	As	Pb	Sb	Zn
[As] _{racinaire}	0,52	0,60	0,55	0,53	0,33	0,7	0,35	0,58	0,39	0,42	0,45	0,41
[Pb] _{racinaire}	0,49	0,56	0,54	0,55	0,32	0,63	0,33	0,55	0,34	0,43	0,41	0,42
[Sb] _{racinaire}	0,49	0,54	0,52	0,56	0,28	0,61	n.s	0,59	0,33	0,32	0,41	0,51
[Zn] _{racinaire}	0,65	0,68	0,68	0,70	0,47	0,71	0,47	0,73	0,44	0,44	0,56	0,62

n.s : corrélation non significative, en gras : corrélations pour un même élément

Il est à noter également que les concentrations en Zn dans les racines semblent corrélées positivement ($r > 0,65$) avec les concentrations de Pb, As et Sb pseudo-totales dans les sols, et avec Pb mobilisable ($r > 0,7$). Les concentrations en As dans les racines semblent également corrélées positivement ($r > 0,6$) avec celles en Pb pseudo-totales et mobilisables.

5.1.2. Facteurs de bioaccumulation racinaire et de translocation

Les facteurs de bioconcentration racinaire correspondent au rapport entre les concentrations en ETMM dans les racines et les concentrations en ETMM pseudo-totales dans le sol. Les valeurs de ce facteur pour As, Pb, Sb et Zn de chaque site sont présentées figure 5.2. Les valeurs des BCF sont faibles pour tous les éléments, sauf Cu, pour lequel quelques individus présentent des valeurs de BCF supérieures à 1 (BCF de 1,8 pour un individu de G1 par exemple), mettant en évidence que le romarin n'est pas apte à l'hyperaccumulation des ETMM dans ses racines. En effet, les valeurs des BCF racinaires moyennes pour tous les sites sont comprises entre [0,02 et 0,23], [0,05 et 0,26], [0,03 et 0,17] et entre [0,08 et 0,24] pour As, Pb, Sb et Zn respectivement. Pour ces éléments, les valeurs moyennes maximales ont été obtenues sur le site le moins contaminé, S3. Cependant, sur ce site, malgré une faible variabilité de la contamination, les valeurs de BCF racinaire sont très dispersées (annexe 10). La figure 5.2 montre des BCF racinaires avec des différences souvent non significatives entre les sites, mettant en évidence que la capacité de bioconcentration des racines de romarin n'est pas influencée par le niveau de

contamination, et ce, pour des gammes de concentrations très larges, notamment concernant Pb, laissant penser à l'implication de mécanismes de transfert actifs. Ceci paraît cohérent, puisque les concentrations racinaires et pseudo-totales du sol suivent une corrélation linéaire (figure 5.1). De plus, il semble que le romarin n'accumule pas préférentiellement un élément plus qu'un autre dans ces racines, puisque pour les éléments analysés, excepté Cu pour qui les valeurs de BCF moyens sont plus importantes (entre 0,3 et 1,3), les valeurs de BCF restent du même ordre de grandeur quelque soit l'élément considéré.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Moreno-Jimenez et al. (2011) sur la même espèce. En effet, pour des concentrations pseudo-totales dans les sols proches, les BCF racinaires calculés dans le cadre des travaux de Moreno-Jimenez et al. (2011) sont de 0,025, 0,64 et 0,1 contre de [0,06 à 0,03], de [0,3 à 0,5] et de [0,13 à 0,17] dans notre cas, pour As, Cu et Zn respectivement. Malheureusement aucune donnée n'existe à notre connaissance concernant Pb et Sb dans le romarin. Concernant Pb, les travaux menés par Testiati (2012) sur le site de l'ancienne usine de l'Escalette mettent en évidence des BCF compris entre 0,02 et 0,26, ce qui est en accord avec les résultats trouvés au cours de cette étude, puisque pour des gammes de contamination du sol similaires (entre 1500 et 24000 $\mu\text{g/g}$), les BCF sont compris en 0,02 et 0,36.

Bien que les fractions extraites à l'EDTA et au $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ne semblent pas représenter significativement la fraction phytodisponible, les concentrations d'ETMM pseudo-totales du sol la surestime probablement largement. Ainsi, les facteurs de bioconcentration racinaire ont été calculés à partir des concentrations en ETMM échangeables et mobilisables afin d'approcher au mieux la capacité d'accumulation de la plante (Komarek et al., 2007, tableau 5.2).

Les BCF dans le cas de la fraction mobilisable sont beaucoup plus importants que ceux calculés à partir de la fraction totale, avec des valeurs comprises entre [0,02 et 81], [0,05 et 2,10], [0,08 et 45], [0,16 et 790] pour As, Pb, Sb et Zn respectivement (annexe 11). Dans ce cas encore, les BCF moyens ne sont pas supérieurs à 1 pour Pb. Des valeurs supérieures à 1 ont, par contre, été mises en évidence pour As, Sb et Zn, particulièrement pour les sites peu contaminés.

Concernant les BCF calculés à partir des concentrations échangeables, les valeurs sont comprises entre [2,1 et 473], [14 et 82159], [1,1 et 360], [3,6 et 858] pour As, Pb, Sb et Zn, respectivement (annexe 12). Les BCF moyens sont dans ce cas tous supérieurs à 1, avec des valeurs particulièrement élevées pour Pb pour les sites les plus contaminés.

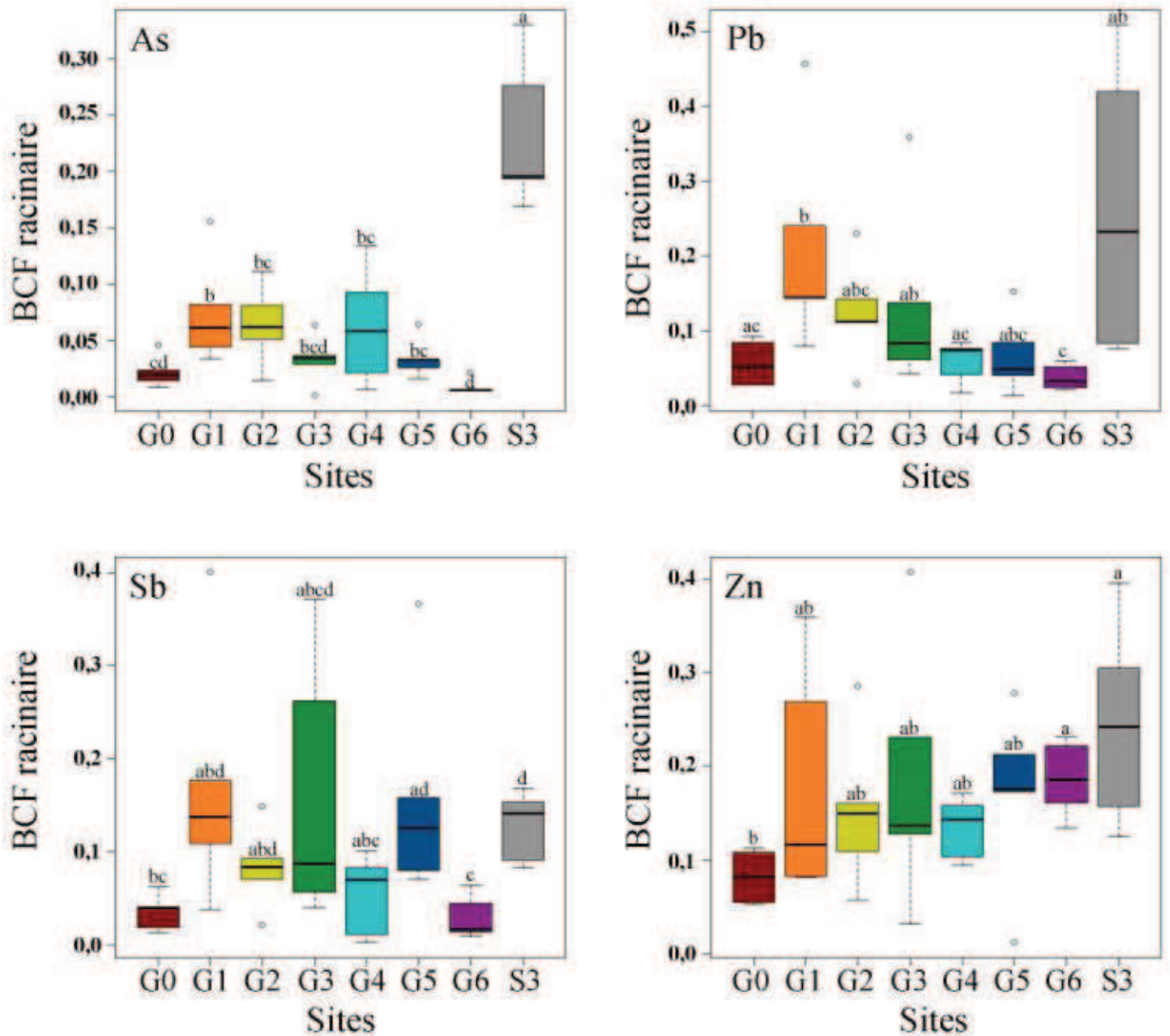


Figure 5.2 : facteurs de bioconcentration racinaire moyens pour As, Pb, Sb et Zn obtenus sur tous les sites étudiés. De G0 à G6 : points du transect, S3 : site référence. Les boîtes à moustaches surmontées d'une même lettre ne présentent pas de différence significative (test Wilcoxon $p < 0,05$)

Tableau 5.2 : facteurs de bioconcentration racinaire moyens \pm écart-type calculés avec les concentrations en ETMM mobilisables et échangeables dans les sols pour As, Pb, Sb et Zn sur tous les sites étudiés.

Sites*	Valeurs calculées	Eléments			
		As	Pb	Sb	Zn
G0	BCF échangeable	33 \pm 11	836 \pm 599	6,3 \pm 1,7	110 \pm 78
	BCF mobilisable	0,34 \pm 0,43	0,20 \pm 0,13	1,0 \pm 0,7	0,49 \pm 0,22
G1	BCF échangeable	246 \pm 146	2702 \pm 2500	77 \pm 41	350 \pm 319
	BCF mobilisable	1,2 \pm 0,79	0,42 \pm 0,36	6,2 \pm 3,5	1,3 \pm 0,8
G2	BCF échangeable	162 \pm 73	1452 \pm 816	35 \pm 21	202 \pm 242
	BCF mobilisable	0,98 \pm 0,75	0,29 \pm 0,15	2,9 \pm 1,9	0,72 \pm 0,38
G3	BCF échangeable	42 \pm 25	17632 \pm 36097	57 \pm 39	258 \pm 139
	BCF mobilisable	1,9 \pm 2,2	0,33 \pm 0,30	12 \pm 10	1,1 \pm 0,7
G4	BCF échangeable	80 \pm 80	4557 \pm 5083	115 \pm 150	123 \pm 103
	BCF mobilisable	9,3 \pm 9,6	0,16 \pm 0,05	5,3 \pm 4,3	0,62 \pm 0,42
G5	BCF échangeable	24 \pm 12	49 \pm 32	69 \pm 57	130 \pm 155
	BCF mobilisable	29 \pm 48	0,19 \pm 0,17	19,8 \pm 19,2	140 \pm 311
G6	BCF échangeable	136 \pm 102	-	55 \pm 43	139 \pm 109
	BCF mobilisable	13 \pm 13	0,16 \pm 0,07	2,2 \pm 2,6	1,7 \pm 0,4
S3	BCF échangeable	41 \pm 48	1424 \pm 978	66 \pm 50	277 \pm 220
	BCF mobilisable	2,5 \pm 1,1	0,67 \pm 0,47	5,1 \pm 1,7	1,7 \pm 1,1

*De G0 à G6 : points du transect, S3 : site référence

Le facteur de translocation (TF) correspond au rapport de concentration en ETMM dans les parties aériennes et dans les racines. Il permet de mettre en évidence la capacité d'une plante à transporter les ETMM vers les parties aériennes. Dans le cas d'un processus de phytostabilisation, un facteur de translocation inférieur à 1 est préconisé, puisque la présence en grande concentration des ETMM dans les parties aériennes n'est pas souhaitée.

La figure 5.3 présente les TFs de As, Pb, Sb et Zn obtenus en fonction de la concentration pseudo-totale de ces éléments dans les sols. Compte tenu de la large gamme de TF et de concentrations en éléments du sol dans cette étude, une échelle logarithmique a été utilisée. Les résultats montrent des facteurs de translocation supérieurs à 1 pour As, Pb, Sb et Zn sur les sites les moins contaminés, et principalement sur le site G6, où ils atteignent 3,3, 5,7, 6,3 et 2,5

respectivement (annexe 13). Cependant, ils diminuent fortement et linéairement dès que les concentrations dans le sol augmentent puisque des corrélations linéaires significatives (test de Pearson pour $\log(\text{TF})$ et $\log(C_{\text{sol}})$, $p < 0,05$) de -0,55, -0,71, -0,73 et -0,81 ont été mise en évidence pour As, Pb, Sb et Zn respectivement. Ainsi, sur les sites contaminés, les TF moyens sont très inférieurs à 1 puisqu'ils sont sur G0 par exemple, en moyenne de 0,02, 0,03, 0,06 et 0,36 pour As, Pb, Sb et Zn respectivement. Ces valeurs de TF sont cohérentes avec celles présentées par Moreno-Jimenez et al. (2011) concernant la même espèce. En effet, pour des sites avec des concentrations sol pseudo-totales dans les sols équivalente, Moreno-Jimenez et al. (2011) ont trouvé des valeurs de TFs de 0,98 et 2,10, qui sont, dans notre cas de [0,5 à 2,0] et de [1,2 à 2,7] pour As et Zn respectivement. Ainsi, pour As, Pb, Sb et Zn, lorsque la concentration en ETMM augmente dans le sol et dans les racines, la translocation, elle, ne semble pas augmenter. Le romarin limite le passage de ces ETMM dans les parties aériennes, ce qui est caractéristique des plantes tolérantes mais non hyperaccumulatrices (Fitz and Wenzel, 2002). Pourtant, les travaux menées sur le site de l'Escalette par Testiati (2012) ont mis en évidence, pour le romarin des facteurs de translocation concernant Pb compris entre 0,3 et 0,84 sur des zones où les concentrations en ETMM dans le sol (fraction pseudo-totale, mobilisable et échangeable) étaient généralement équivalentes ou supérieures aux concentrations mesurées dans le cas présent, alors que sur les sites les plus contaminés de notre étude les TFs sont inférieurs à 0,1.

Un élément ne semble pas suivre ce modèle : le cuivre. Les valeurs de TFs pour Cu sont en moyenne proches de 1, et ce, même pour les sites les plus contaminés (par exemple TF = 1,1 pour G0 et 0,8 pour G2). Ainsi, il semble cependant que les facteurs de translocation de Cu et Zn ($\text{TF}_{\text{min}} = 0,17$ pour Zn) soient plus importants, même pour les plus fortes contaminations. Ceci peut être lié au fait qu'il s'agisse d'oligo-éléments essentiels au fonctionnement de la plante, ou à la contamination qui couvre une gamme de concentration moins importante pour ces deux éléments. Il est probable qu'à des concentrations plus importantes de Cu et Zn, les TFs diminuent et atteignent des valeurs plus faibles comme pour As, Pb et Sb.

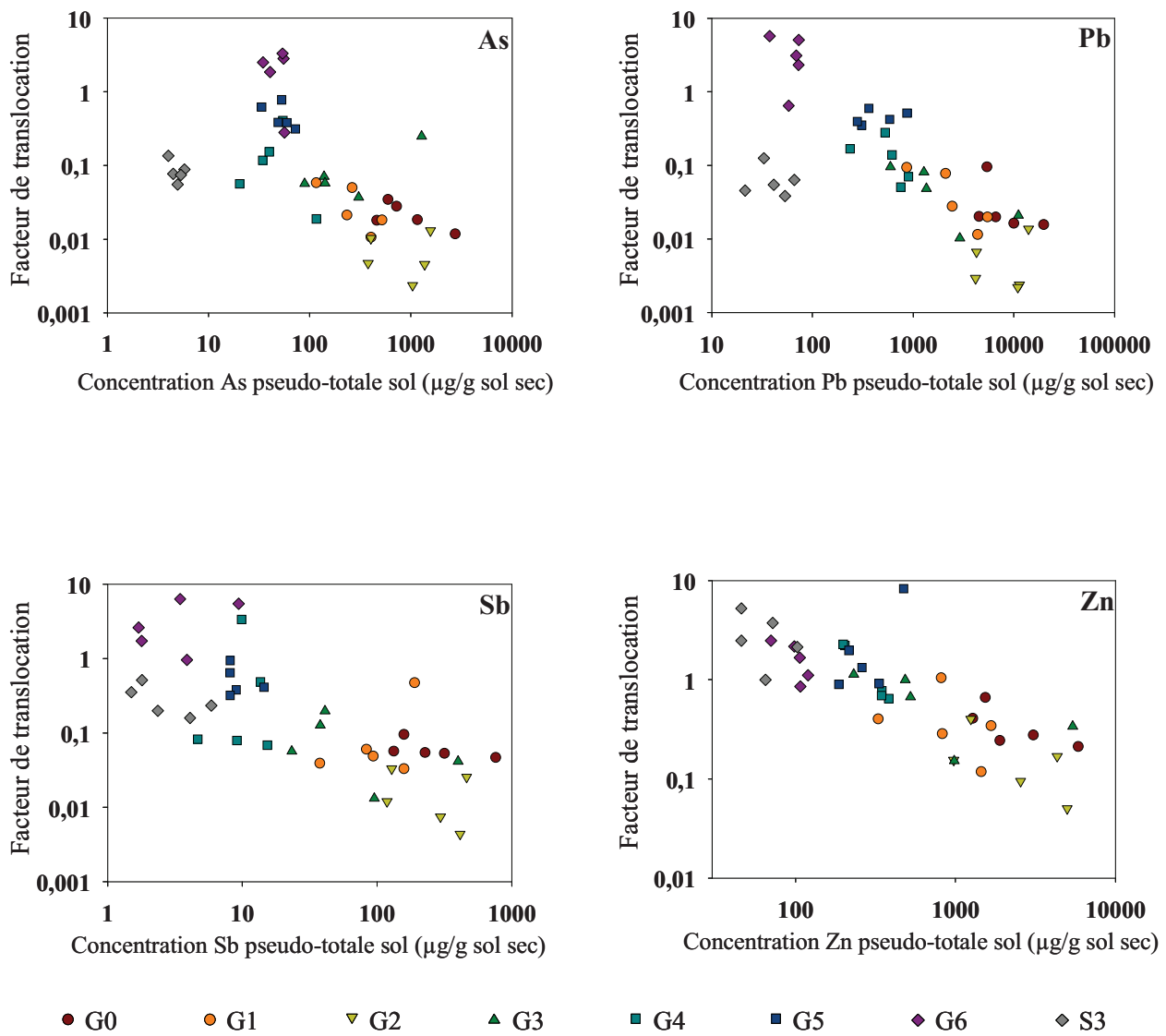


Figure 5.3: facteurs de translocation de As, Pb, Sb et Zn dans les romarins en fonction de la concentration pseudo-totale dans les sols en ETMM (échelle logarithmique). De G0 à G6 : points du transect, S3 : site référence

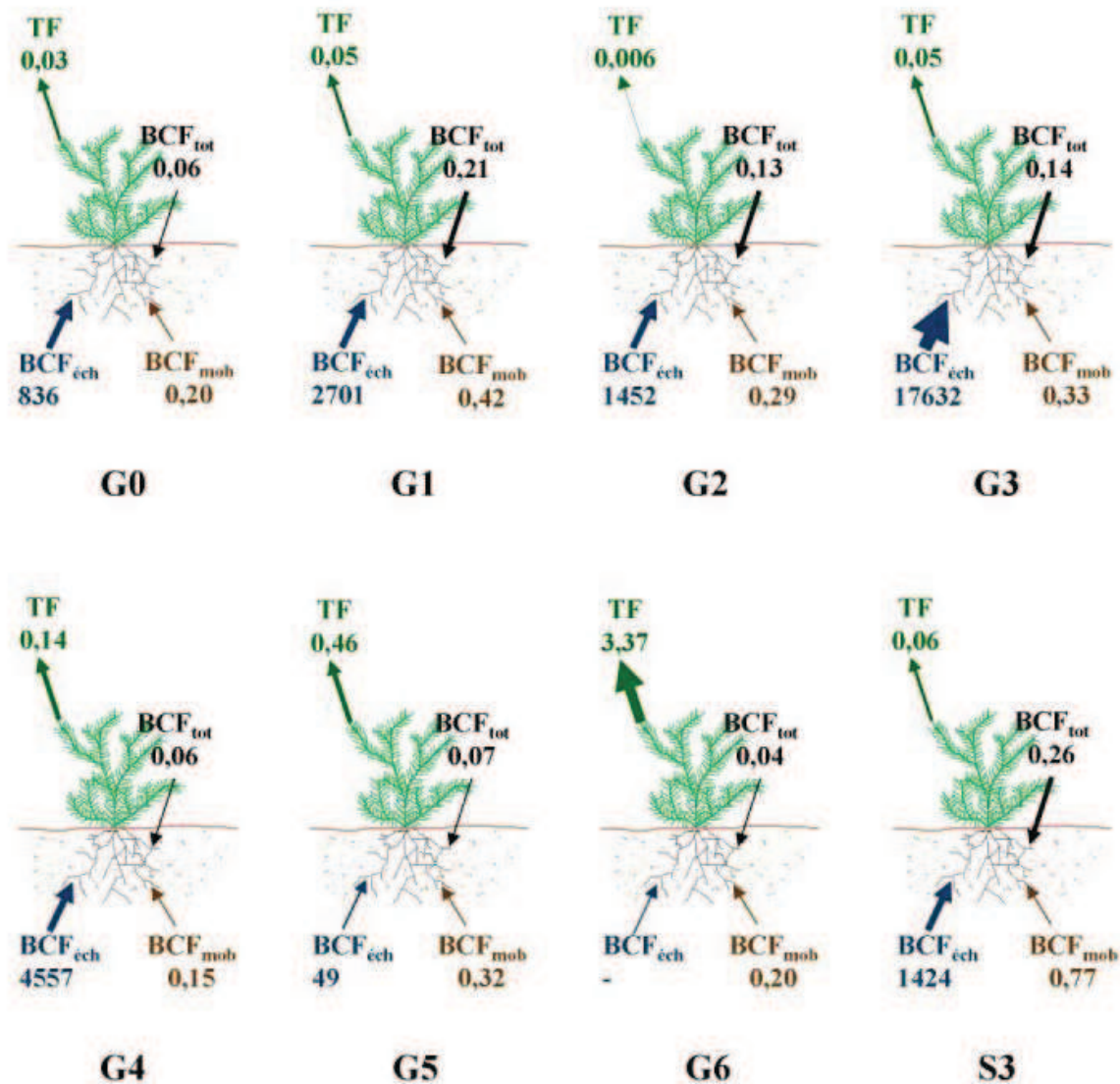


Figure 5.4 : résumé des valeurs de moyennes TF et BCF pour le plomb par site (de G0 à G6 : points du transect, S3 : site référence). BCF_{tot} : facteur de bioconcentration calculé à partir de la concentration en ETMM pseudo-totale du sol, BCF_{mob} : facteur de bioconcentration calculé à partir de la concentration en ETMM mobilisable du sol, BCF_{éch} : facteur de bioconcentration calculé à partir de la concentration en ETMM échangeable du sol, TF : facteur de translocation.

Les résultats concernant l'accumulation de Pb dans les racines et leur translocation sont résumés figure 5.4. La forte hétérogénéité de la contamination sur les sites rend difficile une interprétation à partir des valeurs moyennes; bien que, dans le cas de Pb une augmentation des TFs semble liée à une diminution des concentrations dans les sols, ainsi qu'à une tendance à la diminution de la bioconcentration de cet élément dans les racines. Cependant, les individus de S3 semblent avoir un comportement un peu particulier pouvant être lié à la très faible contamination à laquelle ils sont soumis.

5.2. Détermination de l'implication des symbioses racinaires

Les symbioses racinaires, particulièrement les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA), peuvent avoir un effet important sur la tolérance et l'absorption des ETMM dans les plantes (Gohre and Paszkowski, 2006). Ces symbioses favorisent également la nutrition des végétaux, notamment en phosphore, et donc leur croissance et leur santé (Barea et al., 2002; Harrison, 1999). Comme plus de 80% des espèces végétales (Harrison, 1999), le romarin peut être colonisé par les champignons symbiotiques (Estaún et al., 1997; Sánchez-Blanco et al., 2004; Sánchez-Castro et al., 2012; Turrini et al., 2010), du genre *Glomus* en particulier (Turrini et al., 2010; Sánchez-Castro et al., 2012). Dans le cas du romarin, il a été mis en évidence que ces symbioses amélioreraient le statut hydrique de la plante, en favorisant la résistance au stress hydrique (Sánchez-Blanco et al., 2004), et augmentaient la survie et la croissance des romarins dans le cadre d'un processus de revégétalisation (Estaún et al., 1997). Dans le cas présent, des symbioses ont également été mises en évidence dans le romarin (figure 5.5) et dénombrées.

Aucune différence significative entre les taux de colonisation moyens en fonction de la contamination des sols n'a pu être observée. Cependant, les déviations standards relatives sont très élevées (annexe 14) pouvant masquer les différences qui semblent indiquer, aux vues des moyennes, que les sites les plus contaminés présentent une colonisation moyenne plus importante que les sites moins contaminés. Ceci peut être dû à la forte hétérogénéité de la contamination au sein d'un même site. Ainsi, afin de pouvoir déterminer s'il existe une corrélation entre la contamination du sol et le taux de colonisation, un test de corrélation de Pearson a été réalisé en utilisant les données des couples « individu de romarin »-« sol rhizosphérique » correspondant. Les résultats (figure 5.6) montrent une corrélation positive significative (test de Pearson, $p < 0,05$). Ainsi, le taux de colonisation augmente avec la contamination du sol. Cette corrélation est relativement plus importante pour As, Pb, Sb et Zn puisque les coefficients de corrélation sont supérieurs à 0,6 pour ces 4 éléments. Même si des résultats similaires (Whitfield et al., 2004) ont été mis en évidence, dans la littérature des résultats divergents existent. En effet, plusieurs recherches montrent une diminution de la colonisation mycorhizienne avec l'augmentation de la concentration en ETMM dans le sol (Al-Ghamdi and Jais, 2012; del Val et al., 1999; Val et al., 1999; Andrade et al., 2004; Gildon and Tinker, 1983; Ruyi et al., 2008). Il semble que les

souches de CMA présentent dans les sols autour de l'Escalette se soient adaptées et soient résistantes aux fortes contaminations en ETMM.

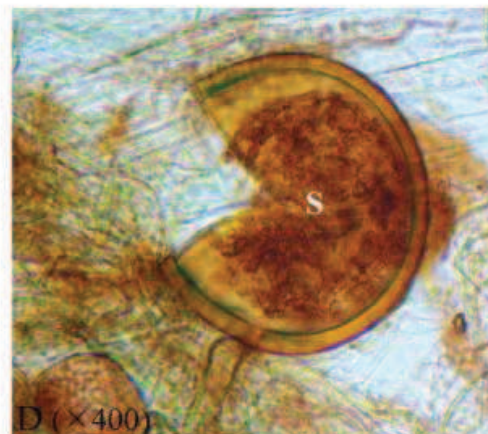
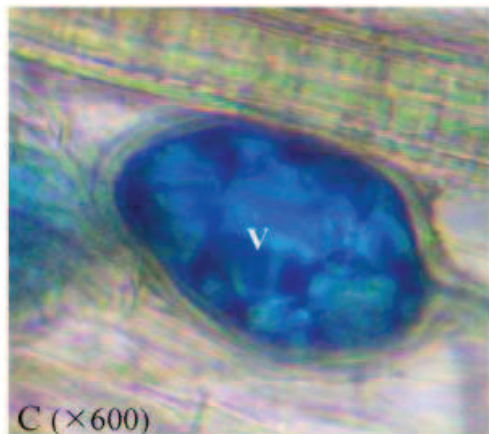
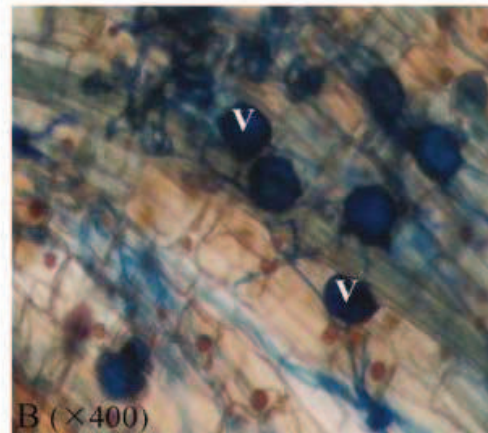
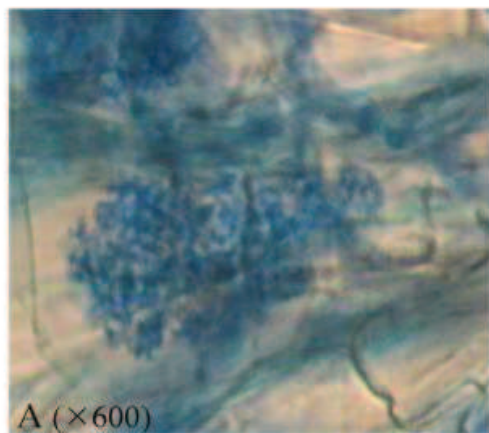


Figure 5.5 : photos des structures fongiques formées par des champignons endomycorhiziens dans les racines de romarin. Grossissement entre parenthèse A : arbuscule intra-cellulaire ; B : racine de romarin colonisé, présentant des vésicules (V) et des filaments mycéliens ; C : détail d'une vésicule; D : spore (S) ouverte de champignon, E: mycélium extra-radicalaire endomycorhizien.

Les mécanismes mis en place par les champignons endomycorhiziens à arbuscules pour augmenter la tolérance des plantes aux ETMM sont dépendants des espèces étudiées et de la stratégie de réponse des plantes à la présence d'ETMM. Il semblerait que pour les plantes accumulatrices qui présentent une forte translocation des ETMM vers les parties aériennes, la présence de CMA augmente ce phénomène, alors que chez les plantes qui excluent les ETMM, le phénomène inverse est observé et amplifié par la présence de CMA (Rabie, 2005), permettant ainsi à la fois l'amélioration des capacités d'extraction et de stabilisation des ETMM par les plantes et leurs symbiotes selon les cas (Gohre and Paszkowski, 2006). A la vue des résultats précédents, dans le cas du romarin, son association avec les espèces fongiques endomycorhiziennes semble favoriser une accumulation dans les racines, et limiter le transfert dans les parties aériennes, en jouant un rôle de filtre. En effet, à de fortes concentrations en ETMM dans le sol, et malgré une augmentation de la concentration racinaire en ETMM, la concentration dans les parties aériennes semble rester stable (cf figure 3.8). Ceci peut être lié à une adsorption et/ou une absorption et donc une immobilisation plus importante dans les compartiments fongiques (mycélium et vésicules). En effet, il semblerait que les champignons tolérants aux contaminations métalliques possèdent une plus grande affinité pour les ETMM que les racines (2,4 fois plus) (Gohre and Paszkowski, 2006). La présence plus importante de vésicules fongiques dans les racines des romarins exposés aux contaminations les plus importantes n'est donc pas anodine. Ces dernières permettent la détoxification et le stockage des éléments toxiques. Leur implication dans l'immobilisation de Pb a été mise en évidence par Chen et al. (2005), qui a montré une corrélation entre le nombre de vésicule fongique et l'absorption racinaire de Pb. D'autre part, les hyphes de champignons endomycorhiziens sont capables d'adsorber d'importantes quantités d'ETMM, en les immobilisant sur les constituants de leur paroi, notamment sur la chitine (Gohre and Paszkowski, 2006) et la glomaline (Driver et al., 2005). La glomaline, une glycoprotéine, est capable d'extraire et de séquestrer de grandes quantités d'ETMM, notamment Cu, Pb et Zn (Chern et al., 2007; Cornejo et al., 2008; Gonzalez-Chavez et al., 2004; Vodnik et al., 2008). Les résultats obtenus concernant la capacité de séquestration des ETMM par la glomaline sont très variables, mais Cornejo et al., (2008) et Chern et al., (2007) ont mis en évidence que jusqu'à 4,8 mg de Cu et 188 mg de Pb pouvaient être séquestrés par 1 g de glomaline. De plus, lorsqu'elle est relarguée dans le sol, semble-t-il suite au renouvellement des hyphes (Driver et al., 2005), la glomaline favorise la stabilisation des agrégats du sol (Wright and Upadhyaya, 1998; Bedini et al., 2009). Ce phénomène améliore la

structure du sol favorisant l'aération du sol et le drainage de l'eau, ce qui optimise le développement végétal (Oades, 1984).

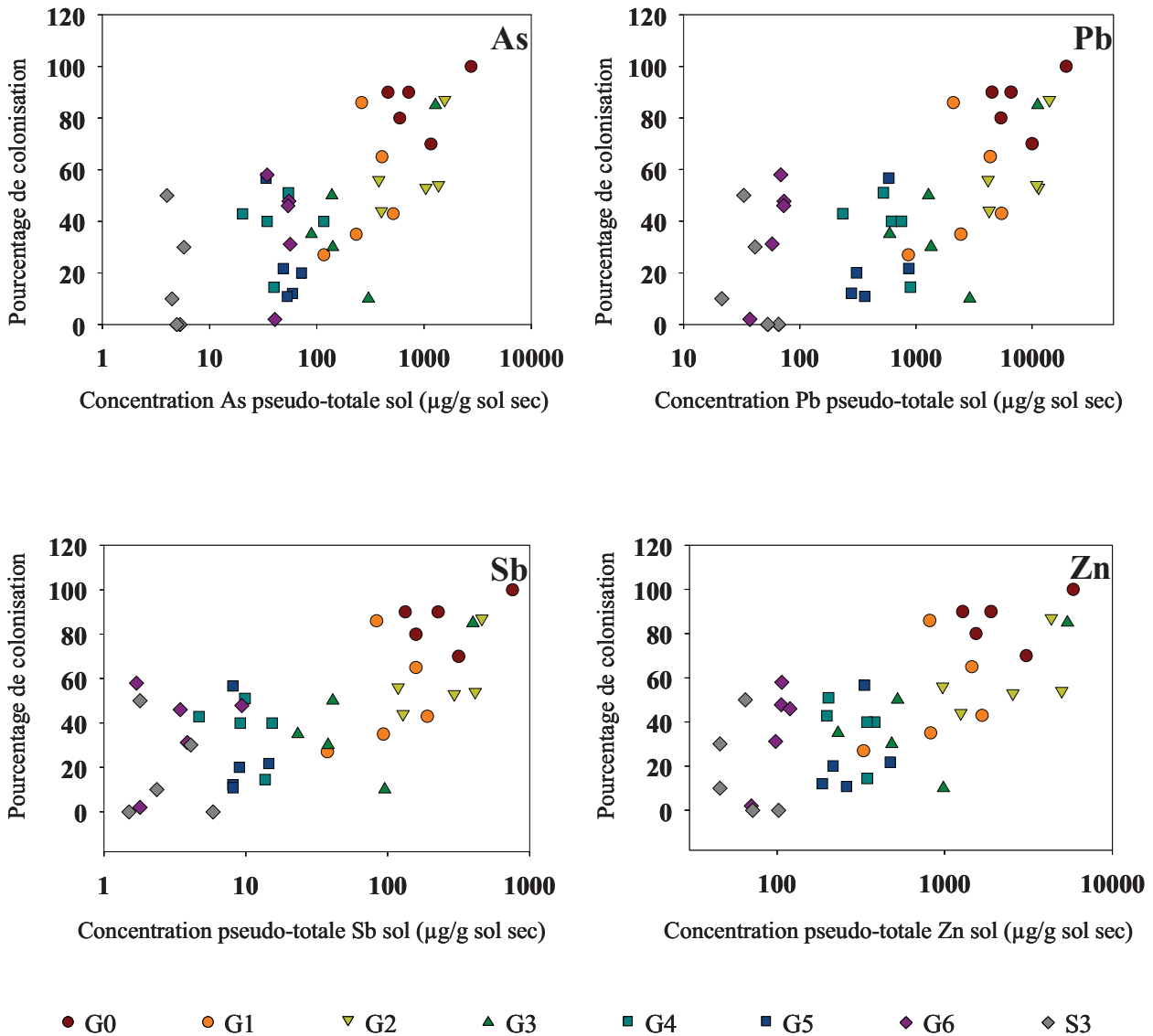


Figure 5.6 : Pourcentage de colonisation par les champignons endomycorhiziens à arbuscules en fonction de la concentration pseudo-totale de As, Pb, Sb et Zn dans le sol (échelle semi-logarithmique). De G0 à G6 : points du transect, S3 : site référence

Lors des observations microscopiques, la présence de champignons endophytes foncés septés (DSE) a été mise en évidence. Les structures caractéristiques que sont les microsclérotés et le mycélium septé (figure 5.7) ont été dénombrées pour les romarins de 6 sites du transect (G1 à G6).



Figure 5.7 : photos des endophytes foncés septés observés dans les racines de romarin, avec de gauche à droite : des microsclérotés ; des microsclérotés liées au mycélium ; du mycélium de DES (grossissement : $\times 400$)

Les DSE sont des champignons associés aux racines ubiquistes et potentiellement des champignons symbiotiques qui forment des hyphes mélanisés inter et intracellulaires pouvant s'agréger et former dans l'épiderme et le cortex des racines, des groupes de nodules à paroi épaisse appelés microsclérotés. Leur relation avec leur hôte n'est pas claire, et semble pouvoir aller de parasitique à mutualiste selon les espèces impliquées et les conditions du milieu (Jumpponen, 2001). Cependant, leur présence dans des habitats aux conditions extrêmes laisse présumer un rôle dans la protection des plantes en cas de stress abiotique (Regvar et al., 2010), notamment par l'amélioration de l'absorption du phosphore grâce à l'étendu du mycélium et à sa capacité à accéder à des sources de phosphore qui ne sont pas disponibles pour les plantes. En effet, la présence de DSE dans *Carex sempervirens*, semble être par exemple à l'origine d'une augmentation de la concentration en phosphore dans ses parties aériennes (Haselwandter and Read, 1982). De plus, ces champignons contiennent de la mélanine dans leur paroi ce qui leur confère une capacité à lier les métaux puisque cette molécule possède entre autre des unités phénoliques (Gadd, 1993).

Le taux de colonisation moyen le plus important (24,5%) est obtenu pour G2, le site le plus contaminé parmi les six sites où les DSE ont été comptés (annexe 14). Les autres sites, excepté G4, présentent des taux de colonisation très similaires, d'environ 10%. Dans ce cas encore, un test de corrélation a été réalisé, mettant en évidence une corrélation positive significative (test de

Pearson, $p < 0,05$) supérieure à 0,5 entre la présence de DSE et le niveau de contamination du sol en As, Pb, Sb et Zn (figure 5.8).

Ces résultats sont cohérents avec ce qui a déjà été mis en évidence sur *Salix caprea*, où il a été montré que le taux de colonisation par les DSE est corrélé positivement avec la concentration en Pb dans le sol (Regvar et al., 2010). De plus, Li et al., (2011) ont mis en évidence une augmentation significative de la concentration en Pb, Zn et Cd dans les racines de *Zea mays* L., ainsi qu'une diminution de la translocation de ces éléments vers les parties aériennes en présence de DSE. La relation entre la plante et son symbiote passe de parasitique, dans le cas d'un sol pauvre en nutriment et en ETMM, à une relation mutualiste lorsque le sol est contaminé. Li et al. (2011) supposent que cette observation est liée en partie à la capacité d'absorption de la souche de champignon utilisée (*E. pisciphila*), qui est capable d'accumuler et d'adsorber plus de 20% de Pb et de 5% de Cd dans sa biomasse (en masse sèche).

Dans le cas du romarin, les souches impliquées dans les symbioses et leur diversité n'ont pas été identifiées, que ce soit pour les CMA ou les DSE. Cependant, leur présence sur les sites les plus contaminés montre une adaptation de la flore fongique aux ETMM.

5.3. Evaluation de l'absorption et de l'adsorption racinaire et localisation des ETMM dans les racines

L'accumulation des ETMM dans les racines est liée à deux phénomènes : l'absorption et l'adsorption, présents à la fois à l'échelle macroscopique et microscopique. A l'échelle macroscopique, les ETMM peuvent être accumulées par adsorption sur le rhizoderme ou par absorption au niveau du cortex. Dans ce dernier cas, à l'échelle cellulaire, ces contaminants seront soit adsorbés sur les parois végétales, soit entreront dans les cellules où ils pourront être stockés dans les vacuoles. Les ETMM adsorbés à la surface du rhizoderme, ainsi que les ETMM absorbés dans le cortex des racines d'un individu provenant de G0, ont été mesurés. Pour cela, les ETMM adsorbées ont été extraits et dosés dans une solution de NaEDTA puis, les racines ainsi traitées ont ensuite été minéralisées afin de doser les ETMM absorbés. Ces analyses ont été réalisées sur des racines de plusieurs tailles : le pivot ($\varnothing = 1,5$ cm), des racines primaires ($\varnothing = 1$ cm), des

racines secondaires de taille moyenne ($\varnothing = 0,5$ cm) et des racines secondaires plus fines ($\varnothing = 0,25$ cm).

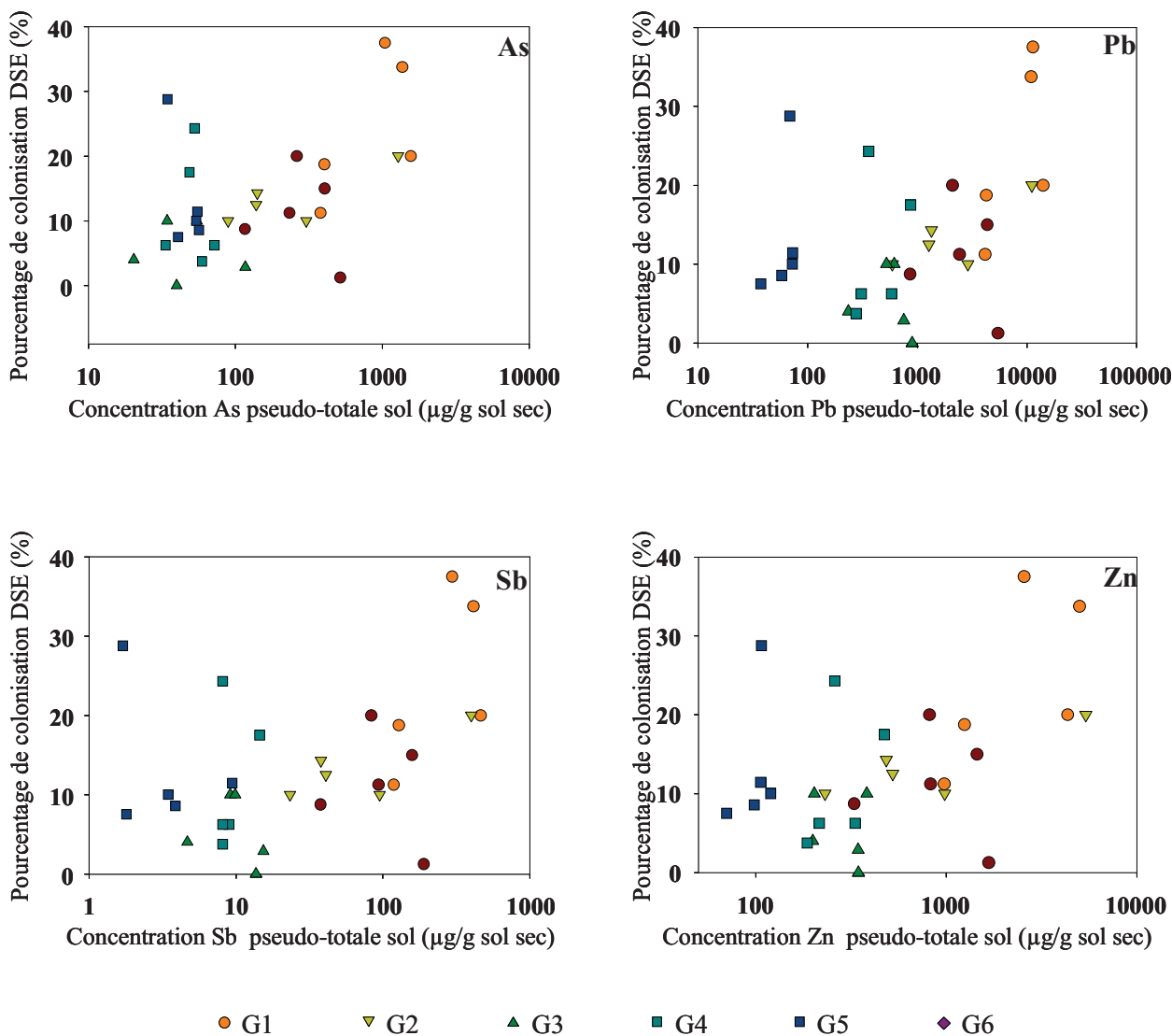


Figure 5.8 : pourcentage de colonisation des racines de romarin par les DSE en fonction de la concentration pseudo-totale du sol en As, Pb, Sb et Zn (échelle semi-logarithmique). De G1 à G6 : points du transect.

La figure 5.9 montre le pourcentage d'As, Pb, Sb et Zn absorbé dans les racines de chaque taille. D'après les résultats, tous les éléments étudiés ne sont pas traités de la même façon dans les racines, cependant, pour tous les éléments, aucune différence statistiquement significative ne peut être observée selon la taille de la racine puisque le faible nombre de répétition ($n=3$) de l'expérience ne le permet pas. Cependant, les fractions moyennes d'As, Pb et Zn absorbées par les racines sont comprises entre 46 et 70%, 30 et 51% et entre 49 et 67% respectivement (annexe

15). Ainsi, pour ces trois éléments, la part absorbée est très variable, et peut être inférieure, équivalente ou supérieure à la part adsorbée. L'adsorption peut être le fait des polyphénols et particulièrement des tannins présents à la surface des racines de romarin, puisqu'il a été montré sur d'autres espèces qu'ils sont capables de chélater les ETMM, et notamment Pb (Chin et al., 2009), Cu, Fe et Zn (Karamac, 2009). Pour Cu, Fe et Sb, en moyenne la part absorbée est majoritaire puisqu'elle se situe entre 86 et 96%, 93 et 98% et entre 91 et 96%, respectivement. L'antimoine, qui pourtant se comporte habituellement comme l'arsenic, ne semble pas, dans ce cas, absorbé de la même façon. Le fait que ces deux éléments, malgré leurs propriétés et réactivités chimiques similaires, ne soient pas absorbés par la même voie a déjà été mis en évidence dans d'autres études. En effet, la présence d'arsenate (AsV), transporté par la même voie que le phosphate dont il est analogue, résulte en un effet de compétition avec le phosphate, ce qui n'est pas le cas de l'antimonate (SbV), suggérant qu'ils n'utilisent pas la même voie d'entrée dans la plante. Cette observation semble également vraie pour l'arsenite (AsIII) et l'antimonite (SbIII) (Tschan et al., 2009). Peu de choses sont connues à propos des voies d'absorption de l'antimoine, mais il est probable que les deux formes de Sb ne soient pas absorbées de la même façon. Sb(III) peut traverser la membrane passivement à travers les aquaporines, mais pour Sb(V), qui est un anion, ce type de transport est exclu. Dans ce cas, l'absorption de l'antimoine nécessite un transporteur (Tschan et al., 2009). Or, concernant les rejets d'antimoine par les fonderies de plomb, la forme dominante dans le sol semble être la forme Sb(V) (Ettler et al., 2010), laissant présager une absorption active de cet élément. Dans le cas du romarin, l'antimoine semble absorbé de façon similaire au fer. Cette similarité ne concerne pas uniquement l'absorption racinaire, puisque la concentration de ces deux éléments dans les parties aériennes est significativement et positivement corrélée (test Pearson $p < 0,05$, $r = 0,64$). Les mécanismes d'absorption et les espèces absorbées de l'antimoine par les plantes n'ont pas encore été mis en évidence et, à notre connaissance, aucune étude ne présente de corrélation entre l'absorption du fer et de l'antimoine dans les plantes. Ainsi, cette observation est peut être liée au fait que l'antimonate peut être incorporé dans la structure des oxydes de fer, formant de l'antimonate ferrique (Fe(III)-Sb(V) (Bolanz et al., 2013). La corrélation pourrait être simplement attribuée à la solubilisation des oxydes de fer, libérant de l'antimoine phytodisponible, comme cela a été observé pour le bore (Ren et al., 2009).

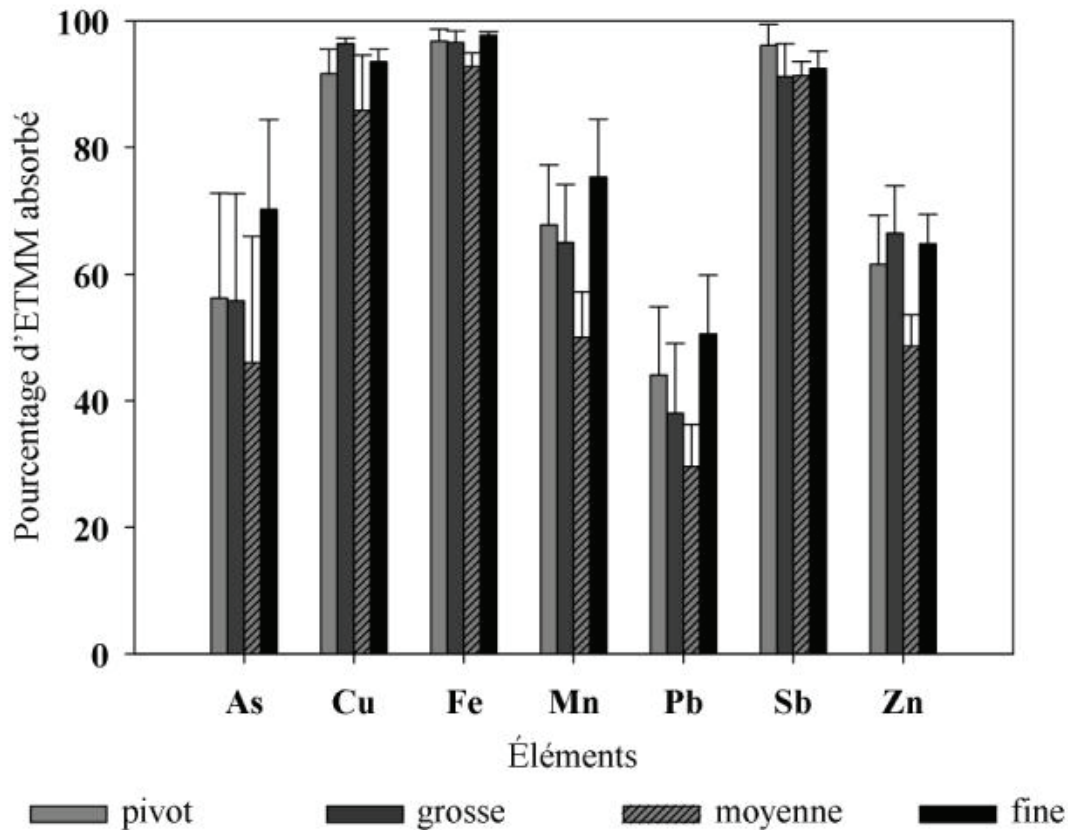


Figure 5.9 : pourcentage d'ETMM absorbés par les racines de romarin poussant dans un sol très contaminé en As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn (site G0)

Concernant la plus faible part d'As, Pb et Zn absorbée, en moyenne moins de 70% pour As et Zn et moins de 50% pour Pb, elle pourrait être liée à un mécanisme de tolérance du romarin, favorisant l'adsorption de ces éléments à la surface des racines. Pour cela, une étude similaire sur des racines de romarin sur sol non contaminé aurait été intéressante, afin de comparer les "patterns" d'absorption et d'adsorption de ces éléments dans les deux cas. En effet, des études ont montré que la présence d'ETMM, et notamment de Cu et Pb, dans le sol avait pour conséquence une augmentation de la production de composés phénoliques, (Kovacik and Klejdus, 2008; Pawlak-Sprada et al., 2011) capables de lier les ETMM au niveau des racines (Michalak, 2006). Les mycorhizes semblent impliqués dans la tolérance des romarins aux ETMM, puisque leur présence est corrélée à la contamination du sol en As, Pb, Sb et Zn. Ces symbioses prennent place dans le cortex racinaire des racines fines. Les concentrations en ETMM dans les racines de différentes tailles ont été mesurées et comparées et leur localisation mise en évidence par des

analyses en micro-spectroscopie à fluorescence X. Pour ces analyses, les échantillons de racine proviennent du même individu (prélevé sur le site G0) que celui utilisé pour la détermination des ETMM adsorbés et absorbés.

Les résultats des concentrations dans les racines de différentes tailles, semblent montrer une tendance à un stockage plus important dans les racines les plus fines pour As, Pb, Sb et Zn (figure 5.10), cependant, le faible nombre de réplicats (n=3) pour cette expérience ne permet pas de mettre en évidence des différences statistiquement significatives. Vamerali et al. (2009) ont montré des résultats similaires, à savoir, une concentration plus importante en As, Cu, Pb et Zn dans les racines fines que dans les racines plus épaisses de peuplier et de saule.

Les résultats précédents ont montré que le ratio d'ETMM absorbé et adsorbé ne changeait pas suivant la taille. Ainsi, dans les racines de petite taille, les deux phénomènes semblent plus importants. Concernant l'adsorption, cette augmentation peut être liée à une surface de contact avec les tannins et autres composés de la paroi cellulaire capables de lier les ETMM plus importante par rapport au volume totale de la racine. Elle peut aussi être liée à une concentration en tannins et composés phénoliques plus importantes. En effet, Chin et al., (2009) ont montré que les racines latérales de *Symphytum officinale L.* contiennent plus de tannins que les racines primaires. Concernant le phénomène d'absorption, il est peut-être lié à la présence des champignons endomycorhiziens, préférentiellement présents dans les racines fines, dont le mycélium et les vésicules peuvent être des sites de stockage des nutriments et des ETMM (Joner et al., 2000; Habte, 2000).

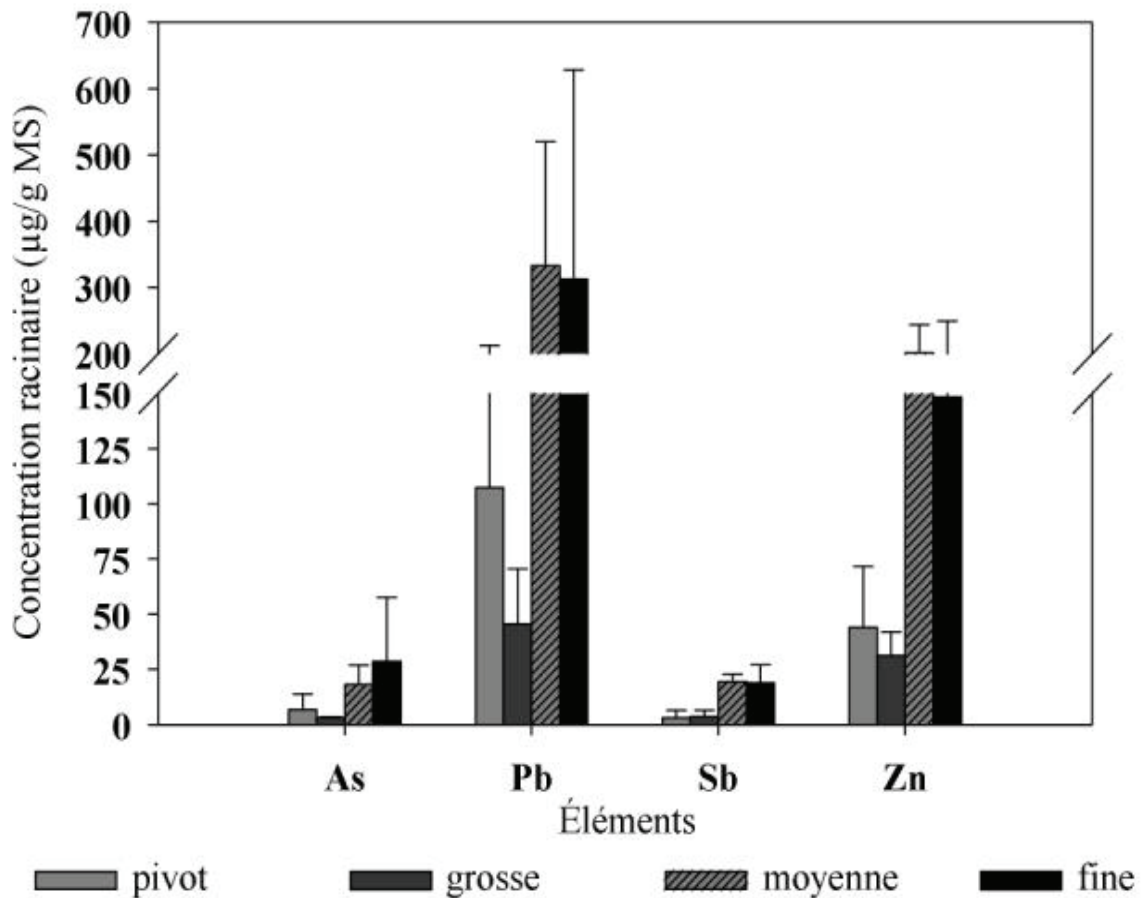


Figure 5.10 : concentrations en As, Pb, Sb et Zn dans des racines de tailles différentes échantillonnées sur un romarin poussant sur un sol contaminé (site G0).

Des analyses en micro-spectroscopie de fluorescence X ont également été réalisées afin de localiser les ETMM dans des racines de différentes tailles (figure 5.11). La détection des éléments est représentée par des points blancs. Seuls Pb et Zn ont été détectés lors de cette analyse, les autres ETMM étant certainement en dessous des limites de détection de l'appareil.

La figure 5.11 présente les échantillons de racine analysés : une section de racine primaire (racine 1) et deux sections de racine secondaire, plus ou moins fine (racine 3 et racine 2 respectivement). Les cartographies réalisées en micro-spectroscopie de fluorescence X, mettent en évidence la présence de Pb et Zn à la périphérie des sections des racines secondaires (racines 2 et 3). Concernant la racine 1, rien ne semble détecté.

Afin de confirmer les observations faites par cette cartographie, des spectres d'analyse X ont été réalisés. Pour la racine 1, la surface totale de l'échantillon a été analysée afin de confirmer ou d'infirmier l'absence de Pb et Zn (spectre 1, figure 5.12a). Concernant les racines 2 et 3, deux spectres ont été réalisés (figures 12a et 12b, spectres 2a et 3a), un premier sur une partie de la périphérie de la racine semblant contenir Pb et du Zn, ainsi qu'un deuxième à côté de la racine, afin d'éliminer un potentiel bruit de fond (figures 12a et 12, b, spectres 2b et 3b respectivement).

Le spectre de la racine 1 met en évidence la présence de Zn, et confirme l'absence de Pb. Les spectres des racines 2 et 3 confirment la présence des deux éléments, et rejettent un effet de bruit de fond, puisque les spectres obtenus dans ce cas, ne montrent pas de pics correspondant à Pb et Zn. Ainsi, Pb et Zn semblent présents en plus forte concentration dans les racines secondaires, ce qui est cohérent avec ce qui a été observé précédemment, puisque Pb et Zn sont détectables uniquement dans les racines fines, là où leur concentration est la plus importante. De plus, ces deux éléments semblent localisés préférentiellement dans la partie périphérique de la racine, c'est-à-dire dans le cortex qui abrite les structures intracellulaires des CMA et des DSE.

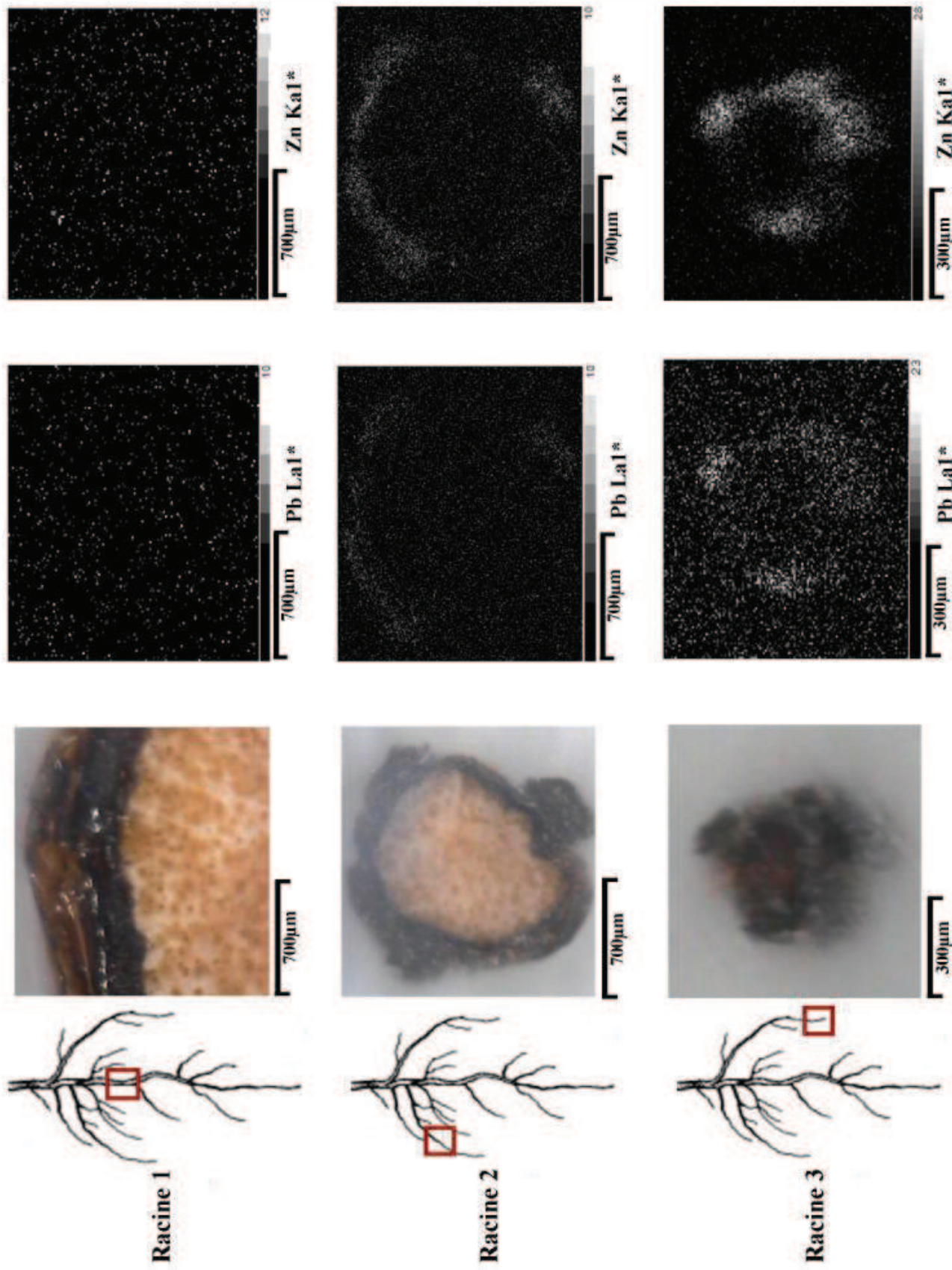


Figure 5.11 : photos des échantillons de racine analysés en micro-spectroscopie de fluorescence X et cartographie obtenue pour chaque échantillon pour deux éléments : Pb et Zn

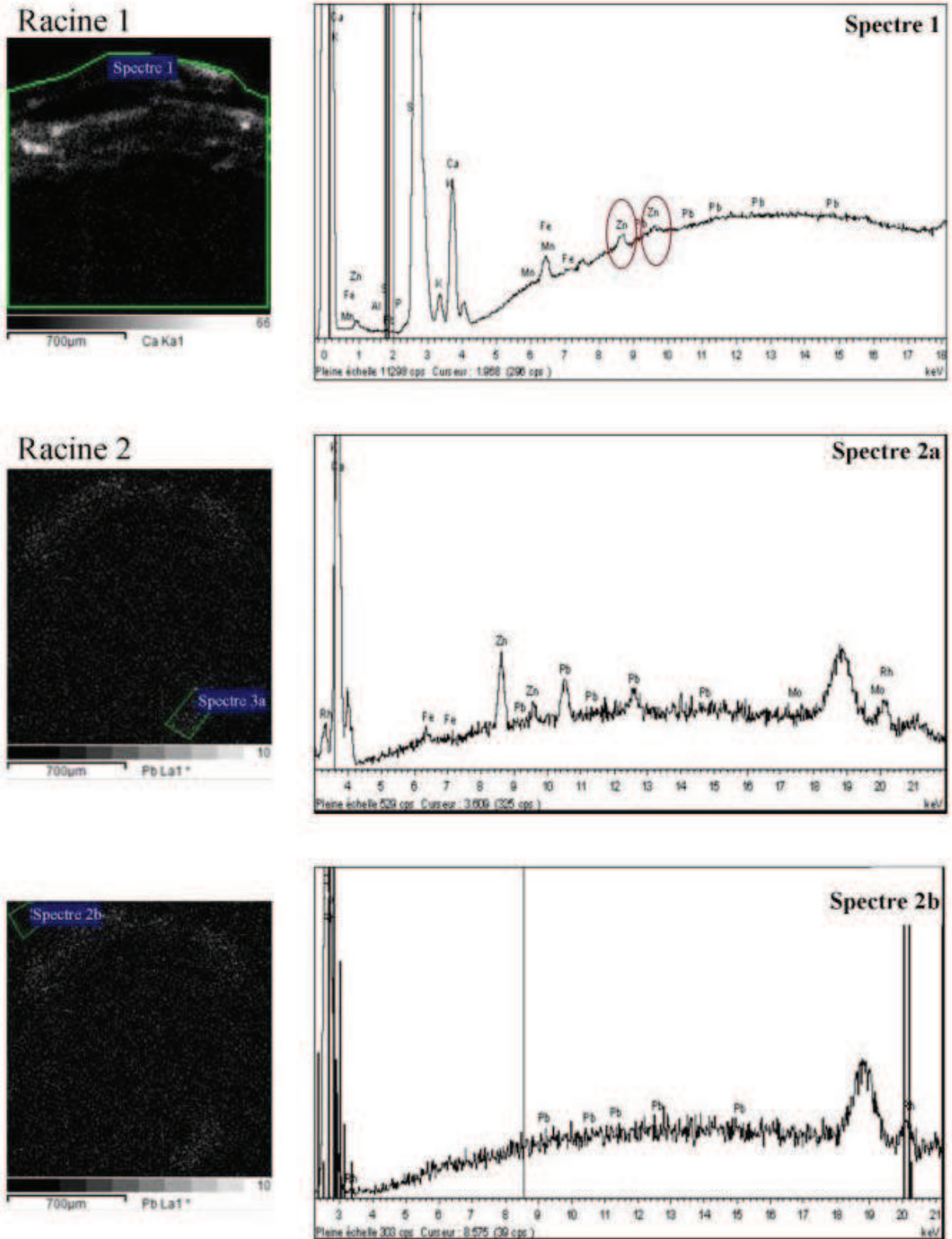


Figure 5.12a : spectre d'analyse X de la racine primaire (spectre 1) et d'une racine secondaire (racine 2) pour laquelle deux spectres ont été réalisés : spectre 2a dans une partie de la racine où Pb et Zn ont été détectés lors de la cartographie, et spectre 2b à côté de la racine afin d'éliminer un potentiel bruit de fond

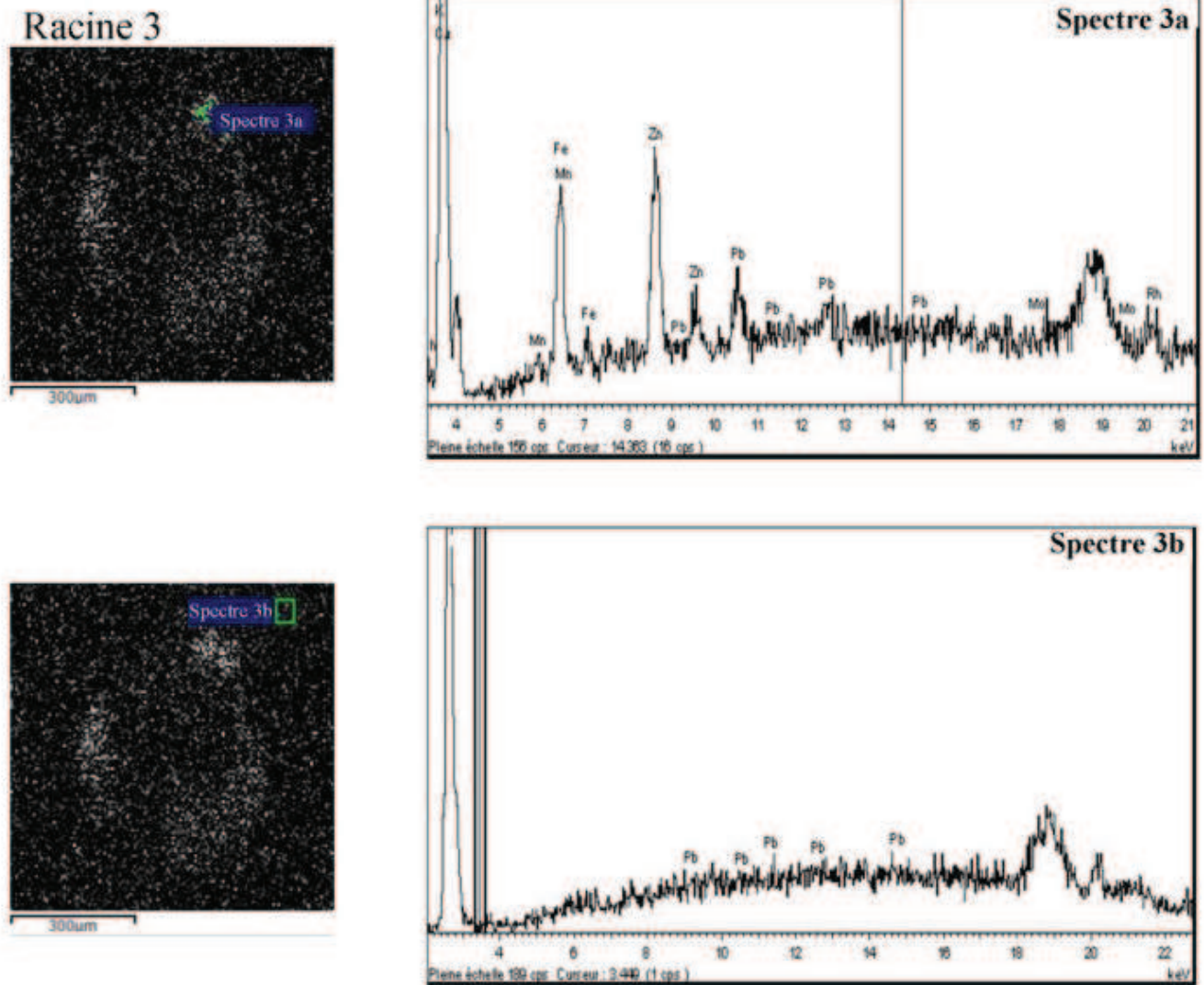


Figure 5.12b: spectre d'analyse X d'une racine secondaire (racine 3) pour laquelle deux spectres ont été réalisés : spectre 3a dans une partie de la racine où Pb et Zn ont été détectés lors de la cartographie, et spectre 3b à côté de la racine afin d'éliminer un potentiel bruit de fond.

5.4. Conclusion

Le romarin est capable d'accumuler les ETMM dans ses racines, et de limiter leur transfert vers les parties aériennes. En effet, l'accumulation de As, Pb, Sb et Zn dans les racines de romarin est linéairement corrélée à leur concentration dans le sol. Cependant, malgré des concentrations pouvant être importantes dans les racines des individus soumis à une forte contamination, les facteurs de bioconcentration racinaires sont faibles ($< 0,3$) pour ces 4 éléments, ce qui met en évidence que le romarin n'est pas capable d'hyperaccumuler ces ETMM dans son système racinaire. Bien que ce type d'extraction soit critiquable parce que pas forcément représentatif de la fraction phytodisponible, les valeurs des BCF calculés à partir des fractions mobilisables et échangeables sont supérieures à 1 signifiant que le romarin est capable d'accumuler de façon importante les ETMM potentiellement les plus labiles dans le sol. Or, ce sont les ETMM de ces fractions mobilisables qui nécessitent le plus d'être stabilisés puisque qu'ils peuvent être lessivés lors d'épisodes pluvieux et/ou solubilisés lors de modifications physico-chimiques dans le sol (pH, Eh, conditions complexantes, etc.).

Concernant As, Mn, Pb et Zn, une part notable est adsorbée et non absorbée au niveau des racines, ce qui n'est pas le cas pour Cu, Fe et Sb. Ceci pourrait expliquer en partie les faibles facteurs de translocation obtenus, notamment pour les éléments xénobiotiques. Ces valeurs mettent en évidence que le romarin n'est pas adapté pour la phytoextraction, ce qui est préférable étant donné qu'il s'agit d'une espèce dont les parties aériennes sont comestibles. Ce phénomène de limitation de la translocation fait certainement partie de la stratégie de tolérance de cette espèce, puisque les TFs sont généralement plus importants pour les individus des sites moins contaminés. La mise en évidence de la diminution de la translocation et de l'augmentation de la concentration en ETMM dans les racines échantillonnées sur les sites contaminés, peut être liée à un phénomène intrinsèque à la plante et/ou lié à des associations symbiotiques avec des CMA et des DSE dont l'augmentation du taux de colonisation est corrélée avec le niveau de contamination. La mise en évidence de l'effet de ces symbioses dans la tolérance du romarin aux ETMM et l'augmentation de leur accumulation au niveau racinaire est difficile à prouver. Cependant, les observations en micro-spectrométrie de fluorescence X ayant mis en évidence le stockage des ETMM dans les zones périphériques des racines secondaires cette hypothèse ne peut pas être exclue. En effet, les champignons endomycorhiziens s'implantent dans le cortex et le rhizoderme des racines secondaires de leur hôte.

Ainsi, le romarin semble être un candidat intéressant pour un processus de phytostabilisation des sols contaminés en ETMM autour de l'Escalette. En effet, en plus d'être une espèce autochtone, pérenne avec un réseau racinaire dense, il est capable d'accumuler les ETMM au niveau racinaire, tout en limitant leur translocation vers les parties aériennes, limitant ainsi leur éventuel transfert dans le réseau trophique. De plus, des études ont montrés que parmi plusieurs espèces méditerranéennes (*Tamarix gallica*, *Myrtus communis*, *Arbutus unedo*, *Pistacia lentiscus* et *Retama sphaerocarpa*), ce sont les racines de romarin qui sont le moins dégradées dans le sol (Moreno-Jiménez et al., 2009), diminuant le risque de remise en circulation des ETMM rapidement. De plus, le fort taux de colonisation par des champignons endomycorhiziens ne joue pas seulement rôle dans l'accumulation des ETMM au niveau racinaire, grâce aux vésicules et à leur mycelium (Chen et al., 2005; Gohre and Paszkowski, 2006). Le mycélium qui constitue une extension du système racinaire dans le sol, augmente le volume de sol prospecté (Gohre and Paszkowski, 2006) et rend le potentiel de phytostabilisation du romarin plus important, d'autant plus que les hyphes des CMA et des DSE sont capables d'adsorber des quantités d'ETMM non négligeables, notamment grâce à la glomaline (Chern et al., 2007; Cornejo et al., 2008; Gonzalez-Chavez et al., 2004; Vodnik et al., 2008). De plus, la présence de ces symbioses favorise la survie et le développement de la végétation et notamment du romarin (Estaún et al., 1997), en améliorant la structure du sol (Wright and Upadhyaya, 1998) et l'absorption de nutriments (Barea et al., 2002).

Références bibliographiques :

- Anawar HM, Garcia-Sanchez A, Santa Regina I. Evaluation of various chemical extraction methods to estimate plant-available arsenic in mine soils. *Chemosphere* 2008;70:1459–67.
- Andrade SA., Abreu C., de Abreu M., Silveira AP. Influence of lead additions on arbuscular mycorrhiza and Rhizobium symbioses under soybean plants. *Appl. Soil Ecol.* 2004;26:123–31.
- Baker A. Accumulators and excluders - strategies in the response of plants to heavy-metals. *J. Plant Nutr.* 1981;3:643–54.
- Barea J-M, Azcón R, Azcón-Aguilar C. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002;81:343–51.

- Bedini S, Pellegrino E, Avio L, Pellegrini S, Bazzoffi P, Argese E, Giovannetti M. Changes in soil aggregation and glomalin-related soil protein content as affected by the arbuscular mycorrhizal fungal species *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*. *Soil Biol. Biochem.* 2009;41:1491–6.
- Bolanz RM, Bläss U, Ackermann S, Ciobotă V, Rösch P, Tarcea N, Popp J, Majzlan J. The effect of antimonate, arsenate, and phosphate on the transformation of ferrihydrite to goethite, hematite, feroxyhyte, and tripuhyite. *Clays Clay Miner.* 2013;61:11–25.
- Chen X, Wu CH, Tang JJ, Hu SJ. Arbuscular mycorrhizae enhance metal lead uptake and growth of host plants under a sand culture experiment. *Chemosphere* 2005;60:665–71.
- Chern EC, Tsai DW, Ogunseitan OA. Deposition of Glomalin-Related Soil Protein and Sequestered Toxic Metals into Watersheds. *Environ. Sci. Technol.* 2007;41:3566–72.
- Chin L, Leung DWM, Taylor HH. Lead chelation to immobilised *Symphytum officinale* L. (comfrey) root tannins. *Chemosphere* 2009;76:711–5.
- Chojnacka K, Chojnacki A, Górecka H, Górecki H. Bioavailability of heavy metals from polluted soils to plants. *Sci. Total Environ.* 2005;337:175–82.
- Cornejo P, Meiera S, Borie G, Rillig MC, Borie F. Glomalin-related soil protein in a Mediterranean ecosystem affected by a copper smelter and its contribution to Cu and Zn sequestration. *Sci. Total Environ.* 2008;406:154–60.
- Driver JD, Holben WE, Rillig MC. Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* 2005;37:101–6.
- Estaún V, Savé R, Biel C. AM inoculation as a biological tool to improve plant revegetation of a disturbed soil with *Rosmarinus officinalis* under semi-arid conditions. *Appl. Soil Ecol.* 1997;6:223–9.
- Ettler V, Tejnecky V, Mihaljevic M, Sebek O, Zuna M, Vanek A. Antimony mobility in lead smelter-polluted soils. *Geoderma* 2010;155:409–18.
- Fitz WJ, Wenzel WW. Arsenic transformations in the soil–rhizosphere–plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. *Highlights Ecb10 - Nov. Bioact. Subst. Bioremediation Technol.* 2002;99:259–78.
- Gadd GM. Interactions of fungus with toxic metals. *New Phytol.* 1993;124:25–60.
- Al-Ghamdi A a. M, Jais HM. Interaction between arbuscular mycorrhiza and heavy metals in the rhizosphere and roots of *Juniperus procera*. *Int. J. Agric. Biol.* 2012;v. 14(1).
- Gildon A, Tinker PB. Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants. *New Phytol.* 1983;95:247–61.
- Gohre V, Paszkowski U. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 2006;223:1115–22.

- Gonzalez-Chavez MC, Carrillo-Gonzalez R, Wright SF, Nichols KA. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environ. Pollut.* 2004;130:317–23.
- Habte JA. Chapter 14. Mycorrhizal fungi and plant nutrition. In: . Plant Nutr. Manag. Hawaii's Soils Approaches Trop. Subtrop. Agric. College of Tropical Agriculture & Human Resources, University of Hawaii at Manoa; 2000.
- Harrison MJ. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1999;50:361–89.
- Haselwandter K, Read DJ. The significance of a root-fungus association in two *Carex* species of high-alpine plant communities. *Oecologia* 1982;53:352–4.
- Joner EJ, Briones R, Leyval C. Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant Soil* 2000;226:227–34.
- Jumpponen A. Dark septate endophytes - are they mycorrhizal? *Mycorrhiza* 2001;11:207–11.
- Karamac M. Chelation of Cu(II), Zn(II), and Fe(II) by Tannin Constituents of Selected Edible Nuts. *Int. J. Mol. Sci.* 2009;10:5485–97.
- Komarek M, Chrastny V, Stichova J. Metal/metalloid contamination and isotopic composition of lead in edible mushrooms and forest soils originating from a smelting area. *Environ. Int.* 2007;33:677–84.
- Kovacik J, Klejdus B. Dynamics of phenolic acids and lignin accumulation in metal-treated *Matricaria chamomilla* roots. *Plant Cell Reports* 2008;27:605–15.
- Li T, Liu MJ, Zhang XT, Zhang HB, Sha T, Zhao ZW. Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*. *Sci. Total Environ.* 2011;409:1069–74.
- Michalak A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Pol. J. Environ. Stud.* 2006;15:523–30.
- Moreno-Jiménez E, Peñalosa JM, Esteban E, Bernal MP. Feasibility of arsenic phytostabilisation using Mediterranean shrubs: impact of root mineralisation on As availability in soils. *J. Environ. Monit. Jem* 2009;11:1375–80.
- Moreno-Jimenez E, Vazquez S, Carpena-Ruiz RO, Esteban E, Penalosa JM. Using Mediterranean shrubs for the phytoremediation of a soil impacted by pyritic wastes in Southern Spain: A field experiment. *J. Environ. Manage.* 2011;92:1584–90.
- Oades JM. Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for management. *Plant Soil* 1984;76:319–37.
- Pawlak-Sprada S, Stobiecki M, Deckert J. Activation of phenylpropanoid pathway in legume plants exposed to heavy metals. Part II. Profiling of isoflavonoids and their

- glycoconjugates induced in roots of lupine (*Lupinus luteus*) seedlings treated with cadmium and lead. *Acta Biochim. Pol.* 2011;58:217–23.
- Rabie GH. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungus to red kidney and wheat plants tolerance grown in heavy metal-polluted soil. *Afr. J. Biotechnol.* 2005;4:332–45.
- Regvar M, Likar M, Piltaver A, Kugoni N, Smith JE. Fungal community structure under goat willows (*Salix caprea* L.) growing at metal polluted site: the potential of screening in a model phytostabilisation study. *Plant Soil* 2010;330:345–56.
- Ren L, Zhu D, Cui J, Liao S, Geng M, Zhou W, Hamilton D. Plant availability of boron doped on iron and manganese oxides and its effect on soil acidosis. *Geoderma* 2009;151:401–6.
- Ruyi Y, Guodong Y, Jianjun T, Xin C. Effects of metal lead on growth and mycorrhizae of an invasive plant species (*Solidago canadensis* L.). *J. Environ. Sci.-China* 2008;20:739–44.
- Sánchez-Blanco MJ, Ferrández T, Morales MA, Morte A, Alarcón JJ. Variations in water status, gas exchange, and growth in *Rosmarinus officinalis* plants infected with *Glomus deserticola* under drought conditions. *J. Plant Physiol.* 2004;161:675–82.
- Sánchez-Castro I, Ferrol N, Cornejo P, Barea J-M. Temporal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing roots of representative shrub species in a semi-arid Mediterranean ecosystem. *Mycorrhiza* 2012;22:449–60.
- Testiati E. Contamination des sols par des éléments traces métalliques en zone méditerranéenne côtière : étude de leur mobilité et du transfert à la phytocecnose. Aix-Marseille Université; 2012.
- Tschan M, Robinson BH, Schulin R. Antimony in the soil–plant system – a review. *Environ. Chem.* 2009;6:106–15.
- Turrini A, Sbrana C, Strani P, Pezzarossa B, Risaliti R, Giovannetti M. Arbuscular mycorrhizal fungi of a Mediterranean island (Pianosa), within a UNESCO Biosphere Reserve. *Biol. Fertil. Soils* 2010;46:511–20.
- Del Val C, Barea JM, Azcon-Aguilar C. Assessing the tolerance to heavy metals of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from sewage sludge-contaminated soils. *Appl. Soil Ecol.* 1999;11:261–9.
- Val CD, Barea JM, Azcón-Aguilar C. Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungus Populations in Heavy-Metal-Contaminated Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999;65:718–23.
- Vamerali T, Bandiera M, Coletto L, Zanetti F, Dickinson NM, Mosca G. Phytoremediation trials on metal- and arsenic-contaminated pyrite wastes (Torviscosa, Italy). *Environ. Pollut.* 2009;157:887–94.
- Vodnik D, Grčman H, Maček I, van Elteren JT, Kovačević M. The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. *Sci. Total Environ.* 2008;392:130–6.

- Whitfield L, Richards AJ, Rimmer DL. Relationships between soil heavy metal concentration and mycorrhizal colonisation in *Thymus polytrichus* in northern England. *Mycorrhiza* 2004;14:55–62.
- Wilson SC, Lockwood PV, Ashley PM, Tighe M. The chemistry and behaviour of antimony in the soil environment with comparisons to arsenic: A critical review. *Environ. Pollut.* 2010;158:1169–81.
- Wright SF, Upadhyaya A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 1998;198:97–107.

Chapitre 6 :

**Effet des ETMM sur le romarin en
conditions contrôlées et évaluation de
l'effet de la rhizosphère dans la tolérance
de cette espèce**

Les études en conditions contrôlées ont été réalisées dans le but d'étudier les effets des ETMM et particulièrement du plomb sur le romarin, de déterminer l'implication des phénomènes ayant lieu dans la rhizosphère concernant la tolérance de cette espèce, en s'affranchissant du stade phénologique et des conditions climatiques. L'impact de l'ajout d'un chélatant naturel, la cystéine, sur la mobilité des métaux et métalloïdes et leur absorption par cette espèce a également été étudié.

6.1. Niveau de contamination des sols

Pour cette étude en conditions contrôlées, quatre niveaux de contamination du sol ont été utilisés : un sol témoin constitué d'un sol composite de G6 (témoin), deux sols renforcés par ajout de 10 (contamination 1) et 100 $\mu\text{g/g}$ (contamination 2) de Pb en solution au sol de G6, et un sol multi-contaminé constitué d'un sol composite de G0 (contamination 3). Après un renforcement de la contamination du sol par ajout de Pb, les sols ont été mis à stabiliser pendant 5 mois. En effet, après leur incorporation au sol, la spéciation des ETMM évolue au cours du temps puisque ceux-ci sont impliqués dans des réactions, telles la complexation, l'adsorption et la précipitation ou encore la diffusion, entre les ions métalliques et le sol. La vitesse de la modification de la spéciation ainsi que la répartition entre les différentes phases du sol, vont dépendre du sol considéré qui intervient en fournissant des protons, du calcium, des ions carbonates et d'autres solutés favorisant ou inhibant la dissolution de Pb. Mais la forme physique et chimique du métal lui-même, influencent aussi sa solubilité (Bataillard et al., 2003; Tang et al., 2008). Il est donc impossible de prédire la disponibilité du Pb ajouté.

Ainsi, les concentrations en Pb pseudo-total, mobilisable et échangeables ont été dosées dans les quatre sols après les 5 mois de stabilisations (tableau 6.1). Les concentrations pseudo-totales mettent en évidence que l'intégralité du Pb ajouté n'est pas retrouvée dans le sol. En effet, la concentration pseudo-totale en Pb mesurée dans le sol renforcé avec 10 $\mu\text{g/g}$ (contamination 1) est identique à celle du sol non renforcé. Ceci pourrait être lié à une adsorption contre les parois du récipient ayant contenu le sol. Le même constat est fait concernant la fraction mobilisable.

Tableau 6.1 : concentration en Pb pseudo-total, mobilisable et échangeable (en mg/kg) et pH des sols utilisés pour les rhizotrons, après 5 mois de stabilisation

Condition de contamination	Type d'extrait			pH
	Total	Mobilisable	Echangeable	
Sol G6	56,4±1,8	14,3±8,4	0,0005±0,0012	7,7
Sol G6 + 10 µg/g de Pb	57,4±1,9	14,5±0,2	0,15±0,01	7,6
Sols G6 + 100 µg/g de Pb	114,8±2,2	47,1±1,0	0,27±0,01	7,5
Sol G0	9402±269	3558±82	0,77±0,59	7,9

Cependant, concernant la fraction échangeable une différence notable est mise en évidence avec une concentration échangeable en Pb qui est 300 fois plus importante dans le sol de la contamination 1 que dans le sol témoin. Le sol de la contamination 2 présente une concentration en Pb 2 fois plus importante que le sol témoin pour la concentration pseudo-totale, 3 fois plus importante pour la concentration mobilisable et plus de 500 fois plus importante pour la concentration échangeable. Le sol multi-contaminé (sol composite de G0, contamination 3) présente quant à lui des concentrations pseudo-totales, mobilisables et échangeables largement supérieures à celles mesurées dans les trois autres sols. La fraction échangeable de ce sol est 1540 fois, 5 fois et presque 3 fois plus importante que celle du sol témoin, du sol avec la contamination 1 et du sol avec la contamination 2, respectivement. Ainsi, concernant les concentrations pseudo-totales et mobilisables, seuls 3 sols sont différents, alors qu'au regard de la concentration échangeable il y a bien un gradient de contamination entre les 4 sols.

Les pH de ces sols ont également été mesurés afin de vérifier qu'il n'y ait pas eu d'acidification. En effet, la solution mère de Pb utilisée pour renforcer les sols contenait 1% d'acide nitrique. Ainsi, les pH des 4 sols sont compris entre 7,5 et 7,9 et une différence de 0,1 à 0,2 point de pH entre le sol le sol témoin et les sols contaminés 1 et 2, respectivement a été déterminée, indiquant le faible impact de l'ajout de Pb sur le pH.

6.1.1. Métaux et métalloïdes pseudo-totaux

A la fin des 6 mois de culture des romarins, les sols des compartiments des 8 rhizotrons ont été analysés séparément, afin de mettre en évidence une éventuelle hétérogénéité de la contamination au sein d'un même rhizotron. Les résultats (figure 6.1) mettent en évidence de faibles écarts-type pour tous les rhizotrons et tous les éléments. Concernant Pb, des différences significatives ont été mises en évidence entre les différentes conditions de contamination (rhizotrons 1 et 2, 3 et 4, 5 et 6, et 7 et 8). Cependant, bien qu'elles soient significatives les différences de concentrations entre les rhizotrons 1 et 2 et les rhizotrons 3 et 4 sont faibles puisque leurs concentrations moyennes en Pb sont de $46,4 \pm 3,3$, $46,5 \pm 2,1$, $52,6 \pm 4,3$, $51,7 \pm 1,8$ respectivement (annexe 16). Les concentrations en As, Cu, Fe, Mn, Sb et Zn des rhizotrons 1 à 6 (contenant les sols témoins et les sols de contamination 1 et 2) présentent peu de différences significatives, mettant en évidence l'homogénéité du sol composite utilisé pour les 3 conditions de sol correspondant à ces rhizotrons, et l'absence de lessivage suite à l'apport de cystéine. Par contre, entre les rhizotrons 7 et 8, contenant le sol multi-contaminé, des différences significatives ont été mises en évidence pour As, Cu, Fe, Mn, Pb et Zn. Pour ces éléments, la concentration moyenne du rhizotron 8 est significativement inférieure. Ceci pourrait éventuellement être lié à un lessivage des ETMM suite à l'ajout du chélatant.

6.1.2. Métaux et métalloïdes mobilisables

Les concentrations (figure 6.2 et annexe 17) et fractions en pourcentage (tableau 6.2,) de métaux et métalloïdes mobilisables (extraction par EDTA) dans les sols des différents rhizotrons, ont également été mesurées à la fin des 6 mois d'expérimentation. Les résultats montrent que le renforcement des sols avec une solution de Pb acidifiée n'a pas entraîné d'augmentation de la mobilité des autres métaux et métalloïdes, puisque les concentrations d'ETMM mobilisable pour les rhizotrons 3, 4, 5 et 6 présentent peu de différences avec celles des rhizotrons 1 et 2. L'apport de chélatant semble, par contre, avoir eu un effet sur la concentration mobilisable de certains éléments. En effet, pour une même condition de contamination, des différences significatives ont été mises en évidence entre les fractions mobilisables d'As des sols ayant reçu l'apport de chélatant et celles des sols non dopés au chélatant.

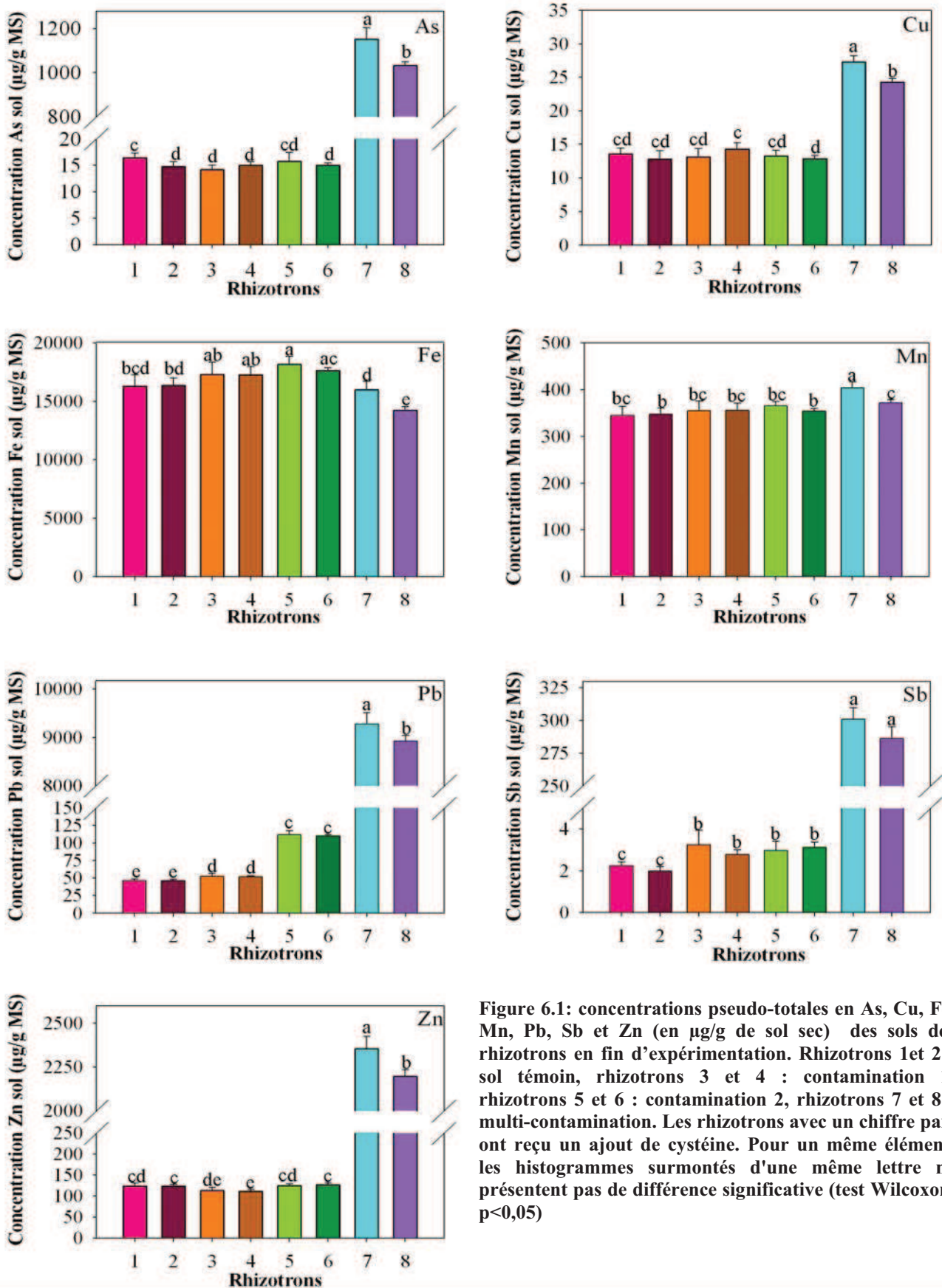


Figure 6.1: concentrations pseudo-totales en As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn (en µg/g de sol sec) des sols des rhizotrons en fin d'expérience. Rhizotrons 1et 2 : sol témoin, rhizotrons 3 et 4 : contamination 1, rhizotrons 5 et 6 : contamination 2, rhizotrons 7 et 8 : multi-contamination. Les rhizotrons avec un chiffre pair ont reçu un ajout de cystéine. Pour un même élément, les histogrammes surmontés d'une même lettre ne présentent pas de différence significative (test Wilcoxon, $p < 0,05$)

Il semble que l'apport de cystéine (rhizotrons 2, 4, 6 et 8) diminue légèrement la fraction mobilisable d'As pour les sols des rhizotrons 2 (témoin), 4 (contamination 1) et 6 (contamination 2), alors que le phénomène inverse est observé pour le rhizotron 8 (multi-contaminé). Ces observations sont confirmées par les concentrations mobilisables d'As significativement supérieures dans le cas du sol témoin et du sol de contamination 2, et significativement inférieures dans le cas du sol multi-contaminé, pour les rhizotrons n'ayant pas eu d'apport de cystéine. Ceci peut être lié à une spéciation différente de l'arsenic dans le sol témoin et multi-contaminé. Dans le sol, l'AsIII peut être sous la forme d'arsenite (AsO_3^{3-}) qui peut être immobilisé par adsorption ou co-précipitation avec des sulfures métalliques ou d'autres composés soufrés pour lesquels il a une forte affinité (Wuana and Okieimen, 2011). Il est possible que la spéciation de As dans le sol témoin et multi-contaminé soit à l'origine des différences de comportement observés face à l'ajout de cystéine. La forme arsenite, AsIII, est plus mobile dans le sol que la forme arsenate, AsV (Huang and Germida, 2001). Or, la capacité de la cystéine à réduire AsV en AsIII est connue et utilisée dans les systèmes biologiques (Shipley et al., 2008) et en chimie analytique (Cao and Ma, 2004). Les résultats observés dans le sol multi-contaminé pourraient donc être le fait d'une présence plus importante d'AsV dans ce sol et à sa transformation en AsIII, plus mobile, en présence de cystéine.

Concernant le manganèse, excepté dans le cas des rhizotrons 3 et 4, des fractions mobilisables significativement différentes ont été mise en évidence entre les rhizotrons d'un même niveau de contamination lors de l'ajout, ou non, de cystéine (tableau 6.2). Les concentrations montrent la même tendance même si les concentrations entre deux rhizotrons d'un même niveau de contamination ne présentent pas forcément de différences significatives (figure 6.2). L'augmentation de la biodisponibilité de Mn lors de l'apport de soufre ou de sulfate a déjà été mise en évidence (Soaud et al., 2011; Karimian et al., 2012). Ces observations semblent être liées à une diminution du pH qui favorise la dissolution de CaCO_3 qui a une forte affinité pour Mn dans les sols calcaires (Soaud et al., 2011). En effet, dans les sols calcaires, comme le sol des Calanques, la sorption de Mn sur CaCO_3 est plus forte que pour Fe et Zn, qui forment plutôt des complexes avec la matière organique, et dont la capacité d'absorption augmente lorsque le pH diminue (Kalbitz et al.).

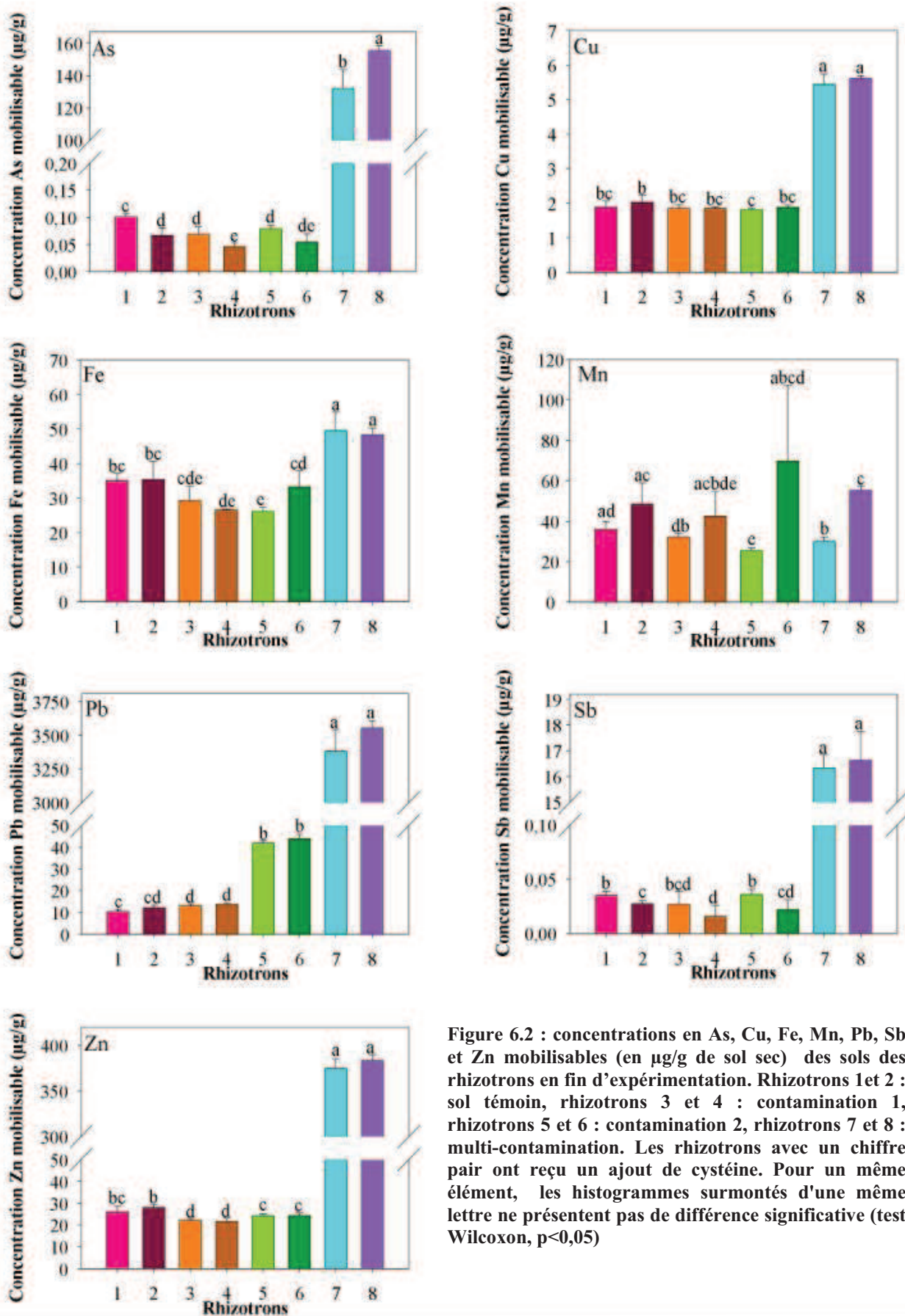


Figure 6.2 : concentrations en As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn mobilisables (en µg/g de sol sec) des sols des rhizotrons en fin d'expérimentation. Rhizotrons 1 et 2 : sol témoin, rhizotrons 3 et 4 : contamination 1, rhizotrons 5 et 6 : contamination 2, rhizotrons 7 et 8 : multi-contamination. Les rhizotrons avec un chiffre pair ont reçu un ajout de cystéine. Pour un même élément, les histogrammes surmontés d'une même lettre ne présentent pas de différence significative (test Wilcoxon, $p < 0,05$)

Tableau 6.2 : fraction mobilisable (en pourcentage) d'As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn dans les sols des rhizotrons en fin d'expérimentation. Rhizotrons 1 et 2 : sol témoin, rhizotrons 3 et 4 : contamination 1, rhizotrons 5 et 6 : contamination 2, rhizotrons 7 et 8 : multi-contamination. Les rhizotrons avec un chiffre pair ont reçu un ajout de cystéine.

Rhizotron	Eléments						
	As	Cu	Fe	Mn	Pb	Sb	Zn
1	0,62±0,06a	13,8±0,9ab	0,22±0,006a	10,4±1,1a	22,4±1,5a	1,6±0,2a	21,0±1,1ab
2	0,46±0,10bc	15,9±2,3a	0,22±0,03ab	13,9±2,8b	26,2±2,0b	1,4±1,8ab	22,7±0,8ab
3	0,49±0,09acd	14,2±1,3ab	0,17±0,03bcd	9,1±0,8a	25,0±1,3b	0,86±0,47abc	19,5±0,7ac
4	0,31±0,03b	12,9±1,0b	0,15±0,006c	11,9±3,0abd	26,6±0,6b	0,57±0,37c	19,5±0,7ac
5	0,51±0,08d	13,7±1,0ab	0,14±0,005d	7,0±0,3c	37,5±1,9cd	1,2±0,20b	19,5±1,0ac
6	0,36±0,09bc	14,6±0,6a	0,19±0,03ab	19,6±10,5ab	39,8±1,9c	0,70±0,28c	19,2±0,6c
7	11,5±1,3e	19,91±1,1c	0,31±0,04e	7,4±0,0006cd	36,5±1,8d	5,4±0,3d	15,9±0,7d
8	15,0±0,4f	23,1±0,6d	0,34±0,02e	14,9±0,6b	39,9±0,9c	5,8±0,3d	17,5±0,5e

Pour une même colonne, les valeurs suivies d'une même lettre ne présentent pas de différence significative (test de Wilcoxon, $p < 0,05$)

6.2. Croissance et concentrations en ETMM dans les romarins

6.2.1. Effet de la contamination sur la croissance du romarin et marqueurs physiologiques

La transplantation des romarins dans les rhizotrons a été à l'origine de la mort de certains individus. Ainsi, dans les rhizotrons 4 et 7 un individu est mort, trois sont morts dans les rhizotrons 5 et deux dans le rhizotrons 6. Les romarins des rhizotrons 5 et 6 ont montré des signes de jaunissement dans les premières semaines suivant la mise en culture dans les rhizotrons et sont mort moins de deux mois après le lancement de l'expérience. Les romarins des rhizotrons 4 et 7, c'est à dire un individu par rhizotron, sont morts après 4 et 5 mois respectivement.

Marqueurs physiologiques

Des analyses non destructives (Multiplex®) des teneurs en chlorophylles et en phénols des tissus superficiels des feuilles ont été réalisées sur les romarins vivants. La figure 6.3 montre les indices de chlorophylles et de phénols moyens dans les romarins des 8 rhizotrons après 1 mois, 3 mois et 6 mois de culture en présence des sols des Calanques plus ou moins contaminés. Contrairement à ce qui a été mis en évidence *in situ*, les résultats ne semblent pas mettre en évidence de relation entre la concentration en ETMM dans les parties aériennes (plus élevées pour les rhizotrons 7 et

8) et les indices de chlorophylles ou de phénols. En effet, peu de différences significatives sont mises en évidence, et aucune corrélation significative n'a été notée entre les indices mesurés à 6 mois et les concentrations en ETMM dans les parties aériennes de romarin. Cependant, des différences importantes de ces deux indices sont observées entre les mesures à 1 mois et à 3 mois (augmentation de l'indice de chlorophylles et diminution de l'indice de phénols) pour les rhizotrons 5 et 6. Elles sont liées au fait que les individus jaunissant dans ces deux rhizotrons après 1 mois d'expérimentation, étaient morts le troisième mois et n'ont pas été analysés.

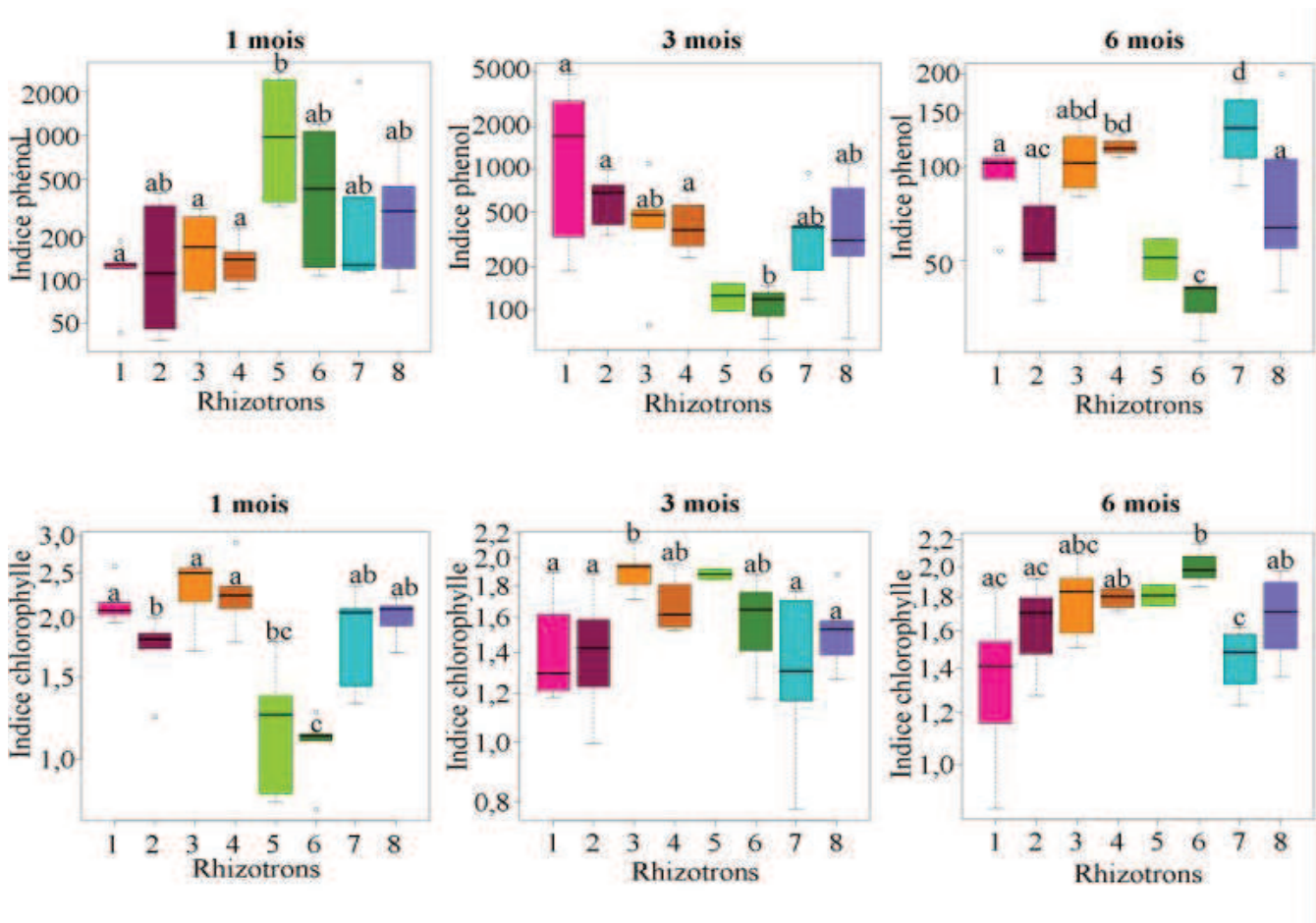


Figure 6.3 : indices de phénols (en haut) et de chlorophylles (en bas) moyens mesurés sur les romarins des rhizotrons à 1mois (gauche), 3 mois (milieu) et 6 mois (droite) de culture. Rhizotrons 1et 2 : sol témoin, rhizotrons 3 et 4 : contamination 1, rhizotrons 5 et 6 : contamination 2, rhizotrons 7 et 8 : multi-contamination. Les rhizotrons avec un chiffre pair ont reçu un ajout de cystéine. Pour un même élément, les boîtes à moustache surmontées d'une même lettre ne présentent pas de différence significative (test Wilcoxon, $p < 0,05$). Les résultats du rhizotron 5 ne concernant que 2 individus à 3 et 6 mois, et les tests de comparaison de moyenne n'étant pas valables dans ce cas, les boîtes à moustache de cette condition ne sont surmontées d'aucune lettre. Indice sans unité

Pour autant, les observations réalisées *in situ* montrant les indices de chlorophylles et de phénols comme étant des indicateurs des effets de la concentration en ETMM dans les parties aériennes de romarin ne sont pas forcément remises en cause. Un biais dans les mesures sur les transplants est possible. En effet, les transplants étant de petite taille, même après 6 mois de mise en culture, et malgré l'utilisation de caches noirs empêchant la récupération de la fluorescence d'éléments présent autour des romarins, comme le substrat, il est envisageable que le fait qu'il y ait beaucoup de vide dans la zone flashée ait été source de mesures faussées. De plus, la transplantation des romarins du terreau vers un sol plus pauvre en nutriment et aux propriétés physico-chimiques complètement différentes, pourrait constituer une source de stress et de modifications métaboliques plus important que l'effet des ETMM.

Mesures de la biomasse

Lors de l'arrêt de l'expérimentation, les parties aériennes et les racines des individus vivants ont été séparées et pesées avant et après séchage. Les résultats des biomasses sèches et des taux d'hydratations moyens par rhizotron sont présentés dans le tableau 6.3. Ces résultats montrent une grande hétérogénéité entre individus et peu ou pas de différences significatives entre les conditions de contamination pour ces deux variables. Le romarin est une espèce à croissance lente (Pausas, 1999), ainsi il est possible que 6 mois d'expérimentation ne soient pas suffisants pour mettre en évidence une variation de croissance. En effet, au cours d'une expérimentation de plusieurs années, Moreno et al. (2007) ont montré qu'en présence d'ETMM, l'augmentation de la longueur des parties aérienne est réduite de 82% par rapport à des individus n'étant pas soumis à la contamination.

Par contre, la contamination du sol semble avoir un effet sur la survie des romarins. La mort de 50% des individus soumis à la contamination 2 (rhizotrons 5 et 6) est probablement liée à l'augmentation de la concentration en Pb puisque dans les rhizotrons 1, 2, 3, 4 contenant le sol de G6 également, seul un individu est mort dans le rhizotron 4 (contamination 1) et cela au bout de plusieurs mois. Cependant, si seul le niveau de contamination était à l'origine de cette mortalité précoce, les individus soumis à la multi-contamination seraient également morts puisque les concentrations en Pb, mais également en As, Sb et Zn pseudo-totales, mobilisables et échangeables y sont plus importantes (pour As, Sb et Zn cf. annexes 4, 5 et 6). Une acidification du sol suite au renforcement des rhizotrons 5 et 6 par une solution de Pb acidifiée aurait pu être à

l'origine de cette observation. Mais les résultats de caractérisation des sols des rhizotrons (tableau 6.1) ne montrent pas de baisse importante et significative du pH. De plus, des études ont montré que les romarins sont capables de survivre sur des sols relativement acides (Moreno et al., 2007; Moreno-Jimenez et al., 2011). Un ou plusieurs autres facteurs semblent donc intervenir dans la capacité de survie des romarins dans des sols contaminés.

Tableau 6.3 : Biomasses sèches moyennes et teneurs en eau moyennes (\pm écart-type) pour les racines et les parties aériennes des romarins des rhizotrons en fin d'expérimentation. Rhizotrons 1 et 2 : sol témoin, rhizotrons 3 et 4 : contamination 1, rhizotrons 5 et 6 : contamination 2, rhizotrons 7 et 8 : multi-contamination. Les rhizotrons avec un chiffre pair ont reçu un ajout de cystéine. Pour une même colonne, les valeurs ne présentant pas de différence significative sont suivies d'une même lettre (test Wilcoxon, $p < 0,05$).

Rhizotrons	Masse sèche (g)		Teneur en eau (%)	
	Racines	P. aériennes	Racines	P. aériennes
1	0,72 \pm 0,53ab	2,08 \pm 1,74a	73,7 \pm 2,9a	51,0 \pm 3,9a
2	0,51 \pm 0,32ab	1,66 \pm 0,88a	68,0 \pm 9,8a	49,0 \pm 10,7ab
3	0,70 \pm 0,12b	2,51 \pm 0,84a	68,7 \pm 6,5a	48,8 \pm 9,2ab
4	0,64 \pm 0,12ab	2,23 \pm 1,37a	69,4 \pm 4,8a	46,8 \pm 6,4ab
5	0,30 \pm 0,10ab	1,56 \pm 0,16a	55,2 \pm 19,4a	49,9 \pm 4,1ab
6	0,27 \pm 0,14a	1,51 \pm 0,62a	63,7 \pm 17,1a	50,1 \pm 6,7ab
7	0,59 \pm 0,34ab	2,23 \pm 1,37a	78,7 \pm 12,4a	47,8 \pm 5,6ab
8	0,55 \pm 0,31ab	1,54 \pm 0,81a	67,6 \pm 5,0a	40,8 \pm 4,5b

6.2.2. Accumulation des ETMM dans les romarins

6.2.2.1. Concentrations en ETMM dans les parties aériennes

Les concentrations moyennes en ETMM dans les parties aériennes, présentées figure 6.4, prennent en compte les résultats mesurés dans les feuilles et les tiges des individus n'ayant pas survécus jusqu'à la fin de l'expérimentation (annexe 18).

L'ajout de cystéine ne semble pas avoir eu d'effet sur l'absorption et la translocation des ETMM. En effet, excepté pour As dans le cas de la multi-contamination (rhizotrons 7 et 8), aucune différence significative n'a été montrée entre les concentrations moyennes en ETMM dans les parties aériennes des individus soumis, ou non, au chélatant. Par contre, des différences significatives ont été mises en évidence entre les concentrations en As, Pb et Sb des romarins des rhizotrons 7 et 8, et les romarins des autres rhizotrons. Les concentrations en Pb dans les parties

aériennes des romarins des rhizotrons témoin et des rhizotrons avec la contamination 1, ne présentent pas de différences significatives, montrant que la concentration échangeable de Pb dans le sol n'est pas représentative de la concentration phytodisponible (tableau 6.1). Concernant les romarins des rhizotrons 5 et 6, soumis au niveau de contamination 2, ils ne présentent pas de concentrations en Pb significativement différentes de celles des romarins des rhizotrons de 1 à 4, même si une tendance à l'augmentation semble apparaître. Cette tendance est en fait liée aux individus morts, puisque les mesures mettent en évidence que les concentrations les plus importantes sont retrouvées dans les individus n'ayant pas survécu aux 6 mois d'expérimentation. En effet, en ne tenant pas compte de ces individus les moyennes tombent à 4,1 et 4,5 $\mu\text{g/g}$ de Pb pour les rhizotrons 5 et 6 respectivement, contre les 6,9 et 11,6 $\mu\text{g/g}$ de Pb présentées dans la figure 6.4 (annexe 19), ce qui est proche des concentrations moyennes obtenues pour les romarins ayant poussés dans le sol témoin (4,4 et 4,1 $\mu\text{g/g}$ de Pb) et dans le sol contaminé 1 (3,8 et 3,0 $\mu\text{g/g}$ de Pb). Il est difficile de savoir si ces plus importantes concentrations dans les parties aériennes des romarins n'ayant pas survécu, sont la cause ou la conséquence de la mort de l'individu. En effet, la présence en trop grande quantité d'ETMM dans les tissus peuvent être à l'origine de la mort des végétaux (Schützendübel and Polle, 2002; Hossain et al., 2012). Cependant, dans ce cas, les romarins des rhizotrons 7 et 8, dont les concentrations en ETMM dans les parties aériennes sont les plus élevées, devraient également être touchés par cette mortalité. Cette élévation de la concentration dans les parties aériennes pourrait être liée à un mécanisme de détoxification, mis en place par les plantes tolérantes, qui consiste à diriger les ETMM dans les feuilles âgées et sénescentes avant leur chute (Olko et al., 2008).

Les résultats mettent également en évidence que les concentrations moyennes mesurées dans les parties aériennes des romarins des rhizotrons 7 et 8 sont plus importantes que celles mesurées *in situ* sur le site G0, et même plus importante que les concentrations moyennes maximales mesurées *in situ* tout site confondu. En effet, des concentrations moyennes de 6,3 \pm 3,8 et 3,5 \pm 0,8 $\mu\text{g/g}$ d'As, 60,1 \pm 46,3 et 37,3 \pm 12,1 $\mu\text{g/g}$ de Pb, 2,4 \pm 2,9 et 1,3 \pm 0,3 $\mu\text{g/g}$ de Sb, 98,4 \pm 24,0 et 115,4 \pm 27,4 $\mu\text{g/g}$ de Zn ont été mesurés pour les parties aériennes dans les rhizotrons 7 et 8 respectivement, contre des concentrations moyenne maximales *in situ* de 0,89 \pm 0,69, 16,2 \pm 5,1, 0,66 \pm 0,34 et 59,9 \pm 8,3 $\mu\text{g/g}$ pour As, Pb, Sb et Zn respectivement. Ceci pourrait être du à un effet de dilution des ETMM dans les parties aériennes des romarins des Calanques, puisque les romarins échantillonnés *in situ* étaient plus âgés et avaient une biomasse plus importante (Pulford and

Watson, 2003; Duman et al., 2007; Villares et al., 2002). L'irrigation pourrait également être à l'origine de cette observation. En effet, l'apport d'eau pendant cette expérimentation en conditions contrôlées ne reflétait pas la réalité du terrain. Or, le taux de transpiration est corrélé à la quantité d'eau dans le sol (Anandacoomaraswamy et al., 2000) et des études ont montrés l'augmentation de la concentration en Pb dans la laitue (Liao et al., 2006) et en Cu et Zn dans les parties aériennes de *Fagopyrum esculentum* L. (Tani and Barrington, 2005) avec l'augmentation de la transpiration. Cette hypothèse pourrait être valable pour le Zn dont les concentrations moyennes sont supérieures aux concentrations mesurées *in situ*, et ce quelque soit la condition de contamination du sol. Cependant, cela ne semble pas être à l'origine des importantes concentrations en As, Pb et Sb mises en évidence dans les rhizotrons 7 et 8. En effet, ce phénomène n'est pas observé pour As, Pb et Sb dans les romarins des rhizotrons 1 à 4 (témoin et contamination 1) puisque, dans ce cas, les concentrations en ces trois éléments correspondent à celles trouvées *in situ* pour des niveaux de contamination identiques, c'est à dire dans les romarins du site G6. Pour ces éléments, cette observation pourrait être, comme cela a été évoqué chapitre 3, liée à l'impossibilité pour les racines d'éviter la contamination dans les rhizotrons puisque l'intégralité du sol présent est contaminée. Cependant, les niveaux de contamination n'atteignent pas les valeurs mesurées par Testiati (2012) dans les parties aériennes de romarin poussant sur le site même de l'Escalette, et en particulier sur les crassiers, excepté pour l'individu mort du rhizotrons 7, pour lequel une concentration de 138 µg/g de Pb a été relevée.

Les facteurs de bioconcentration dans les parties aériennes (BCF_{pa}) ont été calculés (tableau 6.4). Les valeurs de BCF_{pa} des rhizotrons 7 et 8 sont significativement inférieures à celles calculées pour les individus des autres rhizotrons, conformément à ce qui a été mis en évidence dans le chapitre 3, où une diminution des BCF_{pa} était observée sur les sites les plus contaminés.

Les BCF_{pa} calculés par rapport aux concentrations pseudo-totales du sol sont très inférieurs à 1 pour As, Pb et Sb. Concernant Zn, ces facteurs sont compris entre 0,59 et 0,89 pour les rhizotrons de 1 à 6. Malgré des concentrations en ETMM dans les parties aériennes généralement supérieures pour un niveau de contamination du sol similaire, les valeurs de BCF_{pa} restent du même niveau que celles déterminées *in situ* (cf. chapitre 3, tableau 3.8).

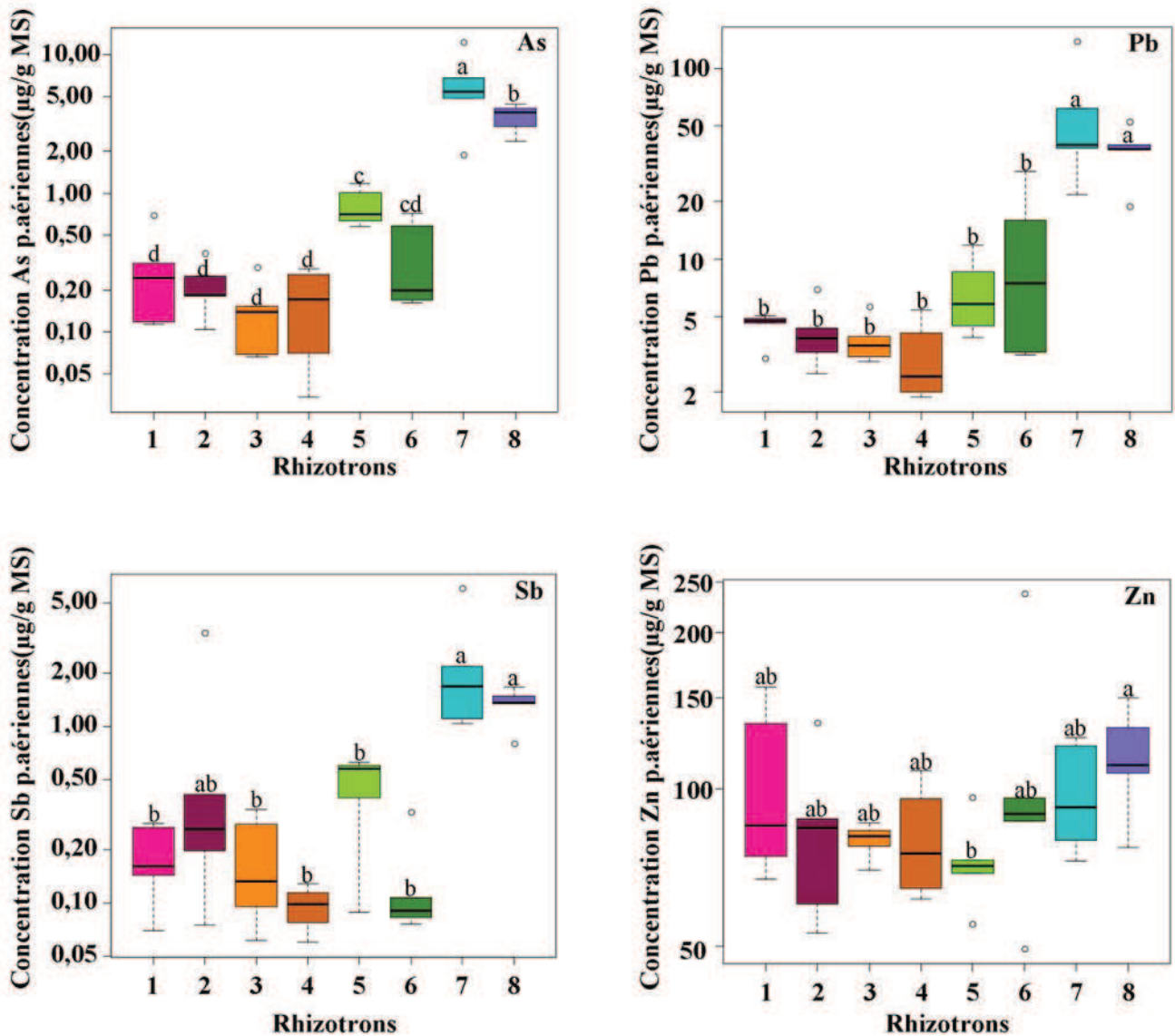


Figure 6.4 : concentrations moyennes en As, Pb, Sb et Zn (en $\mu\text{g/g MS}$) dans les parties aériennes des romarins des rhizotrons en fin d'expérimentation. Rhizotrons 1 et 2 : sol témoin, rhizotrons 3 et 4 : contamination 1, rhizotrons 5 et 6 : contamination 2, rhizotrons 7 et 8 : multi-contamination. Les rhizotrons avec un chiffre pair ont reçu un ajout de cystéine. Pour un même élément, les boîtes à moustache surmontées d'une même lettre ne présentent pas de différence significative (test Wilcoxon, $p < 0,05$). Echelle logarithmique

Tableau 6.4 : valeurs des facteurs de bioconcentration (BCF_{pa}) moyennes (\pm écart-type) dans les parties aériennes de romarin ($[M_{parties\ aériennes}]/[M_{sol\ pseudo-total}]$) pour As, Pb, Sb et Zn dans les rhizotrons en fin d'expérimentation. Rhizotrons 1 et 2 : sol témoin, rhizotrons 3 et 4 : contamination 1, rhizotrons 5 et 6 : contamination 2, rhizotrons 7 et 8 : multi-contamination. Les rhizotrons avec un chiffre pair ont reçu un ajout de cystéine.

Rhizotrons	BCF _{pa} par élément			
	As	Pb	Sb	Zn
1	0,018±0,015a	0,097±0,022a	0,084±0,043ab	0,83±0,31a
2	0,015±0,008a	0,089±0,035a	0,46±0,76a	0,68±0,27a
3	0,010±0,007a	0,072±0,018a	0,055±0,035ab	0,70±0,04a
4	0,011±0,007ac	0,058±0,028a	0,035±0,009ab	0,73±0,21a
5	0,052±0,014b	0,062±0,030a	0,16±0,09ab	0,59±0,15a
6	0,024±0,018ab	0,11±0,10a	0,045±0,039b	0,89±0,59a
7	0,006±0,004cb	0,007±0,005b	0,008±0,007c	0,042±0,011b
8	0,003±0,001cb	0,004±0,001b	0,005±0,001c	0,053±0,013b

Pour une même colonne les valeurs ne présentant pas de différence significative sont suivies d'une même lettre (test Wilcoxon, $p < 0,05$)

6.2.2.2. Concentrations en ETMM dans les parties racinaires

Les concentrations en ETMM dans les racines sont présentées figure 6.5. Dans ce cas, les résultats ne tiennent compte que des individus vivants à la fin de l'expérimentation. Les résultats mettent en évidence des concentrations racinaires en As, Pb, Sb et Zn significativement plus importantes dans les racines des romarins des rhizotrons contenant le sol multi-contaminé (rhizotrons 7 et 8), comparé aux autres conditions de contamination. Concernant Pb, les concentrations racinaires des romarins soumis à la contamination 2, particulièrement ceux du rhizotrons 6, montrent une différence significative par rapport aux concentrations mesurées dans les romarins des rhizotrons 1 à 4 contenant le sol témoin et la contamination 1. Ceci confirme le fait que la concentration racinaire est corrélée à la contamination du sol. Comme observé dans le cas des parties aériennes, des concentrations moyennes supérieures à celles mesurées dans les racines des individus prélevés *in situ* sont mises en évidence, et ce pour les 4 éléments étudiés.

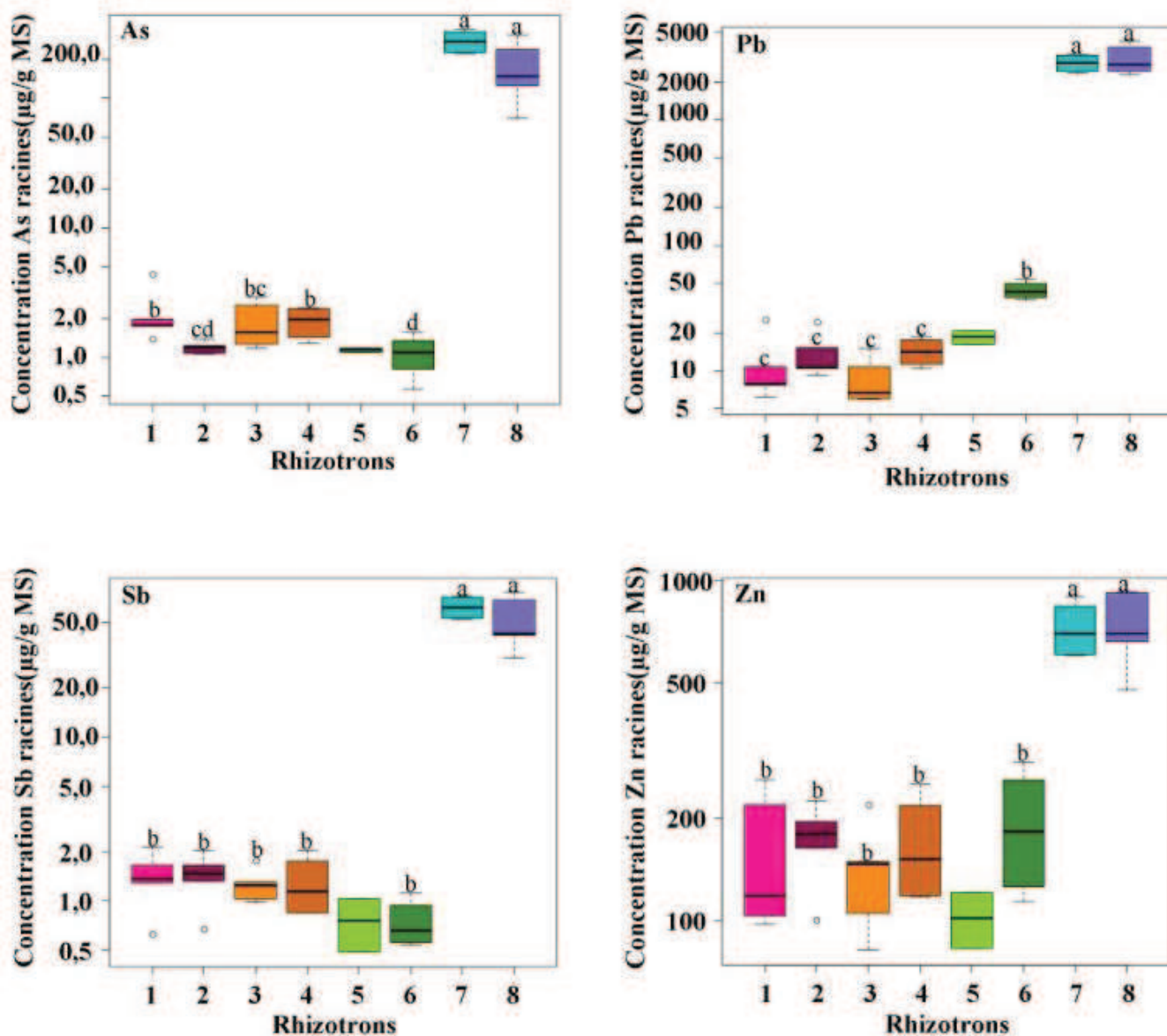


Figure 6.5 : concentrations moyennes en As, Pb, Sb et Zn (en $\mu\text{g/g MS}$) dans les racines des romarins des rhizotrons en fin d'expérimentation. Rhizotrons 1et 2 : sol témoin, rhizotrons 3 et 4 : contamination 1, rhizotrons 5 et 6 : contamination 2, rhizotrons 7 et 8 : multi-contamination. Les rhizotrons avec un chiffre pair ont reçu un ajout de cystéine. Pour un même élément, les boîtes à moustache surmontées d'une même lettre ne présentent pas de différences significatives (test Wilcoxon, $p < 0,05$). Les résultats du rhizotron 5 ne concernant que 2 individus et les tests de comparaison de moyenne n'étant pas valables dans ce cas, les boîtes à moustache de cette condition ne sont surmontées d'aucune lettre. Concentrations présentées suivant une échelle logarithmique.

Ainsi, des concentrations moyennes de 276 et 178 $\mu\text{g/g}$ d'As, 2848 et 3104 $\mu\text{g/g}$ de Pb, 62 et 42 $\mu\text{g/g}$ de Sb et 723 et 735 $\mu\text{g/g}$ de Zn ont été mesurées dans les romarins des rhizotrons 7 et 8 respectivement (annexe 23), contre des valeurs moyennes maximales relevées *in situ* de 49 $\mu\text{g/g}$ d'As, 935 $\mu\text{g/g}$ de Pb, 19,6 $\mu\text{g/g}$ de Sb et 369 $\mu\text{g/g}$ de Zn sur le site G0. Les mêmes observations

sont faites dans le cas des romarins soumis à la contamination 1 et sur le sol témoin, comparés aux romarins du site G6. Dans ce cas, les concentrations moyennes dans les rhizotrons de 1 à 4 sont comprises entre 1,1 et 2,3 $\mu\text{g/g}$ d'As, 8,8 et 14,3 $\mu\text{g/g}$ de Pb, 0,7 et 1,4 $\mu\text{g/g}$ de Sb et 101 et 192 $\mu\text{g/g}$ de Zn, contre des concentrations moyennes dans les racines de romarins prélevées *in situ* sur G6 de 0,4, 2,5, 0,08 et 19 $\mu\text{g/g}$ pour As, Pb, Sb et Zn, respectivement. Ceci est probablement lié au fait que, comme cela a été mis en évidence au chapitre 5, les ETMM sont plus concentrés dans les racines fines. Or, le réseau racinaire des romarins des rhizotrons était majoritairement composé de racines dont le diamètre était inférieur à 0,2 mm.

Concernant l'ajout de chélatant, dans ce cas encore, il ne semble pas augmenter l'absorption des ETMM par le romarin. En effet, excepté pour As dans le cas des romarins du sol témoin, pour une même condition de contamination il n'y a pas de différences significatives entre les individus ayant reçu ou non l'apport de cystéine. Cependant, la cystéine est rapidement dégradée dans le sol et le romarin est une plante à croissance lente. En effectuant un apport plus régulier et/ou en laissant les plantes dans le sol plus de 15 jours après l'apport de chélatant, une différence aurait, peut être pu être mise en évidence, puisque malgré l'absence de différence significative, une légère tendance à l'augmentation des concentrations racinaires moyennes en Pb et Zn est observée. En effet, les concentrations moyennes en Pb dans les racines de romarin des rhizotrons sont de [11,7 et 14,1 $\mu\text{g/g}$], [8,9 et 14,3 $\mu\text{g/g}$], [18,6 et 44,2 $\mu\text{g/g}$], et de [28488 et 3104] pour les rhizotrons [1 et 2], [3 et 4], [5 et 6] et [7 et 8], respectivement. Les concentrations moyennes racinaires en Zn sont quant à elles, de [159 et 173 $\mu\text{g/g}$], [140 et 168 $\mu\text{g/g}$], [101 et 192 $\mu\text{g/g}$], et de [723 et 735 $\mu\text{g/g}$] dans les rhizotrons [1 et 2], [3 et 4], [5 et 6] et [7 et 8], respectivement.

Les facteurs de bioconcentration racinaire (BCF_r) ont été calculés (tableau 6.5). Une diminution significative des valeurs de BCF_r est mise en évidence avec l'augmentation de la contamination pour Zn. Malgré cela, les valeurs de BCF_r moyennes obtenues dans tous les rhizotrons sont plus élevées que celles mises en évidence pour les romarins prélevés *in situ*, tout site confondu.

Concernant les autres ETMM, les valeurs de BCF_r varient peu, ou pas lorsque la contamination augmente fortement, confirmant le fait que la concentration dans les racines est proportionnelle à la contamination du sol. Les valeurs de BCF_r obtenues dans ce cas sont, en règle générale, supérieures à celles obtenues *in situ* pour As, Pb et Sb.

Tableau 6.5 : Valeurs des facteurs de bioconcentration racinaire (BCF_r) moyennes (± écart-type) dans les romarins ($[M_{\text{racines}}]/[M_{\text{sol pseudo-total}}]$) pour As, Pb, Sb et Zn dans les rhizotrons en fin d'expérimentation. Rhizotrons 1 et 2 : sol témoin, rhizotrons 3 et 4 : contamination 1, rhizotrons 5 et 6 : contamination 2, rhizotrons 7 et 8 : multi-contamination. Les rhizotrons avec un chiffre pair ont reçu un ajout de cystéine.

Rhizotrons	BCF _r par élément			
	As	Pb	Sb	Zn
1	0,14±0,08ac	0,25±0,17ab	0,64±0,26ab	1,3±0,6a
2	0,080±0,004b	0,30±0,13ab	0,71±0,25a	1,4±0,4a
3	0,13±0,06abc	0,17±0,08a	0,41±0,16bc	1,2±0,5a
4	0,13±0,04c	0,28±0,08ab	0,48±0,23abc	1,5±0,6a
5	0,072±0,007	0,16±0,03	0,25±0,14	0,81±0,21
6	0,071±0,026bc	0,40±0,06b	0,24±0,08cd	1,51±0,64a
7	0,24±0,06a	0,31±0,06ab	0,21±0,04d	0,31±0,06b
8	0,17±0,09abc	0,35±0,10b	0,18±0,07d	0,34±0,09b

Pour une même colonne, les valeurs ne présentant pas de différence significative sont suivies d'une même lettre (test Wilcoxon, $p < 0,05$). Les résultats du rhizotron 5 ne concernant que 2 individus et les tests de comparaison de moyenne n'étant pas valables dans ce cas, les valeurs de cette condition ne sont donc suivies d'aucune lettre.

Les facteurs de translocation (TF) ont également été déterminés (tableau 6.6). Ils restent inférieurs à 1 pour toutes les conditions de contamination et tous les éléments. L'effet de filtre racinaire est à nouveau mis en évidence, puisque les TF obtenus pour les romarins soumis à de fortes contaminations en ETMM (rhizotrons 7 et 8) sont significativement inférieurs à ceux calculés pour les contaminations plus faibles.

Tableau 6.6 : Valeurs des facteurs de translocation (TF) moyennes (± écart-type) dans les romarins ($[M_{\text{parties aériennes}}]/[M_{\text{racine}}]$) pour As, Pb, Sb et Zn dans les rhizotrons en fin d'expérimentation. Rhizotrons 1 et 2 : sol témoin, rhizotrons 3 et 4 : contamination 1, rhizotrons 5 et 6 : contamination 2, rhizotrons 7 et 8 : multi-contamination. Les rhizotrons avec un chiffre pair ont reçu un ajout de cystéine.

Rhizotrons	Éléments			
	As	Pb	Sb	Zn
1	0,12±0,05ab	0,50±0,25ab	0,17±0,16a	0,67±0,11a
2	0,19±0,10a	0,31±0,08ab	0,50±0,67a	0,49±0,12b
3	0,08±0,04b	0,48±0,17a	0,16±0,12a	0,63±0,24ab
4	0,09±0,07abc	0,23±0,15ab	0,084±0,046a	0,52±0,19ab
5	0,69±0,24	0,23±0,02	0,37±0,27a	0,74±0,21
6	0,27±0,14a	0,18±0,17b	0,24±0,23a	0,50±0,27ab
7	0,017±0,007c	0,014±0,004c	0,024±0,008b	0,13±0,02c
8	0,023±0,008c	0,012±0,003c	0,027±0,007b	0,16±0,04c

Pour une même colonne, les valeurs ne présentant pas de différence significative sont suivies d'une même lettre (test Wilcoxon, $p < 0,05$). Les résultats du rhizotron 5 ne concernant que 2 individus et les tests de comparaison de moyenne n'étant pas valables dans ce cas, les valeurs de cette condition ne sont donc suivies d'aucune lettre.

6.2.2.3. Bilan de l'accumulation des ETMM par les romarins après 6 mois de culture

La récupération de la totalité des parties aériennes et de la quasi-totalité de la masse racinaire, nous permet d'évaluer la quantité d'ETMM accumulée par un romarin en 6 mois (tableau 6.7). Les résultats montrent que Zn est l'élément le plus accumulé pour les niveaux de contamination faibles et que la majorité est présente dans les parties aériennes. Cependant, dans le cas de la multi-contamination, pour tous les éléments les quantités accumulées le sont principalement dans les racines. Il est également mis en évidence qu'en cas de contamination extrême, le romarin dans sa globalité est capable d'accumuler en moyenne presque 2 mg de Pb en 6 mois, dont la quasi-totalité dans ces racines. Les quantités de Pb accumulées dans ce cas représentent environ 0,1 % de la masse de matière fraîche des racines de romarin. Ainsi, d'après ces résultats, les jeunes racines de romarins semblent capables d'hyperaccumuler Pb (McGrath et al., 2002). Ces observations ajoutées aux conclusions précédentes mettant en évidence la tolérance de cette espèce et la faible translocation de cet élément vers les parties aériennes, permettent d'avancer que le romarin semble être un parfait candidat pour la phytostabilisation des sols fortement contaminés en Pb.

Tableau 6.7 : masses moyennes (\pm écart-type) de As, Pb, Sb et Zn (en μ g) accumulées dans les romarins entiers et dans les parties racinaires, au bout de 6 mois de croissance dans les rhizotrons. Rhizotrons 1et 2 : sol témoin, rhizotrons 3 et 4 : contamination 1, rhizotrons 5 et 6 : contamination 2, rhizotrons 7 et 8 : multi-contamination. Les rhizotrons avec un chiffre pair ont reçu un ajout de cystéine.

Rhizotrons	Eléments en fonction des parties du romarin concernées							
	As		Pb		Sb		Zn	
	entier	racines	entier	racines	entier	racines	entier	racines
1	1,71 \pm 0,91	1,28 \pm 0,70	15,9 \pm 10,5	6,0 \pm 2,8	1,44 \pm 1,18	0,97 \pm 0,83	254 \pm 176	87,0 \pm 45,3
2	1,00 \pm 0,53	0,61 \pm 0,40	11,7 \pm 5,8	6,0 \pm 3,7	1,29 \pm 0,37	0,66 \pm 0,47	190 \pm 87	86,5 \pm 62,3
3	1,70 \pm 0,91	1,37 \pm 0,72	15,2 \pm 6,5	6,4 \pm 3,5	1,35 \pm 0,47	0,89 \pm 0,28	274 \pm 109	99,0 \pm 44,7
4	1,64 \pm 0,64	1,22 \pm 0,43	17,3 \pm 10,2	9,1 \pm 2,8	1,04 \pm 0,46	0,84 \pm 0,45	268 \pm 76	108 \pm 52
5	1,89 \pm 0,82	0,34 \pm 0,09	12,2 \pm 0,6	5,5 \pm 0,8	0,86 \pm 0,76	0,21 \pm 0,04	142 \pm 7,8	32,0 \pm 17,8
6	0,53 \pm 0,29	0,24 \pm 0,16	20,8 \pm 15,0	13,2 \pm 8,4	0,38 \pm 0,26	0,23 \pm 0,20	181 \pm 100	48,0 \pm 39,8
7	186 \pm 127	175 \pm 128	1861 \pm 1219	1771 \pm 1220	42,1 \pm 25,7	38,9 \pm 26,6	645 \pm 273	446 \pm 293
8	117 \pm 125	112 \pm 122	1898 \pm 1542	1844 \pm 1515	33,1 \pm 29,4	31,3 \pm 18,4	581 \pm 372	421 \pm 319

Ainsi, la croissance des romarins sur les sols contaminés ne semble être que peu influencée par la présence d'ETMM. Cependant, le romarin ayant une croissance lente, 6 mois de culture ne sont peut être pas suffisants pour mettre en évidence une éventuelle inhibition de son développement.

Les concentrations en ETMM mesurées dans les parties aériennes et racines des romarins mis en culture dans les rhizotrons sont plus élevées que celles des romarins prélevés *in situ*. Malgré cela, le comportement des romarins ne semble pas différent. En effet, la diminution des BCF_{pa} et des TF avec l'augmentation de la contamination laissent présager une limitation de la concentration en ETMM dans les parties aériennes, alors que la similarité des valeurs de BCF_r quelque soit le niveau de contamination met en évidence une proportionnalité entre la concentration dans le sol et celle dans les racines. Le potentiel de phytostabilisation, dans le cadre de ces études *ex situ* semble confirmé par le fait que le romarin est capable, en cas de contamination importante en Pb, d'accumuler 0,1% en masse fraîche de cet élément dans ses parties racinaires en 6 mois.

La mortalité importante observée dans le cas de la contamination 2, reste inexplicée. La toxicité des ETMM en est probablement la cause, mais d'autres facteurs semblent impliqués puisque les romarins des rhizotrons 7 et 8, pourtant soumis à une contamination forte et multiple, n'ont pas subi le même sort. Les phénomènes prenant place au niveau de la rhizosphère sont connus pour jouer un rôle important dans la tolérance des plantes aux ETMM. Ainsi, la présence de symbioses racinaires, la composition des exsudats racinaires et l'activité microbienne du sol ont été étudiés.

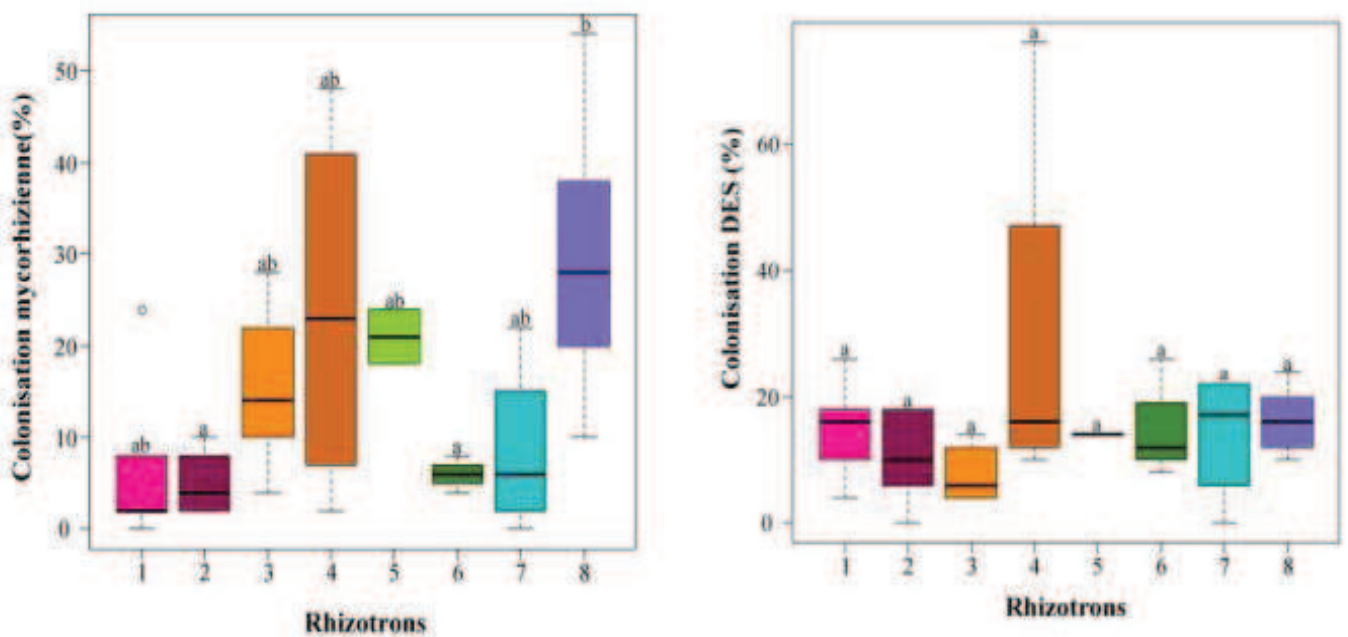
6.3. Etude de la rhizosphère

6.3.1 Symbioses racinaires

Les taux de colonisation des racines par les champignons endomycorhiziens à arbuscules (CMA) et les champignons fongés septés (DSE) ont été déterminés (figure 6.6).

Concernant les champignons endomycorhiziens à arbuscules, peu de différences significatives ont été mise en évidence. L'absence de différence significative entre les taux de colonisation des romarins des conditions témoins, de la contamination 1 et de la contamination 2, laisse penser que le renforcement du sol en Pb n'a pas affecté la survie de spores naturellement présentes dans le sol de G6. Seuls les individus du rhizotrons 8 sont significativement plus colonisés que ceux des rhizotrons 2 et 4. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux présenté au chapitre 5, pour lesquels le taux de colonisation semblait corrélé à la contamination. De plus, les taux de colonisation déterminés dans l'expérimentation en conditions contrôlées sont, en règle générale, plus faibles que ceux trouvés pour les romarins prélevés *in situ*. En effet, les taux de colonisation moyens, toute condition confondue, sont compris entre 5,4 et 30% alors que *in situ*, des taux de

colonisation moyens compris entre 18 et 86% ont été déterminés. Ceci pourrait être lié à la période de stabilisation du sol de 5 mois avant la mise en culture en rhizotron. En effet, les CMA sont des biotrophes obligatoires, c'est-à-dire qu'ils ne sont capables de se nourrir et de se développer que sur des tissus végétaux vivants. Des études ont montré que, bien que des propagules viables puissent persister longtemps dans le sol, leur nombre diminue fortement dans le sol après plusieurs mois sans hôte (Douds et al., 2011). De plus, bien que la présence d'hôte ne soit pas nécessaire à la germination des spores, après 3 mois de développement en absence de plante, la capacité d'infection des hyphes baisse fortement (Logi et al., 1998). Ainsi, Douds et al. (2011) ont mis en évidence un taux de colonisation plus faible de *Paspalum notatum* lorsqu'il était mis en culture sur un sol laissé nu pendant plusieurs mois, comparé à celui déterminé sur un sol où *Vicia villosa* avait été préalablement cultivée. La forte variabilité de colonisation observée entre les individus d'un même rhizotron pourrait, quant à elle, être liée à une hétérogénéité de la présence de propagules dans les différents compartiments des rhizotrons.



Concernant les champignons fongés septés (DSE), le taux de colonisation ne semble pas modifié par la contamination, contrairement à ce qui a été mis en évidence *in situ* (chapitre 5), puisqu'aucune différence significative n'a été mise en évidence. Des taux de colonisation moyens similaires à ce qui a été déterminé *in situ* ont été observés dans les rhizotrons. En effet, des taux de colonisation moyens entre [8,0 et 29,5 %] et entre [5,4 et 24 %] ont été déterminés en conditions contrôlées et *in situ*, respectivement. Les DSE semblent être des biotrophes facultatifs (Jumpponen and Trappe, 1998), ce qui pourrait expliquer que leur taux de colonisation n'ait pas été affecté par l'absence d'hôte pendant plusieurs mois.

Les expérimentations en conditions contrôlées ne permettent pas de confirmer le rôle des champignons endomycorhiziens et des DSE dans la tolérance des romarins aux ETMM. En effet, les taux de colonisations des romarins par des CMA et/ou par des DSE sur le sol multi-contaminé et sur les autres sols, sont similaires. Pour autant, la corrélation entre l'augmentation du taux de colonisation par les CMA avec la contamination observée au chapitre 5 ne peut pas être remise en cause. En effet, une détérioration du pool de ces symbiotes, suite à l'absence d'hôte pendant la période de stabilisation du sol, pourrait être à l'origine de la diminution de la colonisation observée.

L'élévation des facteurs de translocation et des concentrations en ETMM dans les parties aériennes des romarins des rhizotrons par rapport aux romarins prélevés *in situ*, pourrait éventuellement être liée au plus faible taux de colonisation puisque les CMA sont capables de limiter le transfert des ETMM des racines vers les parties aériennes (Rabie, 2005; Gohre and Paszkowski, 2006). Des expérimentations complémentaires sont nécessaires afin de mettre cela en évidence. Il serait intéressant par exemple de comparer de l'absorption des ETMM par des individus mis en culture dans un sol contaminé, stérilisé au rayon gamma, auquel des souches de CMA naturellement présentes sur le site, seraient inoculées ou non.

6.3.2. Effet de la pollution sur les exsudations racinaires

Une analyse semi-quantitative des acides organiques exsudés par les racines de romarin soumis aux différents niveaux de contamination a été menée dans les rhizotrons (tableau 6.8).

Après l'ajout de cystéine, le volume d'exsudats racinaires étant faible, plusieurs échantillons ont été rassemblés et mélangés. Cependant, la plupart des acides organiques n'étaient présents que

sous forme de traces. Un pic correspondant à une masse molaire de 115 g/mol et ne rentrant pas dans la composition des étalons utilisés a été détecté dans tous les échantillons des rhizotrons ayant reçu un apport de chélatant. Son temps de rétention et sa masse molaire ne correspondant pas aux acides organiques les plus fréquemment retrouvés dans ce type d'échantillon (acides citrique, oxalique, malique, fumarique, maléique, succinique, acétique, formique, butyrique, aconitique, lactique), ni à du sulfate, le composé correspondant à ce pic n'a donc pas pu être identifié.

Les analyses effectuées sur les échantillons rassemblés et obtenus avant l'ajout de cystéine pour chaque niveau de contamination, montrent que les acides organiques majoritairement exsudés par les racines de romarin semblent être l'acide citrique, lactique, malique, succinique et malonique. La présence de ces acides organiques dans les exsudats racinaires a déjà été mise en évidence chez d'autres plantes (Dakora and Phillips, 2002; Badri and Vivanco, 2009). Ces analyses semi quantitatives semblent mettre en évidence une augmentation de l'exsudation de ces acides organiques avec l'augmentation de la contamination en Pb. L'augmentation de l'exsudation d'acide organique avec des doses croissantes de Pb a également été mis en évidence chez la laitue (Liao et al., 2006), mais il semble que ce ne soit pas un comportement généralisable, car Yang et al. (2001) ont montré une faible influence, quelle que soit la dose ajoutée, de cet élément sur l'excrétion d'acide malique, oxalique et citrique par *Agrocyron elongatum*. En présence d'ETMM, les plantes excrètent des acides organiques dans la rhizosphère afin de rendre ces éléments moins mobiles et donc moins biodisponibles par formation de complexes, notamment pour Al, (Mariano and Keltjen, 2003; Pellet et al., 1995) ou au contraire plus mobiles, en diminuant le pH du sol (Kim et al., 2010; Lin et al., 2004). Dans les deux cas, il s'agit d'un mécanisme de tolérance puisque, lorsqu'ils sont solubles, les complexes métal-acide organique sont considérés comme une forme de détoxification des ETMM, qui peuvent, une fois entrés dans la plante, être facilement transloqués et compartimentalisés (Yang et al., 2001). Dans le cas présent, les résultats n'ont pas mis en évidence d'augmentation ou de diminution de l'accumulation de Pb ou de As, Sb et Zn dans les racines avec l'augmentation de la contamination en Pb. L'exsudation des acides organiques ne semble donc pas jouer un rôle prépondérant dans la tolérance du romarin aux ETMM. Leur rôle pourrait être indirect, en favorisant le développement de micro-organismes pour lesquels les acides organiques constituent des nutriments (Bais et al., 2006).

Tableau 6.8 : estimation de la quantité d'acides organiques exsudés par les racines des romarins soumis aux différentes conditions de contamination. Témoin : sol de G6, contamination 1 : sol de G6 + 10 µg/g Pb, contamination 2 : sol de G6 + 100 µg/g Pb, multi-contamination : sol de G0.

Acide organique	Indication de quantité d'acide organique en fonction de la contamination			
	Témoin	Contamination 1	Contamination 2	Multi-contamination
Citrique	-	+	-	++
Lactique	+	++	++	+++
Malique	-	+	+++	+++
Succinique	+	++	+++	+++
Malonique	+	++	++	+++

6.3.3. Evaluation de l'activité microbienne des sols

Les taux de colonisation par les CMA et les DSE ne semblant pas être impliqués dans la tolérance des romarins cultivés en conditions contrôlées, la cause de la mortalité des romarins soumis à la contamination 2 reste à élucider. Les champignons symbiotiques ne sont pas les seuls micro-organismes du sol jouant un rôle important dans la tolérance des plantes aux ETMM (Vivas et al., 2006). Ainsi, la respiration du sol, permettant de déterminer l'activité microbienne globale, a été mesurée, comme indicateur de l'activité microbienne du sol.

Les résultats (figure 6.7) mettent en évidence une consommation d'oxygène significativement plus importante pour les sols multi-contaminés, signifiant une biomasse microbienne plus importante. De plus, même si une différence significative n'est observée que pour le sol multi-contaminé, une tendance à l'augmentation de la respiration est mise en évidence pour les sols des rhizotrons ayant reçu l'apport de cystéine (annexe 20). Ceci peut être expliqué par le fait que cet acide aminé constitue une source de carbone pour les micro-organismes, favorisant ainsi leur développement.

La différence de tolérance aux ETMM entre les romarins soumis à la multi-contamination et ceux soumis à la contamination 2, pourrait être expliqué par ce résultat. En effet, certaines bactéries du sol, appelées bactéries promotrices de la croissance et de la santé des plantes ou Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB), favorisent la croissance végétale, en modifiant le métabolisme de la plante, notamment en améliorant l'absorption de N, P et d'autres nutriments minéraux. En agriculture, des inoculums commerciaux sont utilisés depuis longtemps pour augmenter le rendement des cultures (Bashan and De-Bashan, 2005). Dans les cas de sols contaminés par les

ETMM, les PGPB, qui peuvent être symbiotiques ou non, sont capables d'augmenter la tolérance et la biomasse (Ma et al., 2009; Madhaiyan et al., 2007) et de favoriser l'implantation et la survie (Grandlic et al., 2008; Madhaiyan et al., 2007; Burd et al., 1998; Cardon et al., 2010) des plantes soumises à ces contaminants. Ces micro-organismes améliorent la tolérance par différents mécanismes incluant l'immobilisation, la mobilisation ou la transformation des ETMM en des formes inactives (Nies, 1999).

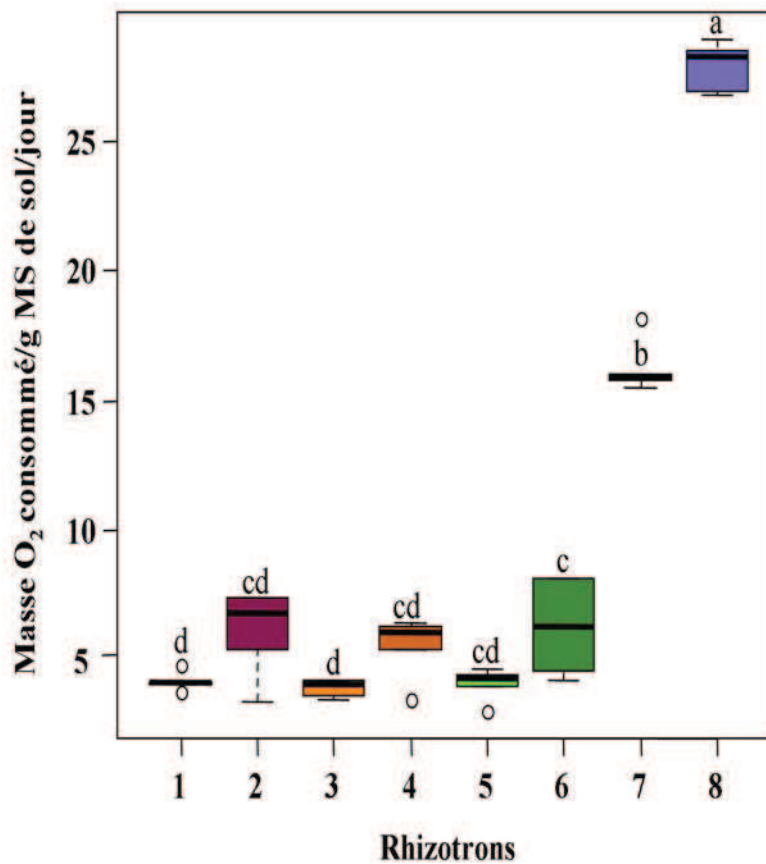


Figure 6.7 : mesure de la respiration en mg d'O₂/g de sol sec/ jour des sols des rhizotrons en fin d'expérience. Rhizotrons 1 et 2 : sol témoin, rhizotrons 3 et 4 : contamination 1, rhizotrons 5 et 6 : contamination 2, rhizotrons 7 et 8 : multi-contamination. Les rhizotrons avec un chiffre pair ont reçu un ajout de cystéine. Pour un même graphique, les boîtes à moustache ne présentant pas de différence significative sont surmontées d'une même lettre (test Wilcoxon, p<0,05).

Mais d'autres mécanismes semblent impliqués, notamment par la synthèse d'enzymes spécifiques induisant des changements physiologiques dans la plante. Parmi ces enzymes, la 1-aminocyclopropane-1-carboxylates (ACC) désaminase semble jouer un rôle prépondérant dans l'augmentation de la croissance en présence d'ETMM. Cette enzyme réduit la synthèse d'éthylène induite par le stress, et notamment le stress métallique, qui est une hormone inhibant la

croissance et le développement végétale entre autre (Khan et al., 2009). Ces résultats, en plus d'expliquer la tolérance des romarins des rhizotrons 7 et 8 aux fortes pollutions, pourraient expliquer les différences de morphologie du système racinaire de ces individus par rapport à celui des individus des autres rhizotrons. En effet, lors de l'arrêt de l'expérimentation, les romarins soumis à la multi-contamination présentaient un système racinaire plus dense et plus fin que les romarins soumis aux autres niveaux de contamination.

Ainsi, l'analyse de l'activité microbienne des sols semble apporter une explication à la mortalité observée dans les rhizotrons 5 et 6. Bien que la composition de la communauté bactérienne et fongique n'ait pas été déterminée, les résultats mettent clairement en évidence une biomasse bactérienne plus importante dans les rhizotrons contenant le sol multi-contaminé (7 et 8). Leur implication dans la tolérance et la survie des romarins face à ce type de contamination, comme cela a pu être montré pour d'autres espèces, en présence d'autres ETMM (Madhaiyan et al., 2007; Grandlic et al., 2008; Ma et al., 2009; Cardon et al., 2010) semble indéniable, même si dans le cas présent la croissance ne semble pas améliorée. Pourtant, afin de confirmer ces observations il aurait été intéressant de déterminer l'activité microbienne dans les sols d'origine, puisque les résultats précédents ont montré une exsudation plus importante d'acides organiques dans les rhizotrons 7 et 8. Or ces molécules constituent une source de nutriments pour les bactéries (Bais et al., 2006) et pourraient éventuellement avoir contribué à l'augmentation de l'activité microbienne du sol. Dans ce sens, l'apport de cystéine, bien que n'ayant peu ou pas d'effet sur la mobilisation dans le sol et l'absorption des ETMM par les romarins, en constituant un apport de carbone, semble être à l'origine d'une augmentation de la biomasse microbienne. L'utilisation de ce chélatant pourrait donc être intéressante afin de faciliter l'implantation d'espèces sur des sites contaminés, sans entraîner de lessivage des ETMM. De plus, cet acide aminé peut constituer une source de soufre pour la plante et donc intervenir de façon importante dans la détoxification et la tolérance aux ETMM. En effet, la cystéine, premier produit d'assimilation des sulfates dans la plante, est un précurseur et un facteur limitant dans la voie de biosynthèse du glutathion et donc des phytochélatines (Kopriva and Rennenberg, 2004).

6.4. Conclusion

Les résultats des études en conditions contrôlées confirment le comportement d'absorption des ETMM dans les parties aériennes et les racines du romarin. Cependant, l'effet de filtre racinaire semble moins important puisque les concentrations mesurées dans les parties aériennes sont, pour un niveau de contamination identique, plus importantes que celles mises en évidence *in situ*. Un lien entre cette observation et un taux de colonisation par les champignons endomycorhiziens à arbuscules est possible, mais reste à vérifier par des expérimentations en absence de symbiose.

Concernant les exsudats racinaires, une augmentation de leur excrétion semble être mise en place par le romarin en présence de concentration croissante de Pb. Cependant, aucun effet sur l'absorption racinaire ou sur la translocation ne semble y être lié. Il pourrait s'agir d'un mécanisme de la plante ayant pour effet d'attirer et de favoriser les micro-organismes du sol qui semblent fortement impliqués dans sa tolérance. En effet, la respiration du sol, représentant l'activité microbienne du sol, est significativement plus importante dans les sols des rhizotrons 7 et 8 contenant une contamination forte et multiple. Pourtant la mort de plusieurs individus dans un délai très court après la mise en contact des romarins avec la contamination 2, laisse penser que le sol d'origine des rhizotrons 7 et 8 possédait déjà une activité microbienne plus élevée et/ou déjà adaptées aux conditions de contamination, expliquant la meilleure tolérance des romarins à des niveaux de contamination élevés.

Au niveau de l'apport de chélatant, la cystéine n'a montré que peu d'effet sur l'augmentation de la fraction mobilisable des ETMM du sol et donc sur leur absorption par les romarins. Ceci semble être un avantage, d'une part, parce que son éventuelle utilisation ne conduirait pas à un lessivage des ETMM, d'autre part, parce que l'augmentation de la concentration en ETMM dans les parties aériennes de cette espèce n'est pas souhaitable du fait de sa comestibilité par les populations locales. Cependant, ce chélatant semble avoir un effet positif sur l'activité microbienne en constituant un apport de carbone non négligeable. Or, cette activité semble fortement liée à la tolérance du romarin aux ETMM. De plus, la présence de soufre dans la cystéine pourrait améliorer le métabolisme impliqué dans la tolérance du romarin aux ETMM, puisqu'il entre dans la composition des molécules telles que le glutathion.

Ainsi, le rôle essentiel des micro-organismes du sol, autre que les champignons symbiotiques, dans la tolérance du romarin aux ETMM a été mis en évidence. Mais des études plus approfondies sont nécessaires afin de comprendre les mécanismes mis en jeu dans cette collaboration plante/micro-organismes. De plus, l'effet des symbioses mycorhiziennes et leur rôle présumé en temps que filtre racinaire n'a pas pu être confirmé du fait d'un probable biais lié à la longue période de stabilisation du sol. Ces études en conditions contrôlées constituent une première approche de l'impact de la rhizosphère dans la tolérance du romarin et la mise en place d'autres expérimentations serait nécessaires afin de confirmer et d'explorer plus en détail ces hypothèses.

Références bibliographiques

- Anandacoomaraswamy A, De Costa WAJ., Shyamalie H., Campbell G. Factors controlling transpiration of mature field-grown tea and its relationship with yield. *Agric. For. Meteorol.* 2000;103:375–86.
- Badri DV, Vivanco JM. Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ.* 2009;32:666–81.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. In: . *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 57. 2006. p. 233–66.
- Bashan Y, De-Bashan LE. Plant growth-promoting. In: . *Encycl. Soils Environement*, vol. 1. Elsevier. D. Hillel: Oxford, U.K; 2005. p. 2200.
- Bataillard P, Cambier P, Picot C. Short-term transformations of lead and cadmium compounds in soil after contamination. *Eur. J. Soil Sci.* 2003;54:365–76.
- Burd GI, Dixon DG, Glick BR. A Plant Growth-Promoting Bacterium That Decreases Nickel Toxicity in Seedlings. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998;64:3663–8.
- Cao X, Ma LQ. Effects of compost and phosphate on plant arsenic accumulation from soils near pressure-treated wood. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 2004;132:435–42.
- Cardon D., Montes Villafan S, Rodriguez Tovar A, Perez Jiminez S, Guerrero Zuniga A, Amescua Allieri M., Perez NO, Rodriguez Dorantes A. Growth response and heavy metals tolerance of *Axonopus affinis*, inoculated with plant growth-promoting rhizobacteria. *Afr. J. Biotechnol.* 2010;9:8772–82.
- Dakora FD, Phillips DA. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil* 2002;245:35–47.

- Douds DD, Nagahashi G, Wilson DO, Moyer J. Monitoring the decline in AM fungus populations and efficacy during a long term bare fallow. *Plant Soil* 2011;342:319–26.
- Duman F, Cicek M, Sezen G. Seasonal changes of metal accumulation and distribution in common club rush (*Schoenoplectus lacustris*) and common reed (*Phragmites australis*). *Ecotoxicology* 2007;16:457–63.
- Gohre V, Paszkowski U. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 2006;223:1115–22.
- Grandlic CJ, Mendez MO, Chorover J, Machado B, Maier RM. Plant Growth-Promoting Bacteria for Phytostabilization of Mine Tailings. *Environ. Sci. Technol.* 2008;42:2079–84.
- Hossain MA, Piyatida P, da Silva JAT, Fujita M. Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. *J. Bot.* 2012;2012.
- Huang PM, Germida JJ. Chemical and biological processes in the rhizosphere: metal pollutants. *Iupac Ser. Anal. Phys. Chem. Environ. Syst. Vol. 8* 2001:381–438. CABDirect2. CABDirect2.
- Jumpponen A, Trappe JM. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytol.* 1998;140:295–310.
- Kalbitz K, Solinger S, Park J-H, Michalzik B, Matzner E. Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils : A review. *Soil Sci.*;165:277–304.
- Karimian N, Kalbasi M, Hajrasuliha S. Effect of converter sludge, and its mixtures with organic matter, elemental sulfur and sulfuric acid on availability of iron, phosphorus and manganese of 3 calcareous soils from central Iran. *Afr. J. Agric. Res.* 2012;7:568–76.
- Khan MS, Zaidi A, Wani PA, Oves M. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environ. Chem. Lett.* 2009;7:1–19.
- Kim S, Lim H, Lee I. Enhanced heavy metal phytoextraction by *Echinochloa crus-galli* using root exudates. *J. Biosci. Bioeng.* 2010;109:47–50.
- Kopriva S, Rennenberg H. Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: interaction with N and C metabolism. *J. Exp. Bot.* 2004;55:1831–42.
- Liao YC, Chien SWC, Wang MC, Shen Y, Hung PL, Das B. Effect of transpiration on Pb uptake by lettuce and on water soluble low molecular weight organic acids in rhizosphere. *Chemosphere* 2006;65:343–51.
- Lin Q, Chen YX, He YF, Tian GM. Root-induced changes of lead availability in the rhizosphere of *Oryza sativa* L. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2004;104:605–13.
- Logi C, Sbrana C, Giovannetti M. Cellular Events Involved in Survival of Individual Arbuscular Mycorrhizal Symbionts Growing in the Absence of the Host. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998;64:3473–9.

- Ma Y, Rajkumar M, Freitas H. Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by *Brassica juncea*. *J. Environ. Manage.* 2009;90:831–7.
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Sa T. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L). *Chemosphere* 2007;69:220–8.
- Mariano ED, Keltjen WG. Evaluating the role of root citrate exudation as a mechanism of aluminium resistance in maize genotypes. *Plant Soil* 2003;256:469–79.
- McGrath SP, Zhao FJ, Lombi E. Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. In: Sparks DL, editor. *Adv. Agron. Vol 75*, vol. 75. 2002. p. 1–56.
- Moreno E, Penalosa J, Esteban E, Carpena RO. Trace elements accumulation and phytotoxicity in Mediterranean shrubs after a treatment with pyritic sludge. In: *Improv. Phytotechnologies. COST Action 859, VGTU Press Technica: Vilnius; 2007.* p. 190–2.
- Moreno-Jimenez E, Vazquez S, Carpena-Ruiz RO, Esteban E, Penalosa JM. Using Mediterranean shrubs for the phytoremediation of a soil impacted by pyritic wastes in Southern Spain: A field experiment. *J. Environ. Manage.* 2011;92:1584–90.
- Nies DH. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999;51:730–50.
- Olko A, Abratowska A, Zyłkowska J, Wierzbicka M, Tukiendorf A. *Armeria maritima* from a calamine heap—initial studies on physiologic-metabolic adaptations to metal-enriched soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2008;69:209–18.
- Pausas JG. Mediterranean vegetation dynamics: modelling problems and functional types. *Plant Ecol.* 1999;140:27–39.
- Pellet DM, Grunes DL, Kochian LV. Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta* 1995;196:788–95.
- Pulford ID, Watson C. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees—a review. *Environ. Int.* 2003;29:529–40.
- Rabie GH. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungus to red kidney and wheat plants tolerance grown in heavy metal-polluted soil. *Afr. J. Biotechnol.* 2005;4:332–45.
- Schützendübel A, Polle A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* 2002;53:1351–65.
- ShIPLEY S, NORDIN AB, TANG CG, KIM S-K. Phytoremediation for arsenic contamination : arsenate reductase. *Pulse Undergrad. J. Bayl. Univ.* 2008;6:1–12.
- Soaud AA, Al Darwish FH, Saleh ME, El-Tarabily KA, Rahman MM. Effects of elemental sulfur, phosphorus, micronutrients and *Paracoccus versutus* on nutrient availability of calcareous soils. *Aust. J. Crop Sci.* 2011.

- Tang X-Y, Cui Y-S, Duan J, Tang L. Pilot study of temporal variations in lead bioaccessibility and chemical fractionation in some Chinese soils. *J. Hazard. Mater.* 2008;160:29–36.
- Tani FH, Barrington S. Zinc and copper uptake by plants under two transpiration rates. Part II. Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* L.). *Environ. Pollut.* 2005;138:548–58.
- Testiati E. Contamination des sols par des éléments traces métalliques en zone méditerranéenne côtière : étude de leur mobilité et du transfert à la phytocénose. Aix-Marseille Université; 2012.
- Villares R, Puente X, Carballeira A. Seasonal variation and background levels of heavy metals in two green seaweeds. *Environ. Pollut.* 2002;119:79–90.
- Vivas A, Barea JM, Biró B, Azcón R. Effectiveness of autochthonous bacterium and mycorrhizal fungus on *Trifolium* growth, symbiotic development and soil enzymatic activities in Zn contaminated soil. *J. Appl. Microbiol.* 2006;100:587–98.
- Wuana RA, Okieimen FE. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *Int. Sch. Res. Netw. Ecol.* 2011;2011:1–20.
- Yang H, Yang Z, Zhou L, Wong JWC. Ability of *Agropyron elongatum* to accumulate the single metal of cadmium, copper, nickel and lead and root exudation of organic acids. *J. Environ. Sci.* 2001;13:368–75.

Conclusion générale et perspectives

"On ne fait jamais attention à ce qui a été fait ; on ne voit que ce qui reste à faire."

Marie Curie

Ce travail de thèse était partie intégrante du projet de recherche Marséco et a fait suite à une première étude de la contamination du sol au sein de l'usine de l'Escalette. Son but était de déterminer l'ampleur de la contamination diffuse en ETMM, lié à l'activité passée de l'usine de l'Escalette, dans le massif des Calanques, et d'évaluer le risque de transfert aux plantes. Pour cela, le romarin, espèce autochtone des Calanques et emblématique de la région, a été choisi avec l'objectif de tenter d'élucider ses capacités d'accumulation et les éléments et mécanismes impliqués dans sa tolérance. Enfin, l'évaluation du potentiel de phytostabilisation du romarin est apparue importante. En effet, l'étendue de la contamination et le contexte particulier des Calanques ne permettent pas l'utilisation de techniques de dépollution conventionnelles sur les zones de pollution diffuse. De plus, la tolérance aux ETMM et la résistance aux conditions climatiques particulières de la région méditerranéenne, font du romarin un éventuel candidat pour des processus de phytostabilisation sur d'autres sites soumis à des contaminations similaires dans le bassin méditerranéen.

Les résultats de cette étude mettent en évidence qu'une pollution en ETMM, notamment en plomb, arsenic, antimoine et zinc, importante s'étend dans tout le vallon de la Garenne situé dans le Parc national des Calanques, et jouxtant l'ancienne usine de l'Escalette. La forte hétérogénéité des concentrations en ETMM dans les sols des sites les plus contaminés sont caractéristiques des contaminations industrielles par dépôt atmosphérique. Le fait que cette contamination des sols soit liée aux rejets de particules de l'ancienne usine de l'Escalette a été confirmé. En effet, sur tous les sites du transect étudié, une corrélation importante entre les concentrations en As, Pb, Sb et Zn dans les sols a été mise en évidence. Or, ce sont les mêmes éléments qui ont été retrouvés à des concentrations très élevées dans les encroutements de l'ancienne cheminée de l'usine. Les analyses des sols du transect ont également permis de montrer que la diminution du niveau de contamination ne dépendait pas uniquement de la distance à l'usine. La contamination plus importante du sol du site G2 (équivalente à la contamination mesurée sur le site G0, situé à la sortie de la cheminée rampante de la fonderie), pourtant plus éloigné de l'ancienne usine que le site G1, prouve que l'exposition aux vents dominants et l'origine des sols jouent un rôle important. En effet, le site G2 est situé dans le vallon de la Garenne emprunté par le vent dominant (mistral) directement dans l'axe nord-ouest depuis la sortie de la cheminée rampante et il est, de plus, constitué d'un sol colluvial, formé par accumulation suite au ruissellement et à l'érosion des pentes et falaises situées en amont, ce qui n'est pas le cas des sols du site G1.

Les techniques d'extractions des ETMM du sol avec des solutions d'EDTA et de nitrate de calcium permettent d'approcher les concentrations mobilisables et échangeables du sol, et donc d'évaluer leur risque de transfert aux végétaux. Une corrélation linéaire entre les concentrations en ETMM pseudo-totales dans le sol et les concentrations mobilisables et échangeables a été montrée, mettant en évidence l'augmentation du risque de transfert sur les sols les plus contaminés. Les fractions mobilisables sont importantes puisqu'elles représentent jusqu'à 11%, 57%, 4,2% et 19,2% des fractions pseudo-totales pour As, Pb, Sb et Zn, respectivement. Cependant, les ETMM échangeables, considérés comme des représentants plus fidèles de la fraction potentiellement phytodisponible, ne représentent qu'une fraction minime des ETMM pseudo-totaux. En effet, dans les sols les plus contaminés, cette fraction représente moins de 0,1 % de la fraction pseudo-total pour As, Pb et Zn, respectivement et 0,5 % pour Sb. Ainsi, suivant le type d'extraction considéré, le risque de transfert semble important ou non. Quoiqu'il en soit, dans le cas présent, l'augmentation du risque de transfert avec la contamination est avéré, puisque les concentrations en ETMM facilement mobilisables sont corrélées aux concentrations pseudo-totales.

Le transfert sol-plante des ETMM a été étudié sur le romarin. La tolérance de cette espèce aux ETMM est avérée puisqu'elle est retrouvée sur tous les sites du transect, mais également sur des sites présentant des niveaux de contamination plus élevés aux abords directs des ruines de l'ancienne usine. Le romarin accumule peu les ETMM dans ses parties aériennes. Pour Pb, Sb et Zn, les résultats ont mis en évidence qu'après une augmentation linéaire de la concentration dans les parties aériennes avec l'augmentation de la concentration dans le sol, un "plateau" est atteint. En effet, malgré des niveaux de contamination importants, les concentrations maximales mesurées dans les parties aériennes de romarin sont de 1,8, 23, 3,4 et 90 mg/kg de As, Pb, Sb et Zn, respectivement, et ces valeurs maximales ne correspondent pas aux parties aériennes des romarins prélevés sur les sites les plus contaminés. Pourtant le romarin semble capable d'accumuler et de stocker ces éléments dans ses parties racinaires. L'accumulation dans les racines est corrélée linéairement avec la contamination du sol et cela pour As, Pb, Sb et Zn, mettant en évidence une absorption, au moins en partie, passive. Ainsi, dans les racines des romarins, des concentrations en As, Pb, Sb et Zn allant respectivement jusqu'à 85, 1983, 35 et 802 mg/kg ont été analysées. Il apparaît donc que le romarin est capable d'accumuler plus de 0,1% (en masse fraîche) de Pb dans ses racines et que la grande majorité n'est pas transloquée

vers les parties aériennes. Ainsi, un effet de filtre racinaire semble être mis en place par cette espèce lorsque la contamination devient importante, lui permettant, grâce au stockage des ETMM dans les racines, de protéger son appareil photosynthétique. Ce filtre semble être le fait de deux phénomènes : l'adsorption des ETMM à la surface des racines puisque, mis à part pour Sb (plus de 90% absorbé), la part adsorbée représente entre 40 et 75% de la totalité de la concentration dans les racines; et l'association avec des champignons symbiotiques dont la colonisation augmente avec l'augmentation de la contamination du sol en ETMM.

Concernant les mécanismes de tolérance au niveau des racines, il semblerait que des phénomènes prenant place dans la rhizosphère jouent un rôle important. En effet, lors des expérimentations *ex situ*, il a été montré que la présence d'une activité microbienne importante favorise la survie des romarins en présence de contamination. D'autre part, la synthèse apparemment plus importante d'exsudats racinaires en présence de contamination en ETMM, semble également impliquée bien que leurs effets (diminution ou augmentation de la mobilité des ETMM et nutriments, favorisation de l'implantation de la diversité microbienne), n'aient pas été élucidés. Au niveau cellulaire, les composés thiolés (cystéine, glutathion et probablement phytochélatines) semblent impliqués, notamment dans les parties aériennes. Leur mode d'action principal, séquestration ou lutte contre le stress oxydatif, n'a pas pu être éclairci, puisque les complexes ETMM-composés thiolés n'ont pas pu être déterminés dans cette étude. Cependant, il est très probable qu'ils jouent un rôle sur les deux plans. Il s'avère que d'autres métabolites connus pour leur propriétés antioxydantes jouent un rôle dans la tolérance du romarin face à la présence d'ETMM, notamment dans les parties aériennes : les phénols, et, parmi les composés constituant les huiles essentielles, les terpénoïdes.

Enfin, le romarin étant une espèce comestible, l'évaluation des risques d'exposition apparaissait incontournable. Les résultats montrent que les quantités minimales de feuilles de romarin ou d'infusion à consommer pour atteindre les doses journalières admissibles sont importantes et que, sauf en cas de consommation exceptionnelle, les risques sont limités. Cependant, il est nécessaire de considérer les autres sources d'exposition aux ETMM par les populations locales (notamment les aérosols) et le fait que, parmi les éléments considérés, certains sont cumulatifs (comme le Pb). D'autre part, ces conclusions prennent en compte chaque élément séparément, mais qu'en est-il de l'effet de l'exposition à un "cocktail" de contaminant?

Ainsi, cette étude met en avant le potentiel de phytostabilisation du romarin en milieu méditerranéen. Sa biomasse importante, son réseau racinaire dense, sa tolérance et son caractère pérenne et local en faisaient déjà un candidat intéressant, mais sa capacité d'accumulation des ETMM confirme ce potentiel. En effet, cette espèce présente les caractéristiques nécessaires à un processus de phytostabilisation des ETMM : une accumulation importante dans les racines et une faible translocation qui limite les risques de transfert dans la chaîne trophique. De plus, la présence de symbioses racinaires avec des espèces fongiques constitue un intérêt non négligeable pour ce type de processus. Grâce au réseau d'hyphes des champignons endomycorhiziens, la zone de prospection des racines est augmentée et la capacité de stabilisation également puisque les mycéliums fixent de façon importante les ETMM.

Perspectives

Bien que le potentiel de phytostabilisation du romarin ait été mis en évidence, de nombreux points n'ont été qu'effleurés et restent à élucider, notamment concernant la précision des mécanismes impliqués dans sa tolérance aux ETMM. Dans ce domaine, le dosage des phytochélatines et des complexes thiols-ETMM semble être une étape nécessaire. Mais cela demande un développement analytique et méthodologique fastidieux puisque le romarin étant une espèce aromatique de nombreux composés, extraits avec les phytochélatines, peuvent interférer lors des analyses.

De plus, l'étude des phénomènes mis en jeu au niveau de la rhizosphère restent à éclaircir, notamment le rôle des exsudats et des micro-organismes du sol dont l'effet sur la survie et la tolérance du romarin semblent importants. Il serait intéressant de déterminer les communautés adaptées aux sites contaminés ainsi que les activités enzymatiques impliquées. Un travail d'identification des espèces fongiques mycorhiziennes et des DSE pourrait être envisagé pour pouvoir tester leur efficacité isolément dans la tolérance du romarin aux ETMM. Plus globalement, il serait intéressant de pousser l'étude sur les activités microbiennes par détection d'activités enzymatiques spécifiques. Concernant l'ajout de cystéine, un protocole plus adapté au romarin, plante à la croissance lente, doit être mis en place. De plus, son intérêt potentiel dans la stimulation du développement de l'activité microbienne est à approfondir à la vue des résultats prometteurs observés.

L'hétérogénéité de contamination du sol montrée en surface dans cette étude, serait à analyser dans les différents horizons pédologiques des sols des sites du transect, et ainsi une meilleure approche des effets de cette hétérogénéité sur les capacités d'accumulation des ETMM dans les racines de romarin pourrait être abordé.

Références bibliographiques

Abedin MJ, Feldmann J, Meharg AA. Uptake kinetics of arsenic species in rice plants. *Plant Physiol.* 2002;128:1120–8.

Abou-Arab AAK, Abou Donia MA. Heavy Metals in Egyptian Spices and Medicinal Plants and the Effect of Processing on Their Levels. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:2300–4.

Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. vol. 4th Ed. Allured Publishing, Carol Stream: IL, USA; 2007.

Agati G, Meyer S, Matteini P, Cerovic ZG. Assessment of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera* L.) berries using a noninvasive chlorophyll fluorescence method. *J. Agric. Food Chem.* 2007;55:1053–61.

Agati G, Pinelli P, Cortés Ebner S, Romani A, Cartelat A, Cerovic ZG. Nondestructive evaluation of anthocyanins in olive (*Olea europaea*) fruits by in situ chlorophyll fluorescence spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 2005;53:1354–63.

Agati G, Traversi ML, Cerovic ZG. Chlorophyll Fluorescence Imaging for the Noninvasive Assessment of Anthocyanins in Whole Grape (*Vitis vinifera* L.) Bunches†. *Photochem. Photobiol.* 2008;84:1431–4.

Airmaraix. Campagne de mesures temporaire. Particules et métaux lourds sur le site de l'Escalette (Marseille). 2003.

Alberich A, Ariño C, Díaz-Cruz JM, Esteban M. Soft modelling for the resolution of highly overlapped voltammetric peaks: application to some Pb-phytochelatin systems. *Talanta* 2007;71:344–52.

Alkorta I, Hernández-Allica J, Becerril J, Amezaga I, Albizu I, Garbisu C. Recent Findings on the Phytoremediation of Soils Contaminated with Environmentally Toxic Heavy Metals and Metalloids Such as Zinc, Cadmium, Lead, and Arsenic. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2004;3:71–90.

Almela L, Sánchez-Muñoz B, Fernández-López JA, Roca MJ, Rabe V. Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. 29th Int. Symp. High Perform. Liq. Phase Sep. Relat. Tech. Part II 2006;1120:221–9.

Alvarez JM, Lopez-Valdivia LM, Novillo J, Obrador A, Rico MI. Comparison of EDTA and sequential extraction tests for phytoavailability prediction of manganese and zinc in agricultural alkaline soils. *Geoderma* 2006;132:450–63.

Alvarez-Legorreta T, Mendoza-Cozatl D, Moreno-Sanchez R, Gold-Bouchot G. Thiol peptides induction in the seagrass *Thalassia testudinum* (Banks ex König) in response to cadmium exposure. *Aquat. Toxicol.* 2008;86:12–9.

Anandacoomaraswamy A, De Costa WAJ., Shyamalie H., Campbell G. Factors controlling transpiration of mature field-grown tea and its relationship with yield. *Agric. For. Meteorol.* 2000;103:375–86.

Anawar HM, Garcia-Sanchez A, Santa Regina I. Evaluation of various chemical extraction methods to estimate plant-available arsenic in mine soils. *Chemosphere* 2008;70:1459–67.

Andrade SA., Abreu C., de Abreu M., Silveira AP. Influence of lead additions on arbuscular mycorrhiza and Rhizobium symbioses under soybean plants. *Appl. Soil Ecol.* 2004;26:123–31.

Angioni A, Barra A, Cereti E, Barile D, Coïsson JD, Arlorio M, Dessi S, Coroneo V, Cabras P. Chemical Composition, Plant Genetic Differences, Antimicrobial and Antifungal Activity Investigation of the Essential Oil of *Rosmarinus officinalis* L. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:3530–5.

ANSM. Tisanes. Pharmacopée française. Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé; 2007.

ANTEA. Diagnostic environnemental de la friche industrielle de l'Escalette. Evaluation simplifiée des risques sur les parcelles appartenant au Conseil Général 13. Société d'ingénierie; 2001.

Apak R, Güçlü K, Demirata B, Özyürek M, Çelik SE, Bektaşoğlu B, Berker KI, Özyurt D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* 2007;12:1496–547.

Arpadjan S, Celik G, Taşkesen S, Güçer S. Arsenic, cadmium and lead in medicinal herbs and their fractionation. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 2008;46:2871–5.

Atteia O. Chimie et pollutions des eaux souterraines. Tec & Doc Lavoisier; 2005.

Audet P, Charest C. Dynamics of arbuscular mycorrhizal symbiosis in heavy metal phytoremediation: Meta-analytical and conceptual perspectives. *Air Pollut. Clim. Change Glob. Overv. Eff. For. Veg.* 2007;147:609–14.

Azizian A, Amin S, Maftoun M, Emam Y, Noshadi M. Response of lettuce to Cd-enriched water and irrigation frequencies. *Afr. J. Environ. Sci. Technol.* 2011;5:884–93.

Azizian A, Amin S, Maftoun M, Emam Y, Noshadi M. Response of Corn to Cadmium and Drought Stress and Its Potential Use for Phytoremediation. *J. Agric. Sci. Technol.* 2013;15:303–10.

Baars A, Theelen R, Janssen P, Hesse J, Vab Apeldoorn M, Meijering M, Verdam L, Zeilmaker M. Re-evaluation of Human-toxicological Maximum Permissible Risk Levels. Rapport RIVM (Rijksinstituut voor volksgezondheid en milieu); 2001.

Badri DV, Vivanco JM. Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ.* 2009;32:666–81.

Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. In: . *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 57. 2006. p. 233–66.

Baize D. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). Références et stratégies d'interprétation. Programma ASPITET. INRA edition. Paris; 1997.

Baize D. Eléments traces dans les sols - Fonds géochimiques, fonds pédogéochimiques naturels et teneurs agricoles habituelles - Définitions et utilités. *Courr. Environ. Inra* 2009;57:63–72.

Baize D, Saby N, Deslais W. Teneurs en huit éléments en traces (Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Zn) dans les sols agricoles en France. ADEME - INRA - GIS sol; 2007.

Baize D, Saby N, Walter C. Le cuivre extrait à l'EDTA dans les sols de France-Probabilité de carences et de toxicités selon la BDAT. *Etude Gest. Sols* 2006;13:259–68.

Baker A. Accumulators and excluders - strategies in the response of plants to heavy-metals. *J. Plant Nutr.* 1981;3:643–54.

Baker AJM, Brooks RR. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1989;1:81–126.

Baker AJM, McGrath SP, Sidoli CMD, Reeves RD. The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. *Environ. Biotechnol. Waste Treat. Recycl.* 1994;11:41–9.

Del Baño MJ, Lorente J, Castillo J, Benavente-García O, Marín MP, Del Río JA, Ortuño A, Ibarra I. Flavonoid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. postulation of a biosynthetic pathway. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:4987–92.

Del Baño MJ, Lorente J, Castillo J, Benavente-García O, del Río JA, Ortuño A, Quirin K-W, Gerard D. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 2003;51:4247–53.

Barea J-M, Azcón R, Azcón-Aguilar C. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002;81:343–51.

de-Bashan LE, Hernandez J-P, Bashan Y. The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation - A comprehensive evaluation. *Appl. Soil Ecol.* 2012;61:171–89.

Bashan Y, De-Bashan LE. Plant growth-promoting. In: . *Encycl. Soils Environement*, vol. 1. Elsevier. D. Hillel: Oxford, U.K; 2005. p. 2200.

BASOL 2012. . disponible à : <http://www.basol.environnement.gouv.fr>.

Bataillard P, Cambier P, Picot C. Short-term transformations of lead and cadmium compounds in soil after contamination. *Eur. J. Soil Sci.* 2003;54:365–76.

Bates L, Waldren R, Teare I. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 1973;39:205–7.

- Bedini S, Pellegrino E, Avio L, Pellegrini S, Bazzoffi P, Argese E, Giovannetti M. Changes in soil aggregation and glomalin-related soil protein content as affected by the arbuscular mycorrhizal fungal species *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*. *Soil Biol. Biochem.* 2009;41:1491–6.
- Berlin K, Gerhardsson L, Borjesson J, Lindh E, Lundstrom N, Schutz A, Skerfving S, Edling C. Lead-intoxication caused by skeletal disease. *Scand. J. Work. Environ. Health* 1995;21:296–300.
- Berry W, Wallace A. Toxicity - the concept and relationship to the dose-response curve. *J. Plant Nutr.* 1981;3:13–9.
- Blanc JJ. Les grottes du massif des Calanques (Marseilleveyre - Puget - Riou, France) : géologie, géomorphologie, sédimentologie 2012;6:161–200.
- Blankenship RE. Early Evolution of Photosynthesis. *Plant Physiol.* 2010;154:434–8.
- Blum WE., Horak O, Mentler A, Puschenreiter M. Trace elements. In: . *Environ. Ecol. Chem.*, vol. II of III. encyclopedia of life support systems. Aleksandar Sabljic; 2009. p. 156–65.
- Bolanz RM, Bläss U, Ackermann S, Ciobotă V, Rösch P, Tarcea N, Popp J, Majzlan J. The effect of antimonate, arsenate, and phosphate on the transformation of ferrihydrite to goethite, hematite, feroxyhyte, and tripuhyte. *Clays Clay Miner.* 2013;61:11–25.
- Bournérias M, Aymonin GG. Les Orchidées de France, Belgique et Luxembourg. Collection Parthénope. Editions Biotope; 1998.
- Boutekedjiret C, Bentahar F, Belabbes R, Bessiere JM. Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. *Flavour Fragr. J.* 2003;18:481–4.
- Briant M. Biosynthesis of amino acids. 2003.
- Briat J-F. Arsenic tolerance in plants: “Pas de deux” between phytochelatin synthesis and ABCC vacuolar transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010;107:20853–4.
- Briat J-F, Lebrun M. Plant responses to metal toxicity. *Comptes Rendus Académie Sci. - Ser. Iii - Sci. Vie* 1999;322:43–54.
- Bril H, Bollinger J-C. Comprendre les pollutions par les métaux. *Actual. Chim.* 2006;298:54–62.
- Buchanan B, Gruissem W, Jones R. *Biochemistry & molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologist: Monona drive, Rockville, USA; 2002.
- Buffle J, Chalmers RA, Masson MR, Midgley D. Complexation reactions in aquatic systems: an analytical approach. E. Horwood; 1988.
- Burd GI, Dixon DG, Glick BR. A Plant Growth-Promoting Bacterium That Decreases Nickel Toxicity in Seedlings. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998;64:3663–8.
- Cala V, Cases MA, Walter I. Biomass production and heavy metal content of *Rosmarinus officinalis* grown on organic waste-amended soil. *J. Arid Environ.* 2005;62:401–12.

Campbell N, Reece J. Transport in vascular plants. Pearson education Inc publishing as Benjamin Cummings; 2005.

Cao X, Ma LQ. Effects of compost and phosphate on plant arsenic accumulation from soils near pressure-treated wood. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 2004;132:435–42.

Cardon D., Montes Villafan S, Rodriguez Tovar A, Perez Jiminez S, Guerrero Zuniga A, Amescua Allieri M., Perez NO, Rodriguez Dorantes A. Growth response and heavy metals tolerance of *Axonopus affinis*, inoculated with plant growth-promoting rhizobacteria. Afr. J. Biotechnol. 2010;9:8772–82.

Cartelat A, Cerovic ZG, Goulas Y, Meyer S, Lelarge C, Prioul J-L, et al. Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). Field Crops Res. 2005;91:35–49.

Chen B., Li X., Tao H., Christie P, Wong M. The role of arbuscular mycorrhiza in zinc uptake by red clover growing in a calcareous soil spiked with various quantities of zinc. Chemosphere 2003;50:839–46.

Chen X, Wu CH, Tang JJ, Hu SJ. Arbuscular mycorrhizae enhance metal lead uptake and growth of host plants under a sand culture experiment. Chemosphere 2005;60:665–71.

Chern EC, Tsai DW, Ogunseitan OA. Deposition of Glomalin-Related Soil Protein and Sequestered Toxic Metals into Watersheds. Environ. Sci. Technol. 2007;41:3566–72.

Chin L, Leung DWM, Taylor HH. Lead chelation to immobilised *Symphytum officinale* L. (comfrey) root tannins. Chemosphere 2009;76:711–5.

Chojnacka K, Chojnacki A, Górecka H, Górecki H. Bioavailability of heavy metals from polluted soils to plants. Sci. Total Environ. 2005;337:175–82.

Ciesielski H, Sterckeman T. A comparison between three methods for the determination of cation exchange capacity and exchangeable cations in soils. Agronomie 1997;17:9–16.

Clemens S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. Planta 2001;212:475–86.

Clemens S, Palmgren MG, Kramer U. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. Trends Plant Sci. 2002;7:309–15.

Clijsters H, Assche FV. Inhibition of photosynthesis by heavy metals. Photosynth. Res. 1985;7:31–40.

Cobbett C, Goldsbrough P. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Annu. Rev. Plant Biol. 2002;53:159–82.

Cobbett CS. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. Curr. Opin. Plant Biol. 2000;3:211–6.

Conseil de l'Union Européenne. Directive 98/83/CE du conseil du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation Humarine. Journal officiel; December 5, 1998.

Conseil Général des Bouches du Rhône. Evaluation simplifiée des risques. Site de Saména (Marseille). Rapport ANTEA n°24999/B; November 2001.

Conway KE, Maness NE, Motes JE. Integration of biological and chemical controls for Rhizoctonia aerial blight and root rot of rosemary. Plant Dis. 1997;81:795–8.

Cornejo P, Meiera S, Borie G, Rillig MC, Borie F. Glomalin-related soil protein in a Mediterranean ecosystem affected by a copper smelter and its contribution to Cu and Zn sequestration. Sci. Total Environ. 2008;406:154–60.

Costa G, Spitz E. Influence of cadmium on soluble carbohydrates, free amino acids, protein content of in vitro cultured *Lupinus albus*. Plant Sci. 1997;128:131–40.

Coste H. Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse, et des contrées limitrophes. 1937.

Crecelius EA. Changes in the chemical speciation of arsenic following ingestion by man. Environ. Health Perspect. 1977;19:147–50.

Croteau R, Kutchan T, Lewis N. Natural Products (secondary metabolites). In: . Biochem. Mol. Biol. Plants. American Society of Plant Physiologists; 2000. p. 1366.

Cruz BH, Díaz-Cruz JM, Díaz-Cruz MS, Ariño C, Esteban M, Tauler R. Differential pulse polarographic study of the Pb(II) complexation by glutathione. J. Electroanal. Chem. 2001;516:110–8.

Cunningham S, Berti W, Huang J. Phytoremediation of contaminated soils. Trends Biotechnol. 1995;13:393–7.

Dakora FD, Phillips DA. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. Plant Soil 2002;245:35–47.

Daumalin X, Raveux O. Le raffinage du sucre, l'huilerie et la métallurgie : les trois branches emblématiques de la Révolution industrielle à Marseille. MIP 2005;15:5–7.

Davies K, Schwinn K, Deroles S, Manson D, Lewis D, Bloor S, Bradley JM. Enhancing anthocyanin production by altering competition for substrate between flavonol synthase and dihydroflavonol 4-reductase. Euphytica 2003;131:259–68.

Davis EM, Croteau R. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. Biosynth. Aromat. Polyketides Isoprenoids Alkaloids 2000;209:53–95.

Denton B. Advances in phytoremediation of heavy metals using plant growth promoting bacteria and fungi. Microbiol. Mol. Genet. 2007;3:1–5.

Díaz G, Azcón-Aguilar C, Honrubia M. Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. Plant Soil 1996;180:241–9.

Douds DD, Nagahashi G, Wilson DO, Moyer J. Monitoring the decline in AM fungus populations and efficacy during a long term bare fallow. *Plant Soil* 2011;342:319–26.

Dray S, Chessel D, Thioulouse J. Co-inertia analysis and the linking of ecological data tables. *Ecology* 2003;84:3078–89.

Driver JD, Holben WE, Rillig MC. Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* 2005;37:101–6.

Dudka S, Adriano DC. Environmental Impacts of Metal Ore Mining and Processing: A Review. *J Env. Qual* 1997;26:590–602.

Duman F, Cicek M, Sezen G. Seasonal changes of metal accumulation and distribution in common club rush (*Schoenoplectus lacustris*) and common reed (*Phragmites australis*). *Ecotoxicology* 2007;16:457–63.

Duval L. Etude des conditions de validité du dosage céruléomolybdique de l'acide phosphorique. Conséquences pratiques. *Chim. Anal.* 1963;45:237–50.

ELAW (Environmental law alliance worldwide). Généralités sur l'exploitation minière et ses impacts. In: Guide Pour Lévaluation Proj. Eie Domaine Min. 2012.

El-Rjoob A-WO, Massadeh AM, Omari MN. Evaluation of Pb, Cu, Zn, Cd, Ni and Fe levels in *Rosmarinus officinalis labiatae* (Rosemary) medicinal plant and soils in selected zones in Jordan. *Environ. Monit. Assess.* 2008;140:61–8.

El-Zohri MHA, Cabala R, Frank H. Quantification of phytochelatins in plants by reversed-phase HPLC-ESI-MS-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 2005;382:1871–6.

Engelsma G. Effect of Daylength on Phenol Metabolism in the Leaves of *Salvia occidentalis*. *Plant Physiol.* 1979;63:765–8.

Epstein E. The anomaly of silicon in plant biology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994;91:11–7.

Estaún V, Savé R, Biel C. AM inoculation as a biological tool to improve plant revegetation of a disturbed soil with *Rosmarinus officinalis* under semi-arid conditions. *Appl. Soil Ecol.* 1997;6:223–9.

Ettler V, Tejnecky V, Mihaljevic M, Sebek O, Zuna M, Vanek A. Antimony mobility in lead smelter-polluted soils. *Geoderma* 2010;155:409–18.

Evangelou MWH, Ebel M, Schaeffer A. Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. *Chemosphere* 2007;68:989–1003.

Fageria N., Baligar C, Clark R. Micronutrients in crop production. In: . *Adv. Agron.*, vol. Volume 77. Academic Press; 2002. p. 185–268.

FAO/WHO Food Standards Programme. Codex alimentarius Commission. Report of the Thirty-first Session. 2008.

Fast AG, Papoutsakis ET. Stoichiometric and energetic analyses of non-photosynthetic CO₂-fixation pathways to support synthetic biology strategies for production of fuels and chemicals. *Biotechnol. Bioprocess Eng. • Process Syst. Eng.* 2012;1:380–95.

Feix I, Tremel-Schaub A. Contamination des sols - Transfert des sols vers les plantes. ADEME. ZDP Sciences; 2005.

Finch H. Comparison of the Performance of Nonparametric and Parametric MANOVA Test Statistics when Assumptions Are Violated. *Methodol. Eur. J. Res. Methods Behav. Soc. Sci.* 2005;1:27–38.

Finnegan PM, Chen W. Arsenic Toxicity: The Effects on Plant Metabolism. *Front. Physiol.* 2012;3.

Fitz WJ, Wenzel WW. Arsenic transformations in the soil–rhizosphere–plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. *Highlights Ecb10 - Nov. Bioact. Subst. Bioremediation Technol.* 2002;99:259–78.

Fobi N. Lead smelting - International review. In: Morehouse School of Medicine, Atlanta, GA; 2007.

Fournier P. Les quatres flores de France. Editions Lechevalier. 1961.

Freedman B, Hutchinson T. Source of metal and elemental contaminants of terrestrial environments. In: *Eff. Heavy Met. Pollut. Plants Met. Environ.*, vol. II. Pollution monitoring Series. Applied science publisher: London and Nex Jersey; 1981. p. 35–94.

Fukui Y, Tanaka Y, Kusumi T, Iwashita T, Nomoto K. A rationale for the shift in colour towards blue in transgenic carnation flowers expressing the flavonoid 3',5'-hydroxylase gene. *Phytochemistry* 2003;63:15–23.

Gadd GM. Interactions of fungip with toxic metals. *New Phytol.* 1993;124:25–60.

Gamalero E, Lingua G, Berta G, Glick BR. Beneficial role of plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to heavy metal stress. *Can. J. Microbiol.* 2009;55:501–14.

Garbisu C, Alkorta I. Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresour. Technol.* 2001;77:229–36.

Garrabrants AC, Kosson DS. Use of a chelating agent to determine the metal availability for leaching from soils and wastes. *Waste Manag.* 2000;20:155–65.

Al-Ghamdi A a. M, Jais HM. Interaction between arbuscular mycorrhiza and heavy metals in the rhizosphere and roots of *Juniperus procera*. *Int. J. Agric. Biol.* 2012;v. 14(1).

Ghosh M, Singh S. A review on phytoremediation of heavy metal and utilization of its byproducts. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 2005;3:1–18.

Gildon A, Tinker PB. Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants. *New Phytol.* 1983;95:247–61.

GIP des Calanques. Avant projet pour la création du Parc National des Calanques : composantes du patrimoine naturel, culturel et paysager. 2008.

Gitelson AA, Buschmann C, Lichtenthaler HK. The Chlorophyll Fluorescence Ratio F735/F700 as an Accurate Measure of the Chlorophyll Content in Plants. *Remote Sens. Environ.* 1999;69:296–302.

Gobran GR, Huang PM. *Biogeochemistry of Trace Elements in the Rhizosphere.* Elsevier; 2005.

Gohre V, Paszkowski U. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 2006;223:1115–22.

Gommy C, Perdrix E, Galloo J-C, Guillermo R. Metal Speciation in Soil: Extraction of Exchangeable Cations from a Calcareous Soil with a Magnesium Nitrate Solution. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 1998;72:27–45.

Gong J-M, Lee DA, Schroeder JI. Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatin and cadmium in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003;100:10118–23.

Gonzalez-Chavez MC, Carrillo-Gonzalez R, Wright SF, Nichols KA. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environ. Pollut.* 2004;130:317–23.

Gou J-Y, Felippes FF, Liu C-J, Weigel D, Wang J-W. Negative Regulation of Anthocyanin Biosynthesis in *Arabidopsis* by a miR156-Targeted SPL Transcription Factor. *Plant Cell Online* 2011;23:1512–22.

Grandlic CJ, Mendez MO, Chorover J, Machado B, Maier RM. Plant Growth-Promoting Bacteria for Phytostabilization of Mine Tailings. *Environ. Sci. Technol.* 2008;42:2079–84.

Gray EJ, Smith DL. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.* 2005;37:395–412.

Green ID. The transfer and fate of cadmium and zinc from sewage sludge amended agricultural soil in an arthropod food chain. Thèse; Bournemouth University, Fern Barrow, Poole, Dorset, BH12 5BB, UK; 2003.

Greger M. Metal availability, uptake, transport and accumulation in plants. In: *Heavy Met. Stress Plants Biomol. Ecosyst.* 2nde ed. MNV Prasad: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2004. p. 1–27.

Grennan AK. Metallothioneins, a Diverse Protein Family. *Plant Physiol.* 2011;155:1750–1.

Grill E, Löffler S, Winnacker E, Zenk M. Phytochelatin, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1989;86:6838–42.

Grill E, Winnacker E, Zenk M. Phytochelatins - the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 1985;230:674–6.

Grill E, Winnacker E, Zenk M. Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1987;84:439–43.

Guittonneau G-G, Huon A. Connaitre et reconnaitre la flore et la végétation méditerranéenne. Ouest-France: Paris; 1993.

Gupta AK, Sinha S. Assessment of single extraction methods for the prediction of bioavailability of metals to *Brassica juncea* L. Czern. (var. *Vaibhav*) grown on tannery waste contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 2007;149:144–50.

Gupta M, Rai U, Tripathi R, Chandra P. Lead induced changes in glutathione and phytochelatin in *hydrilla-verticillata* (IF) royle. *Chemosphere* 1995;30:2011–20.

Habte JA. Chapter 14. Mycorrhizal fungi and plant nutrition. In: *Plant Nutr. Manag. Hawaii Soils Approaches Trop. Subtrop. Agric.* College of Tropical Agriculture & Human Resources, University of Hawaii at Manoa; 2000.

Hall JL. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 2002;53:1–11.

Hamid N, Bukhari N, Jawaid F. Physiological responses of *Phaseolus vulgaris* to different lead concentrations. *Pak. J. Bot.* 2010;v. 42(1).

Hammel W, Debus R, Steubing L. Mobility of antimony in soil and its availability to plants. *Chemosphere* 2000;41:1791–8.

Hamon RE, Holm PE, Lorenz SE, McGrath SP, Christensen TH. Metal uptake by plants from sludge-amended soils: caution is required in the plateau interpretation. *Plant Soil* 1999;216:53–64.

Harris J, McCartor A. The world's worst toxic pollution problems. The top ten of the toxic twenty. Blacksmith Institute's; 2011.

Harrison MJ. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1999;50:361–89.

Harrison MJ, Dewbre GR, Liu JY. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* 2002;14:2413–29.

Haselwandter K, Read DJ. The significance of a root-fungus association in two *Carex* species of high-alpine plant communities. *Oecologia* 1982;53:352–4.

He ZL, Yang XE, Stoffella PJ. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2005;19:125–40.

Heo M, Gabriel KR. A permutation test of association between configurations by means of the rv coefficient. *Commun. Stat. - Simul. Comput.* 1998;27:843–56.

Hildebrandt U, Kaldorf M, Bothe H. The Zinc Violet and its Colonization by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *J. Plant Physiol.* 1999;154:709–17.

Hirata K, Tsuji N, Miyamoto K. Biosynthetic regulation of phytochelatins, heavy metal-binding peptides. *J. Biosci. Bioeng.* 2005;100:593–9.

Hossain MA, Piyatida P, da Silva JAT, Fujita M. Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. *J. Bot.* 2012;2012:1-37

Huang PM. Soil Mineral–Organic Matter–Microorganism Interactions: Fundamentals and Impacts. In: *Adv. Agron.*, vol. Volume 82. Academic Press; 2004. p. 391–472.

Huang PM, Germida JJ. Chemical and biological processes in the rhizosphere: metal pollutants. *Iupac Ser. Anal. Phys. Chem. Environ. Syst.* Vol. 8 2001:381–438. CABDirect2. CABDirect2.

INERIS. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Plomb et ses dérivés. 2003.

INERIS. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Cuivre et ses dérivés. 2005a.

INERIS. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Zinc et ses dérivés. 2005b.

INERIS. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Antimoine et ses dérivés. 2007.

INERIS. Point sur les valeurs toxicologiques de référence (VTR). March 2009.

INERIS. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Arsenic et ses dérivés. 2010.

Intawongse M, Dean JR. Uptake of heavy metals by vegetable plants grown on contaminated soil and their bioavailability in the human gastrointestinal tract. *Food Addit. Contam.* 2006;23:36–48.

IUP environnement, CERA. Réhabilitation de la zone de l’Escalette. Etude des risques. 2005.

Jacob-Wilk D, Holland D, Goldschmidt EE, Riov J, Eyal Y. Chlorophyll breakdown by chlorophyllase: isolation and functional expression of the Chlase1 gene from ethylene-treated Citrus fruit and its regulation during development. *Plant J.* 1999;20:653–61.

Jadia CD, Fulekar MH. phytoremediation of heavy metals : recent techniques. *Afr. J. Biotechnol.* 2009;8:921–8.

Jauzein P. Flore des champs cultivés. Editions INRA. 1995.

Jemal F, Ghorbal M. Phytoremédiation. Rev. Hte 2002;122:49–60.

Jennings W, Shibamoto T. Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography. 465 Seiten. Academic Press, New York, London, Sydney, Toronto, San Francisco 1980..1982;26:830–830.

Joner EJ, Briones R, Leyval C. Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. Plant Soil 2000;226:227–34.

Joret G, Hebert J. Contribution à la détermination du besoin des sols en acide phosphorique. Ann. Agron. 1955;2:233–99.

Jozefczak M, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A. Glutathione Is a Key Player in Metal-Induced Oxidative Stress Defenses. Int. J. Mol. Sci. 2012;13:3145–75.

Jumpponen A. Dark septate endophytes - are they mycorrhizal? Mycorrhiza 2001;11:207–11.

Jumpponen A, Trappe JM. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. New Phytol. 1998;140:295–310.

Juste C. Appréciation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments en traces du sol. Sci. Sol 1988;26:103–12.

Kabata-Pendias A. Trace Elements in Soils and Plants, Third Edition. CRC Press; November 8, 2000.

Kabata-Pendias A. Soil–plant transfer of trace elements—an environmental issue. Biogeochem. Process. Role Heavy Met. Soil Environ. 2004;122:143–9.

Kabata-Pendias A. Trace elements in soils and plants. fourth. Taylor and Francis group; 2011.

Kalbitz K, Solinger S, Park J-H, Michalzik B, Matzner E. Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils : A review. Soil Sci.;165:277–304.

Karamac M. Chelation of Cu(II), Zn(II), and Fe(II) by Tannin Constituents of Selected Edible Nuts. Int. J. Mol. Sci. 2009;10:5485–97.

Karimian N, Kalbasi M, Hajrasuliha S. Effect of converter sludge, and its mixtures with organic matter, elemental sulfur and sulfuric acid on availability of iron, phosphorus and manganese of 3 calcareous soils from central Iran. Afr. J. Agric. Res. 2012;7:568–76.

Kastori R, Petrovic M, Petrovic N. Effect of excess lead, cadmium, copper, and zinc on water relations in sunflower. J. Plant Nutr. 1992;15:2427–39.

Kawashima CG, Noji M, Nakamura M, Ogra Y, Suzuki KT, Saito K. Heavy metal tolerance of transgenic tobacco plants over-expressing cysteine synthase. Biotechnol. Lett. 2004;26:153–7.

Kerkeb L, Kramer U. The role of free histidine in xylem loading of nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea*. Plant Physiol. 2003;131:716–24.

- Khan MS, Zaidi A, Wani PA, Oves M. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environ. Chem. Lett.* 2009;7:1–19.
- Kim S, Lim H, Lee I. Enhanced heavy metal phytoextraction by *Echinochloa crus-galli* using root exudates. *J. Biosci. Bioeng.* 2010;109:47–50.
- Kiss T, Gergely A. Critical survey of stability constants of complexes of glycine. *Pure Appl. Chem.* 1991;63:597–638.
- Komarek M, Chrastny V, Stichova J. Metal/metalloid contamination and isotopic composition of lead in edible mushrooms and forest soils originating from a smelting area. *Environ. Int.* 2007;33:677–84.
- Komnitsas K, Modis K. Soil risk assessment of As and Zn contamination in a coal mining region using geostatistics. *Sci. Total Environ.* 2006;371:190–6.
- Kopriva S, Rennenberg H. Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: interaction with N and C metabolism. *J. Exp. Bot.* 2004;55:1831–42.
- Kosalec I, Cvek J, Tomic S. Contaminants of medicinal herbs and herbal products. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 2009;60:485–501.
- Kovacik J, Klejdus B. Dynamics of phenolic acids and lignin accumulation in metal-treated *Matricaria chamomilla* roots. *Plant Cell Reports* 2008;27:605–15.
- Kozdroj J, van Elsas JD. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biol. Biochem.* 2000;32:1405–17.
- Kramer U, Cotter-Howells JD, Charnock JM, Baker AJM, Smith JAC. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 1996;379:635–8.
- Lasalle J. Synthèse de l'évaluation des risques sanitaires relative à la contamination environnementale du littoral sud de Marseille (Montredon - Callelongue). In *Vs-DRASS*; 2005.
- Lasalle J. Présence de plomb et d'arsenic sur le littoral sud de Marseille : une étude de santé. *INVS Santé Environnement.* 2007.
- Lebeau T, Braud A, Jezequel K. Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: A review. *Environ. Pollut.* 2008;153:497–522.
- Lejealle S, Evain S, Cerovic Z. Multiplex : A new diagnostic tool for management of nitrogen fertilization of turfgrass Denver; presented at the 10th International Conference on Precision Agriculture; 2010.
- Lestan D, Luo C, Li X. The use of chelating agents in the remediation of metal-contaminated soils: A review. *Environ. Pollut.* 2008;153:3–13.

Li T, Liu MJ, Zhang XT, Zhang HB, Sha T, Zhao ZW. Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*. *Sci. Total Environ.* 2011;409:1069–74.

Liao MT, Hedley MJ, Woolley DJ, Brooks RR, Nichols MA. Copper uptake and translocation in chicory (*Cichorium intybus* L. cv. *Grasslands Puna*) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. *Rondy*) plants grown in NFT system. I. Copper uptake and distribution in plants. *Plant Soil* 2000;221:135–42.

Liao YC, Chien SWC, Wang MC, Shen Y, Hung PL, Das B. Effect of transpiration on Pb uptake by lettuce and on water soluble low molecular weight organic acids in rhizosphere. *Chemosphere* 2006;65:343–51.

Lin Q, Chen YX, He YF, Tian GM. Root-induced changes of lead availability in the rhizosphere of *Oryza sativa* L. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2004;104:605–13.

Lindsay W. inorganic phase equilibrium of micronutrients to plant roots. *Advantage Agron.* 1972;20:91–151.

Logan T., Chaney RL. Non linear rate response and relative crop uptake of sludge cadmium for land application of sludge risk assessment. In: *Heavy Met. Environ.* Lindberg, S.E. and Hutchinson, T.C.: Edinburgh; 1987. p. 387–8.

Logan TJ, Lindsay BJ, Goins LE, Ryan JA. Field Assessment of Sludge Metal Bioavailability to Crops: Sludge Rate Response. *J. Environ. Qual.* 1997;26:534–50.

Logi C, Sbrana C, Giovannetti M. Cellular Events Involved in Survival of Individual Arbuscular Mycorrhizal Symbionts Growing in the Absence of the Host. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998;64:3473–9.

Ma Y, Prasad MNV, Rajkumar M, Freitas H. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnol. Adv.* 2011;29:248–58.

Ma Y, Rajkumar M, Freitas H. Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylooxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by *Brassica juncea*. *J. Environ. Manage.* 2009;90:831–7.

Madaan R, Kumar S, Bansal G, Sharma A. Estimation of total phenols and flavonoids in extracts of *Actaea spicata* roots and antioxidant activity studies. *Indian J. Pharm. Sci.* 2011;73:666.

Madejon P, Burgos P, Cabrera F, Madejon E. Phytostabilization of Amended Soils Polluted with Trace Elements Using the Mediterranean Shrub: *Rosmarinus officinalis*. *Int. J. Phytoremediation* 2009;11:542–57.

Madhaiyan M, Poonguzhali S, Sa T. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L). *Chemosphere* 2007;69:220–8.

MAEVA. Identification des transferts des éléments traces métalliques de la friche industrielle de l'Escalette vers les différents compartiments environnementaux. Université Paul Cézanne; 2007.

MAEVA. Impact de la pollution de la friche industrielle de l'Escalette sur le compartiment vivant. Université de Provence, Université Paul Cézanne; 2008.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004;79:727–47.

Maness NE. Production practice of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and Sage (*Salvia officinalis* L.). Oklahoma State University; 1981.

Manly BFJ. Randomization, Bootstrap And Monte Carlo Methods in Biology. Chapman & Hall/CRC; 1997.

Mann R, Vijver M, Peijnenburg W. Metals and metalloids in terrestrial systems: bioaccumulation, biomagnification and subsequent adverse effects. In: *Ecol. Impacts Toxic Chem.* 2011. p. 43–62.

Mantzavinos D, Burrows DM., Willey R, Lo Biundo G, Zhang SF, Livingston AG, Metcalfe IS. Chemical treatment of an anionic surfactant wastewater: electrospray-ms studies of intermediates and effect on aerobic biodegradability. *Water Res.* 2001;35:3337–44.

Mariano ED, Keltjen WG. Evaluating the role of root citrate exudation as a mechanism of aluminium resistance in maize genotypes. *Plant Soil* 2003;256:469–79.

Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press: London; 1995.

Marschner H. Soil-Root Interface: Biological and Biochemical Processes. *Soil Chem. Ecosyst. Heal.* 1998;special issue:191–231.

Marséco. Biodiversité et pollution en zone littorale marseillaise : comprendre les risques pour les écosystèmes et l'homme. *Cah. Anr-Contam. Environnements Constater Diffus. Décider.* 2012;6:94.

Masscheleyn PH, Patrick WHJ. Selenium, arsenic and chromium redox chemistry in wetland soils and sediments. *Environ. Geochem. Heal.* 1994;special issue:615–25.

McGrath SP, Zhao F-J. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2003;14:277–82.

McGrath SP, Zhao FJ, Lombi E. Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. In: Sparks DL, editor. *Adv. Agron. Vol 75, vol. 75.* 2002. p. 1–56.

Médail F, Quezel P. Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean basin. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 1997;84:112–27.

Médail F, Verlaque R. Ecological characteristics and rarity of endemic plants from southeast France and Corsica: Implications for biodiversity conservation. *Biol. Conserv.* 1997;80:269–81.

Meers E, Du Laing G, Unamuno V, Ruttens A, Vangronsveld J, Tack FMG, Verloo MG. Comparison of cadmium extractability from soils by commonly used single extraction protocols. *Geoderma* 2007;141:247–59.

Meers E, Samson R, Tack F, Ruttens A, Vandeghechuchte M, Vangronsveld J, Verloo M. Phytoavailability assessment of heavy metals in soil by single extractions and accumulation by *Phaseolus vulgaris*. *Environ. Exp. Bot.* 2007;60:385–96.

Melo EEC, Nascimento Clístenes WA do, Accioly AM de A, Santos ACQ. Phytoextraction and fractionation of heavy metals in soil after multiple applications of natural chelants. *Sci. Agric.* 2008;65:61–8.

Memon AR, Schroder P. Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2009;16:162–75.

Mench M, Martin E. Mobilization of cadmium and other metals from two soils by root exudates. *Plant Soil* 1991;132:187–96.

Mendez MO, Maier RM. Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments - An emerging remediation technology. *Environ. Health Perspect.* 2008;116:278–83.

Menon MM. Influence of soil pollution by heavy metals on the water relations of young forest ecosystems. Swiss federal institute of technology; 2006.

Menzies NW, Donn MJ, Kopittke PM. Evaluation of extractants for estimation of the phytoavailable trace metals in soils. *Environ. Pollut.* 2007;145:121–30.

Mesjasz-Przybyłowicz J, Barnabas A, Przybyłowicz W. Comparison of cytology and distribution of nickel in roots of Ni-hyperaccumulating and non-hyperaccumulating genotypes of *Senecio coronatus*. *Plant Soil* 2007;293:61–78.

Mességué M. Mon herbier de santé. Robert Laffont; 1992.

Metson A. Methods of chemical analysis for soil survey samples. Dept. of Scientific and industrial research. Soil bureau bulletin 12. Wellington : D.S.I.R: New Zealand; 1956.

Meyer S, Cartelat A, Moya I, Cerovic ZG. UV-induced blue-green and far-red fluorescence along wheat leaves: a potential signature of leaf ageing. *J. Exp. Bot.* 2003;54:757–69.

Michalak A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Pol. J. Environ. Stud.* 2006;15:523–30.

Molinier R. Etudes phytosociologiques et écologiques en Provence occidentale. Université de Paris, Faculté des sciences: Paris; 1935.

Morel JL. Assessment of phytoavailability of trace elements in soils. *Analisis* 1997;25:M70–M72.

Moreno E, Penalosa J, Esteban E, Carpena RO. Trace elements accumulation and phytotoxicity in Mediterranean shrubs after a treatment with pyritic sludge. In: *Improv. Phytotechnologies. COST Action 859, VGTU Press Technica: Vilnius; 2007. p. 190–2.*

Moreno-Jimenez E, Esteban E, Carpena-Ruiz RO, Carmen Lobo M, Penalosa JM. Phytostabilisation with Mediterranean shrubs and liming improved soil quality in a pot experiment with a pyrite mine soil. *J. Hazard. Mater.* 2012;201:52–9.

Moreno-Jiménez E, Gamarra R, Carpena-Ruiz RO, Millán R, Peñalosa JM, Esteban E. Mercury bioaccumulation and phytotoxicity in two wild plant species of Almadén area. *Chemosphere* 2006;63:1969–73.

Moreno-Jimenez E, Penalosa JM, Carpena-Ruiz RO, Esteban E. Comparison of arsenic resistance in Mediterranean woody shrubs used in restoration activities. *Chemosphere* 2008;71:466–73.

Moreno-Jiménez E, Peñalosa JM, Esteban E, Bernal MP. Feasibility of arsenic phytostabilisation using Mediterranean shrubs: impact of root mineralisation on As availability in soils. *J. Environ. Monit. Jem* 2009;11:1375–80.

Moreno-Jimenez E, Vazquez S, Carpena-Ruiz RO, Esteban E, Penalosa JM. Using Mediterranean shrubs for the phytoremediation of a soil impacted by pyritic wastes in Southern Spain: A field experiment. *J. Environ. Manage.* 2011;92:1584–90.

Morona JK, Morona R, Miller DC, Paton JC. *Streptococcus pneumoniae* Capsule Biosynthesis Protein CpsB Is a Novel Manganese-Dependent Phosphotyrosine-Protein Phosphatase. *J. Bacteriol.* 2002;184:577–83.

Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ. Chem. Lett.* 2010;8:199–216.

Nakayama SMM, Ikenaka Y, Hamada K, Muzandu K, Choongo K, Teraoka H, Mizuno N, Ishizuka M. Metal and metalloid contamination in roadside soil and wild rats around a Pb–Zn mine in Kabwe, Zambia. *Environ. Pollut.* 2011;159:175–81.

Nath R, Pavur R. A new statistic in the one-way multivariate analysis of variance. *Comput Stat Data Anal* 1985;2:297–315.

Neumann G, George TS, Plassard C. Strategies and methods for studying the rhizosphere-the plant science toolbox. *Plant Soil* 2009;321:431–56.

Neumann G, Romheld V. Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant Soil* 1999;211:121–30.

Nies DH. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999;51:730–50.

Noctor G, Arisi A-CM, Jouanin L, Kunert KJ, Rennenberg H, Foyer CH. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J. Exp. Bot.* 1998;49:623–47.

Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, Marquez-Garcia B, Queval G, Foyer CH. Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ.* 2012;35:454–84.

Noctor G, Strohm M, Jouanin L, Kunert KJ, Foyer CH, Rennenberg H. Synthesis of Glutathione in Leaves of Transgenic Poplar Overexpressing [gamma]-Glutamylcysteine Synthetase. *Plant Physiol.* 1996;112:1071–8.

Noda N, Kanno Y, Kato N, Kazuma K, Suzuki M. Regulation of gene expression involved in flavonol and anthocyanin biosynthesis during petal development in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). *Physiol. Plant.* 2004;122:305–13.

Oades JM. Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for management. *Plant Soil* 1984;76:319–37.

Olko A, Abratowska A, Zylkowska J, Wierzbicka M, Tukiendorf A. *Armeria maritima* from a calamine heap--initial studies on physiologic-metabolic adaptations to metal-enriched soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2008;69:209–18.

Ondo JA. Vulnérabilité des sols maraîchers du Gabon (région de Libreville) : acidification et mobilité des éléments métalliques. Aix-Marseille Université: Marseille; 2011.

Oomen AG, Tolls J, Sips AJAM, Groten JP. In vitro intestinal lead uptake and transport in relation to speciation. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2003;44:116–24.

Owen TC. Thiol detection, derivatization and tagging at micromole to nanomole levels using propiolates. *Bioorganic Chem.* 2008;36:156–60.

Padmavathiamma PK, Li LY. Phytoremediation technology: Hyper-accumulation metals in plants. *Water. Air. Soil Pollut.* 2007a;184:105–26.

Page V, Feller U. Selective transport of zinc, manganese, nickel, cobalt and cadmium in the root system and transfer to the leaves in young wheat plants. *Ann. Bot.* 2005;96:425–34.

Page V, Weisskopf L, Feller U. Heavy metals in white lupin: uptake, root-to-shoot transfer and redistribution within the plant. *New Phytol.* 2006;171:329–41.

Pal M, Horvath E, Janda T, Paldi E, Szalai G. Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. *J. Plant Nutr. Soil Sci.-Z. Pflanzenernahrung Bodenkd.* 2006;169:239–46.

Palacio-Barco E. Développement d'une méthode alternative pour la caractérisation fonctionnelle par spectrofluorescence des composés organiques dissous dans les écosystèmes. Aix-Marseille Université: Marseille; 2010.

Palero-Fernandez FJ, Martin-Izard A. Trace element contents in galena and sphalerite from ore deposits of the Alcudia Valley mineral field (Eastern Sierra Morena, Spain). *J. Geochem. Explor.* 2005;86:1–25.

Palese R, Aeschmann D. La Grande flore en couleurs de Gaston Bonnier: France, Suisse, Belgique et pays voisins. vol. Tomes I à IV. Editions Belin; 1990.

Pausas JG. Mediterranean vegetation dynamics: modelling problems and functional types. *Plant Ecol.* 1999;140:27–39.

Pawlak-Sprada S, Stobiecki M, Deckert J. Activation of phenylpropanoid pathway in legume plants exposed to heavy metals. Part II. Profiling of isoflavonoids and their glycoconjugates induced in roots of lupine (*Lupinus luteus*) seedlings treated with cadmium and lead. *Acta Biochim. Pol.* 2011;58:217–23.

Peijnenburg WJGM, Zablotskaja M, Vijver MG. Monitoring metals in terrestrial environments within a bioavailability framework and a focus on soil extraction. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2007;67:163–79.

Pellet DM, Grunes DL, Kochian LV. Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta* 1995;196:788–95.

Peralta-Videa JR, Lopez ML, Narayan M, Saupé G, Gardea-Torresdey J. The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2009;41:1665–77.

Perez-Rama M, Vaamonde ET, Alonso JA. Capillary zone electrophoresis for analysis of phytochelatins and other thiol peptides in complex biological samples derivatized with monobromobimane. *Electrophoresis* 2005;26:610–20.

Petitjean P, Henin O, Gruau G. Dosage du carbone organique dissous dans les eaux douces naturelles : intérêt, principe, mise en oeuvre et précautions opératoires. Rennes : Geosciences Rennes; 2004.

Phillips J, Hayman D. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 1970;55:158–&.

Pialot H. Ligneux des collines de la provence calcaire. Edition CRDP. Marseille; 1988.

Pickering IJ, Prince RC, George MJ, Smith RD, George GN, Salt DE. Reduction and Coordination of Arsenic in Indian Mustard. *Plant Physiol.* 2000;122:1171–8.

Pilon-Smits E. Phytoremediation. In: *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 56. 2005. p. 15–39.

Potesil D, Petrlova J, Adam V, Vacek J, Klejdus B, Zehnalek J, Trnkova L, Havel L, Kizek R. Simultaneous femtomole determination of cysteine, reduced and oxidized glutathione, and phytochelatin in maize (*Zea mays* L.) kernels using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. A* 2005;1084:134–44.

Pounds J, Long G, Rosen J. Cellular and molecular toxicity of lead in bone. *Environ. Health Perspect.* 1991;91:17–32.

Prasad MNV. Heavy Metal Stress in Plants: From Biomolecules to Ecosystems. Springer; June 14, 2004.

- Prasad MNV, Freitas HMD. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electron. J. Biotechnol.* 2003;6:285–321.
- Pueyo M, López-Sánchez J., Rauret G. Assessment of CaCl₂, NaNO₃ and NH₄NO₃ extraction procedures for the study of Cd, Cu, Pb and Zn extractability in contaminated soils. *Anal. Chim. Acta* 2004;504:217–26.
- Pulford ID, Watson C. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees—a review. *Environ. Int.* 2003;29:529–40.
- Quartacci MF, Irtelli B, Gonnelli C, Gabbrielli R, Navari-Izzo F. Naturally-assisted metal phytoextraction by *Brassica carinata*: Role of root exudates. *Environ. Pollut.* 2009;157:2697–703.
- Quevauviller P. Operationally defined extraction procedures for soil and sediment analysis I. Standardization. *Trac Trends Anal. Chem.* 1998;17:289–98.
- Quevauviller P, Lachica M, Barahona E, Rauret G, Ure A, Gomez A, Muntau H. Interlaboratory comparison of EDTA and DTPA procedures prior to certification of extractable trace elements in calcareous soil. *Harmon. Leaching extraction Tests Environ. Risk Assess.* 1996;178:127–32.
- Quevauviller P, Rauret G, LopezSanchez JF, Rubio R, Ure A, Muntau H. Certification of trace metal extractable contents in a sediment reference material (CRM 601) following a three-step sequential extraction procedure. *Sci. Total Environ.* 1997;205:223–34.
- Raab A, Feldmann J, Meharg AA. The Nature of Arsenic-Phytochelatin Complexes in *Holcus lanatus* and *Pteris cretica*. *Plant Physiol.* 2004;134:1113–22.
- Raab A, Schat H, Meharg AA, Feldmann J. Uptake, translocation and transformation of arsenate and arsenite in sunflower (*Helianthus annuus*): formation of arsenic-phytochelatin complexes during exposure to high arsenic concentrations. *New Phytol.* 2005;168:551–8.
- Rabie GH. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungus to red kidney and wheat plants tolerance grown in heavy metal-polluted soil. *Afr. J. Biotechnol.* 2005;4:332–45.
- Rabier J, Laffont-Schwob I, Notonier R, Fogliani B, Bouraïma-Madjèbi S. Anatomical element localization by EDXS in *Grevillea exul* var. *exul* under nickel stress. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 2008;156:1156–63.
- Rajkumar M, Sandhya S, Prasad MNV, Freitas H. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Spec. Issue Acb* 2011 2012;30:1562–74.
- Rashed MN. Monitoring of contaminated toxic and heavy metals, from mine tailings through age accumulation, in soil and some wild plants at Southeast Egypt. *J. Hazard. Mater.* 2010;178:739–46.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. *Biologie végétale*. Sixth edition. Worth Publishers: New-York; 1999.

Raveux O. L'usine à plomb de l'Escalette : le dernier grand vestige de la métallurgie marseillaise du plomb. *Dynamiques Hier Aujourd'hui* 2002;10:7–9.

Reglero MM, Monsalve-González L, Taggart MA, Mateo R. Transfer of metals to plants and red deer in an old lead mining area in Spain. *Sci. Total Environ.* 2008;406:287–97.

Regvar M, Likar M, Piltaver A, Kugoni N, Smith JE. Fungal community structure under goat willows (*Salix caprea* L.) growing at metal polluted site: the potential of screening in a model phytostabilisation study. *Plant Soil* 2010;330:345–56.

Reichman SM. The Responses of Plants to Metal Toxicity. A Review Focusing on Copper, Manganese and Zinc. The Australian minerals & energy environment foundation: Melbourne, Australia; 2002.

Ren L, Zhu D, Cui J, Liao S, Geng M, Zhou W, Hamilton D. Plant availability of boron doped on iron and manganese oxides and its effect on soil acidosis. *Geoderma* 2009;151:401–6.

Rennenberg H, Schmitz K, Bergmann L. Long-distance transport of sulfur in *Nicotiana tabacum*. *Planta* 1979;147:57–62.

Riesen O, Feller U. Redistribution of Nickel, Cobalt, Manganese, Zinc, and Cadmium via the Phloem in Young and Maturing Wheat. *J. Plant Nutr.* 2005;28:421–30.

Robert M, Berthelin J. Role of biological and biochemical factors in soil weathering. In: Huang P, Schnitzer M, editors. *Interactions Soil Miner. Nat. Organics Microbes*. Soil Science Society of America; 1986. p. 453–95.

Robert P, Escoufier Y. A Unifying Tool for Linear Multivariate Statistical Methods: The RV-Coefficient. *Appl. Stat.* 1976;25:257.

Rovira A. Plant root exudates. *Bot. Rev.* 1969;35:35–&.

Rovira A, Foster R, Martin J. Note on terminology : origin, nature and nomenclature of the organic materials in the rhizosphere. In: . *Soil-Root Interface*. Eds L. Harley et R.S. Russell. Academic Press: New York; 1979. p. 1–4.

Ruyi Y, Guodong Y, Jianjun T, Xin C. Effects of metal lead on growth and mycorrhizae of an invasive plant species (*Solidago canadensis* L.). *J. Environ. Sci.-China* 2008;20:739–44.

Salt DE, Prince RC, Baker AJM, Raskin I, Pickering IJ. Zinc Ligands in the Metal Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* As Determined Using X-ray Absorption Spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 1999;33:713–7.

Sánchez-Blanco MJ, Ferrández T, Morales MA, Morte A, Alarcón JJ. Variations in water status, gas exchange, and growth in *Rosmarinus officinalis* plants infected with *Glomus deserticola* under drought conditions. *J. Plant Physiol.* 2004;161:675–82.

Sánchez-Castro I, Ferrol N, Cornejo P, Barea J-M. Temporal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing roots of representative shrub species in a semi-arid Mediterranean ecosystem. *Mycorrhiza* 2012;22:449–60.

Sauvé S, Hendershot W, Allen HE. Solid-Solution Partitioning of Metals in Contaminated Soils: Dependence on pH, Total Metal Burden, and Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.* 2000;34:1125–31.

Scheller HV, Huang B, Hatch E, Goldsbrough PB. Phytochelatin Synthesis and Glutathione Levels in Response to Heavy Metals in Tomato Cells 1. *Plant Physiol.* 1987;85:1031–5.

Schützendübel A, Polle A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* 2002;53:1351–65.

Schwob I, Bessiere JM, Masotti W, Viano J. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. *Biochem. Syst. Ecol.* 2004;32:735–45.

Senesi N, Loffredo E. Metal ion complexation by soil humic substances. In: *Chem. Process. Soils*. Soil Science Society of America; 2005. p. 563–617.

Seregin IV, Ivanov VB. Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 2001;48:523–44.

Sethi A, Sharma RA. Antioxidant activity with total phenolic constituent from *Aerva Tomentosa* Forsk. *Int. J. Pharma Io Sci.* 2011;2:596–603.

Ben Sghaier M, Skandrani I, Nasr N, Franca M-GD, Chekir-Ghedira L, Ghedira K. Flavonoids and sesquiterpenes from *Teucrium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure–activity relationship study. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2011;32:336–48.

Shakya K, Chettri MK, Sawidis T. Impact of Heavy Metals (Copper, Zinc, and Lead) on the Chlorophyll Content of Some Mosses. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2007;54:412–21.

Sharma P, Dubey RS. Lead toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 2005;17:35–52.

Sharma SS, Schat H, Vooijs R. In vitro alleviation of heavy metal-induced enzyme inhibition by proline. *Phytochemistry* 1998;49:1531–5.

Shipley S, Nordin AB, Tang CG, Kim S-K. Phytoremediation for arsenic contamination : arsenate reductase. *Pulse Undergrad. J. Bayl. Univ.* 2008;6:1–12.

Simmons DBD, Hayward AR, Hutchinson TC, Emery RJN. Identification and quantification of glutathione and phytochelatin from *Chlorella vulgaris* by RP-HPLC ESI-MS/MS and oxygen-free extraction. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009;395:809–17.

Singh Gill S, Tuteja N. Cadmium stress tolerance in crop plants. *Plant Signal. Behav.* 2011;6:215–22.

Singh VP. *Metal Toxicity And Tolerance In Plant & Animal*. Sarup & Sons; January 1, 2005.

Soaud AA, Al Darwish FH, Saleh ME, El-Tarabily KA, Rahman MM. Effects of elemental sulfur, phosphorus, micronutrients and *Paracoccus versutus* on nutrient availability of calcareous soils. *Aust. J. Crop Sci.* 2011.

Sparks DL. *Environmental Soil Chemistry*. Academic Press; 2003.

Sposito BGSP of ES and EEU of. *The Surface Chemistry of Natural Particles*. Oxford University Press; February 26, 2004.

Stepansky A, Leustek T. Histidine biosynthesis in plants. *Amino Acids* 2006;30:127–42.

Stumm W, Morgan JJ. *Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters*. Wiley; 1996.

Subramanyam C, Venkateswerlu G. The effect of copper on histidine biosynthesis in *Neurospora crassa*. *J. Biosci.* 1979;1:143–9.

Sun Q, Ye ZH, Wang XR, Wong MH. Cadmium hyperaccumulation leads to an increase of glutathione rather than phytochelatin in the cadmium hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *J. Plant Physiol.* 2007;164:1489–98.

Sundar S, Chakravarty J. Antimony Toxicity. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 2010;7:4267–77.

Sutour S. *Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthes de corse et de kumquats*. Université de Corse; 2010.

Tahirukaj A, Young I, McWeeney G. A health promoting school approach used to the risks of lead poisoning and to establish cross-ethnic collaboration. *Promot. Educ.* 2005;12:138–40.

Tamas L, Dudikova J, Durcekova K, Halugkova L, Huttova J, Mistrik I, Olle M. Alterations of the gene expression, lipid peroxidation, proline and thiol content along the barley root exposed to cadmium. *J. Plant Physiol.* 2008;165:1193–203.

Tang X-Y, Cui Y-S, Duan J, Tang L. Pilot study of temporal variations in lead bioaccessibility and chemical fractionation in some Chinese soils. *J. Hazard. Mater.* 2008;160:29–36.

Tani FH, Barrington S. Zinc and copper uptake by plants under two transpiration rates. Part II. Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* L.). *Environ. Pollut.* 2005;138:548–58.

Testiati E. *Contamination des sols par des éléments traces métalliques en zone méditerranéenne côtière : étude de leur mobilité et du transfert à la phytocénose*. Aix-Marseille Université; 2012.

Testiati E, Parinet J, Massiani C, Laffont-Schwob I, Rabier J, Pfeifer H-R, Lenoble V, Masotti V, Prudent P. Trace metal and metalloid contamination levels in soils and in two native plant species of a former industrial site: Evaluation of the phytostabilization potential. *J. Hazard. Mater.* 2013;248–249:131–41.

Thomas G. Exchangeable cations. In: *Methods Soil Anal.* AL Page et al. eds. Agronomy 9. 1982. p. 154–7.

Thomas Ruley A, Sharma NC, Sahi SV. Antioxidant defense in a lead accumulating plant, *Sesbania drummondii*. *Plant Physiol. Biochem.* 2004;42:899–906.

Tiffin LO. Iron Translocation I. Plant Culture, Exudate Sampling, Iron-Citrate Analysis. *Plant Physiol.* 1966;41:510–4.

Tiffin LO. Translocation of manganese, iron, cobalt, and zinc in tomato. *Plant Physiol.* 1967;42:1427–32.

Toda S. Polyphenol Content and Antioxidant Effects in Herb Teas. *Chin. Med.* 2011;02:29–31.

Todorov DT, Karanov EN, Smith AR, Hall MA. Chlorophyllase Activity and Chlorophyll Content in Wild Type and eti 5 Mutant of *Arabidopsis thaliana* Subjected to Low and High Temperatures. *Biol. Plant.* 2003;46:633–6.

Tremblay N, Wang Z, Cerovic ZG. Sensing crop nitrogen status with fluorescence indicators. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 2012;32:451–64.

Tschan M, Robinson BH, Schulin R. Antimony in the soil–plant system – a review. *Environ. Chem.* 2009;6:106–15.

Turrini A, Sbrana C, Strani P, Pezzarossa B, Risaliti R, Giovannetti M. Arbuscular mycorrhizal fungi of a Mediterranean island (Pianosa), within a UNESCO Biosphere Reserve. *Biol. Fertil. Soils* 2010;46:511–20.

Vadas TM, Ahner BA. Cysteine- and glutathione-mediated uptake of lead and cadmium into *Zea mays* and *Brassica napus* roots. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 2009;157:2558–63.

Vadas TM, Ahner BA. Extraction of Lead and Cadmium from Soils by Cysteine and Glutathione. *J. Environ. Qual.* 2009;38:2245–52.

Del Val C, Barea JM, Azcon-Aguilar C. Assessing the tolerance to heavy metals of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from sewage sludge-contaminated soils. *Appl. Soil Ecol.* 1999;11:261–9.

Val CD, Barea JM, Azcón-Aguilar C. Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungus Populations in Heavy-Metal-Contaminated Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999;65:718–23.

Vamerali T, Bandiera M, Coletto L, Zanetti F, Dickinson NM, Mosca G. Phytoremediation trials on metal- and arsenic-contaminated pyrite wastes (Torviscosa, Italy). *Environ. Pollut.* 2009;157:887–94.

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

Vergnoux A. Impact des incendies et de leur répétition sur la matière organique et minérale des sols forestiers du Massif des Maures. Aix-Marseille Université: Marseille; 2009.

Verkleij JAC, Golan-Goldhirsh A, Antosiewicz DM, Schwitzguebel J-P, Schroeder P. Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper plant parts. *Environ. Exp. Bot.* 2009;67:10–22.

Villares R, Puente X, Carballeira A. Seasonal variation and background levels of heavy metals in two green seaweeds. *Environ. Pollut.* 2002;119:79–90.

Violante A, Cozzolino V, Perelomov L, Caporale A, Pigna M. Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 2010;10:268–92.

Vivas A, Barea JM, Biró B, Azcón R. Effectiveness of autochthonous bacterium and mycorrhizal fungus on *Trifolium* growth, symbiotic development and soil enzymatic activities in Zn contaminated soil. *J. Appl. Microbiol.* 2006;100:587–98.

Vodnik D, Grčman H, Maček I, van Elteren JT, Kovačević M. The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. *Sci. Total Environ.* 2008;392:130–6.

Wenzel WW. Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant Soil* 2009;321:385–408.

White MC. Metal Complexation in Xylem Fluid : II. theoretical equilibrium model and computational computer program. *Plant Physiol.* 1981;67:301–10.

Whitfield L, Richards AJ, Rimmer DL. Relationships between soil heavy metal concentration and mycorrhizal colonisation in *Thymus polytrichus* in northern England. *Mycorrhiza* 2004;14:55–62.

WHO (World Health Organization). Guidelines for drinking-water quality. First addendum to third edition. Geneva; 2006.

Willey N. Phytoremediation - Methods and Reviews. Humana Press. Methods biotechnology 23. 2007.

Wilson SC, Lockwood PV, Ashley PM, Tighe M. The chemistry and behaviour of antimony in the soil environment with comparisons to arsenic: A critical review. *Environ. Pollut.* 2010;158:1169–81.

Wolkersdorfer C, Bowell R, Walder IF, Nilssen S, Raisanen M, Heikkinen P, et al. Contemporary Reviews of Mine Water Studies in Europe, Part 2. *Mine Water Environ.* 2012;31:237–8.

World Meteorological Organization. . Météo France; 2012.

Wright SF, Upadhyaya A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 1998;198:97–107.

Wuana RA, Okieimen FE. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *Int. Sch. Res. Netw. Ecol.* 2011;2011:1–20.

Wysocki R, Clemens S, Augustyniak D, Golik P, Maciaszczyk E, Tamás MJ, Dziadkowiec D. Metalloid tolerance based on phytochelatins is not functionally equivalent to the arsenite transporter Acr3p. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003;304:293–300.

Xiong JB, Mahmood Q, Yue M. The potential of *Sedum alfredii* Hance for the biosorption of some metals from synthetic wastewater. *Desalination* 2011;267:154–9.

Yabuya T, Nakamura M, Iwashina T, Yamaguchi M, Takehara T. Anthocyanin-flavone copigmentation in bluish purple flowers of Japanese garden iris (*Iris ensata* Thunb.). *Euphytica* 1997;98:163–7.

Yadav SK. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South Afr. J. Bot.* 2010;76:167–79.

Yang H, Yang Z, Zhou L, Wong JWC. Ability of *Agropyron elongatum* to accumulate the single metal of cadmium, copper, nickel and lead and root exudation of organic acids. *J. Environ. Sci.* 2001;13:368–75.

Yang Y-G, Liu C-Q, Pan W, Zhang G-P, Zhu W-H. Heavy metal accumulation from zinc smelters in a carbonate rock region in Hezhang County, Guizhou Province, China. *Water. Air. Soil Pollut.* 2006;174:321–39.

Yang Z, Lu W, Long Y, Bao X, Yang Q. Assessment of heavy metals contamination in urban topsoil from Changchun City, China. *J. Geochem. Explor.* 2011;108:27–38.

Yateem WH, Nassehi V, Khan AR. Fluid Catalytic Cracking Unit Emissions and Their Impact. *Water. Air. Soil Pollut.* 2011;218:37–47.

Yaylali-Abanuz G. Heavy metal contamination of surface soil around Gebze industrial area, Turkey. *Microchem. J.* 2011;99:82–92.

Yenilmez F, Kuter N, Emil MK, Aksoy A. Evaluation of pollution levels at an abandoned coal mine site in Turkey with the aid of GIS. *Appl. Remote Sens. Gis Monit. Coal Fires Mine Subsid. Environ. Impacts Coal-Mine Clos. Reclam.* 2011;86:12–9.

Yokoyama Y, Ozaki O, Sato H. Separation and determination of amino acids, creatinine, bioactive amines and nucleic acid bases by dual-mode gradient ion-pair chromatography. *J. Chromatogr. A* 1996;739:333–42.

Yoon J, Cao X, Zhou Q, Ma LQ. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Sci. Total Environ.* 2006;368:456–64.

Zacharis CK, Tzanavaras PD, Themelis DG. Ethyl-propiolate as a novel and promising analytical reagent for the derivatization of thiols: Study of the reaction under flow conditions. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009;50:384–91.

Zhang H-H, Tang M, Chen H, Zheng C-L, Niu Z-C. Effect of inoculation with AM fungi on lead uptake, translocation and stress alleviation of *Zea mays* L. seedlings planting in soil with increasing lead concentrations. *Eur. J. Soil Biol.* 2010;46:306–11.

Zhao Y, Chengcai C. Toward understanding plant response to heavy metal stress. In: *Abiotic Stress Plants - Mech. Adapt.* Arun Shanker and B. Venkateswarlu; 2011. p. 428.

Zheng N, Wang Q, Zheng D. Health risk of Hg, Pb, Cd, Zn, and Cu to the inhabitants around Huludao Zinc Plant in China via consumption of vegetables. *Sci. Total Environ.* 2007;383:81–9.

Zhuang P, Zou H, Shu W. Biotransfer of heavy metals along a soil-plant-insect-chicken food chain: field study. *J. Environ. Sci. China* 2009;21:849–53.

Zuazo VHD, Martínez JRF, Raya AM. Impact of Vegetative Cover on Runoff and Soil Erosion at Hillslope Scale in Lanjaron, Spain. *The Environmentalist* 2004;24:39–48.

Annexes

Annexe 1 : présentation des sites de prélèvements in situ

• Site S3 :

En contre-bas du massif de la montagne de l'Aigle, versant ouest.

Altitude moyenne : 123 m

Orientation : O

Pente faible (15 %) et milieu ouvert, plein soleil et milieu sec.

Relevé GPS : S3 = N 43°14 071' et E 05°23 191'

5 romarins sélectionnés sur une zone de 10 × 10 m (en pointillé figure ci-dessous)

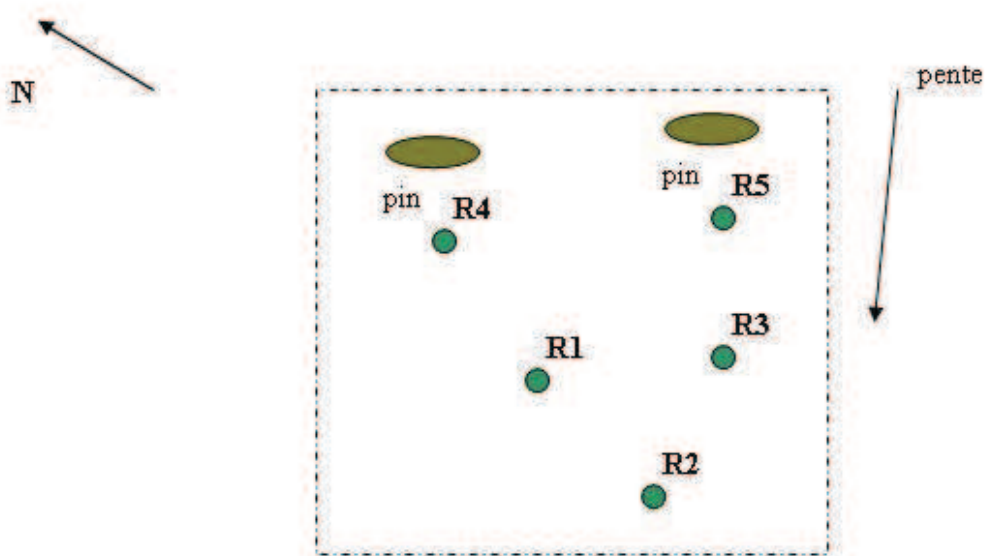
S3- R1 : romarin 1 N 43°14 075' et E 05°23 195'

S3- R2 : romarin 2 N 43°14 072' et E 05°23 193'

S3- R3 : romarin 3 N 43°14 077' et E 05°23 196'

S3- R4 : romarin 4 N 43°14 078' et E 05°23 197'

S3- R5 : romarin 5 N 43°14 074' et E 05°23 201'



Photographie du site S3

- **Site G0 :**

Pente environ 30%

Sommet de la crête versant nord-ouest.

Altitude moyenne : 135 m

Orientation : NNO

Pente moyenne (30%) et milieu ouvert.

Relevé GPS : G0 = N 43°13 582' et E 05°21 323'

5 romarins sélectionnés sur une zone de 10 × 10 m (en pointillé figure ci-dessous)

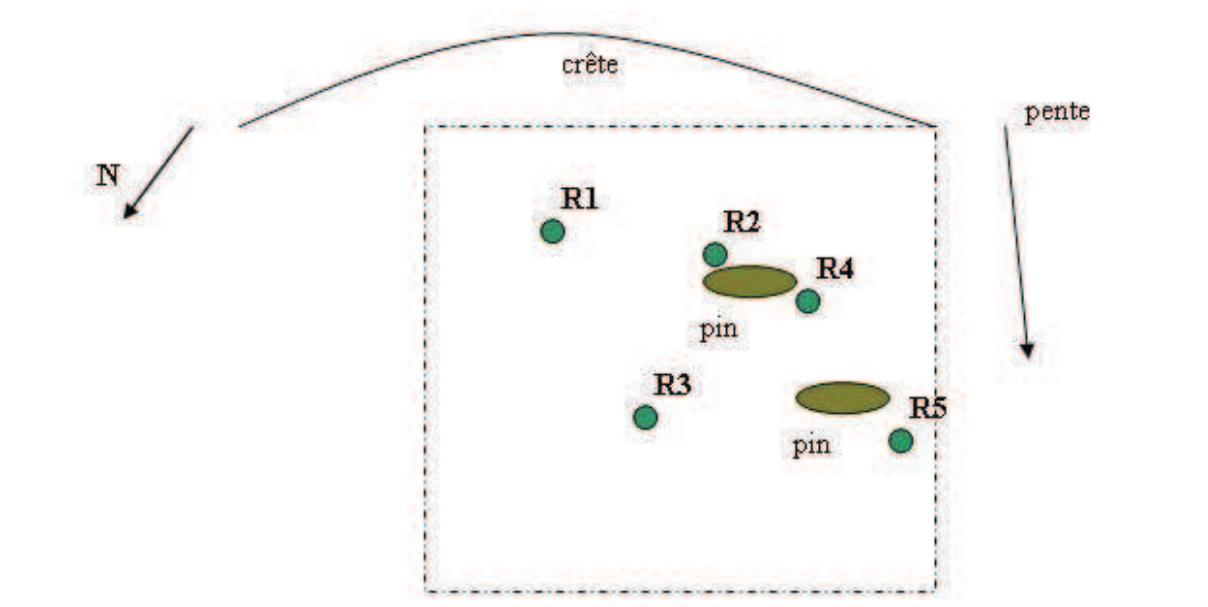
G0- R1 : romarin 1 N 43°13 583' et E 05°21 323'

G0- R2 : romarin 2 N 43°13 582' et E 05°21 320'

G0- R3 : romarin 3 N 43°13 583' et E 05°21 321'

G0- R4 : romarin 4 N 43°13 584' et E 05°21 321'

G0- R5 : romarin 5 N 43°13 585' et E 05°21 321'



Photographie du site G0.

Site G1 :

En aval dans le vallon de la Garenne, zone ouverte et proche de l'usine de l'Escalette

Altitude moyenne : 102 m

Orientation : NO

Pente faible (20%) et milieu très ouvert, plein soleil et milieu sec.

Relevé GPS : G1 = N 43°13 378' et E 05°21 221'

5 romarins sélectionnés sur une zone de 10 × 10 m (en pointillé figure ci-dessous)

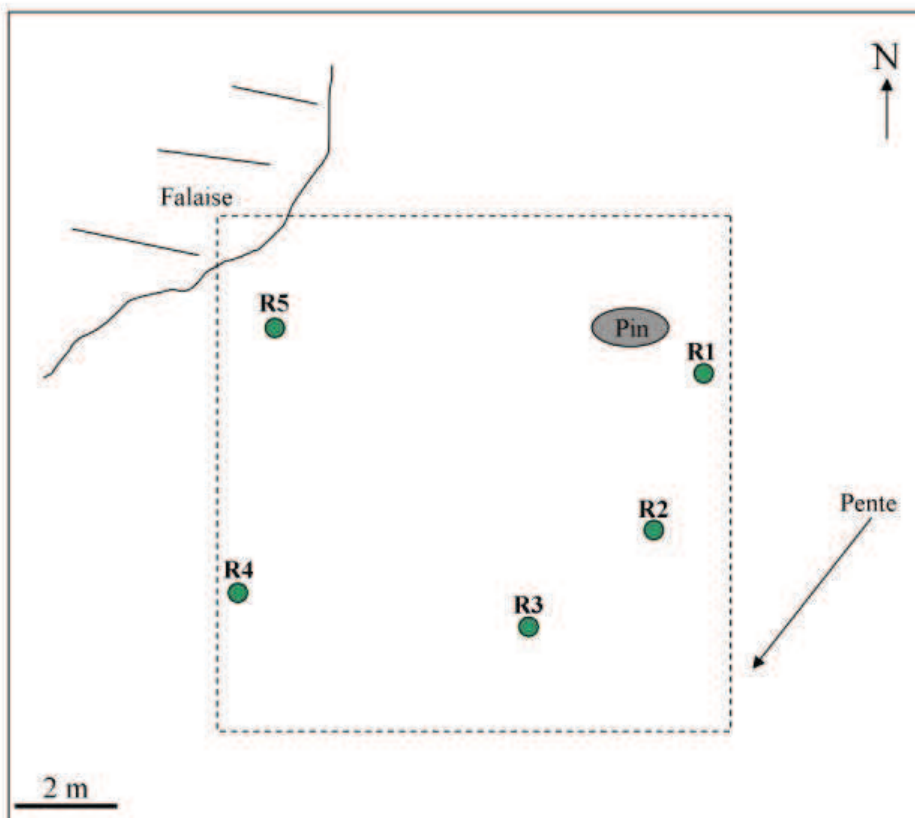
G1- R1 : romarin 1 (104 m) N 43°13378' et E 05°21224'

G1- R2 : romarin 2 (103 m) N 43°13378' et E 05°21219'

G1- R3 : romarin 3 (102 m) N 43°13380' et E 05°21222'

G1- R4 : romarin 4 (100 m) N 43°13382' et E 05°21217'

G1- R5 : romarin 5 (103 m) N 43°13383' et E 05°21218'



• Site G2:

Dans le vallon de la Garenne, au niveau du rétrécissement avant l'élévation vers le col de Moutte (en amont du virage du GR)

Altitude moyenne : 130 m

Orientation : NO

Pente forte (45%) et milieu peu ouvert, quelques pins, à la base de la falaise, beaucoup de sol.

Relevé GPS : G2 = N 43°13 394' et E 05°21 400'

5 romarins sélectionnés sur une zone de 10 × 10 m (en pointillé figure ci-dessous)

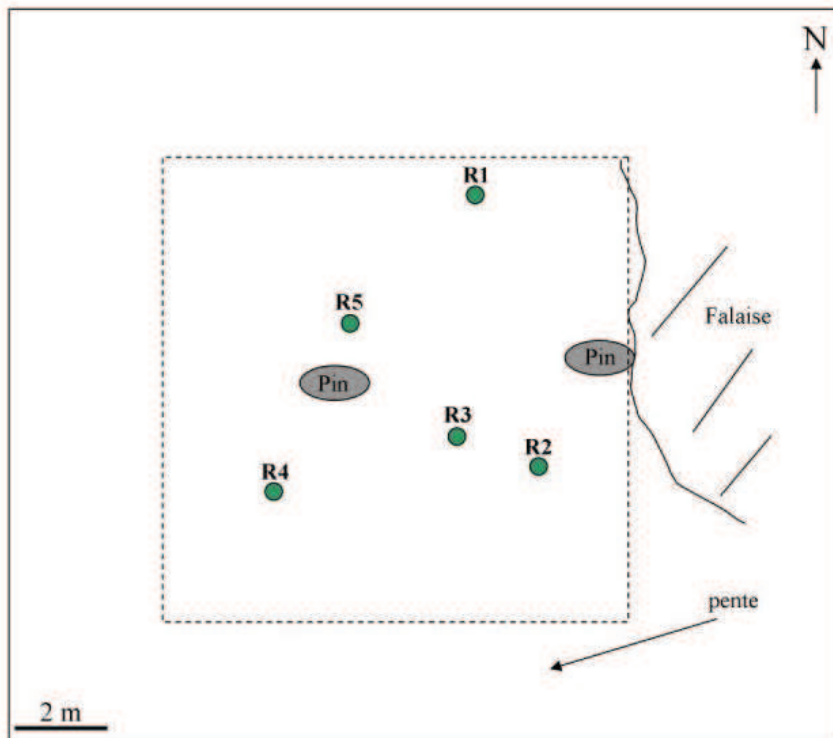
G2- R1 : romarin 1 (127 m) N 43°13398' et E 05°21399'

G2- R2 : romarin 2 (130 m) N 43°13398' et E 05°21398'

G2- R3 : romarin 3 (127 m) N 43°13395' et E 05°21395'

G2- R4 : romarin 4 (125 m) N 43°13398' et E 05°21390'

G2-R5 : romarin 5 (127 m) N 43°13395' et E 05°21394'



Site G3 :

Au sommet du vallon de la Garenne, proche et en contre-bas du col de Moutte.

Altitude moyenne : 240 m

Orientation : NNO

Pente forte (55%) et milieu ouvert, proche du pied de la falaise.

Relevé GPS : G3 = N 43°13 348' et E 05°21 539'

5 romarins sélectionnés sur une zone de 10 × 10 m (en pointillé, figure ci-dessous)

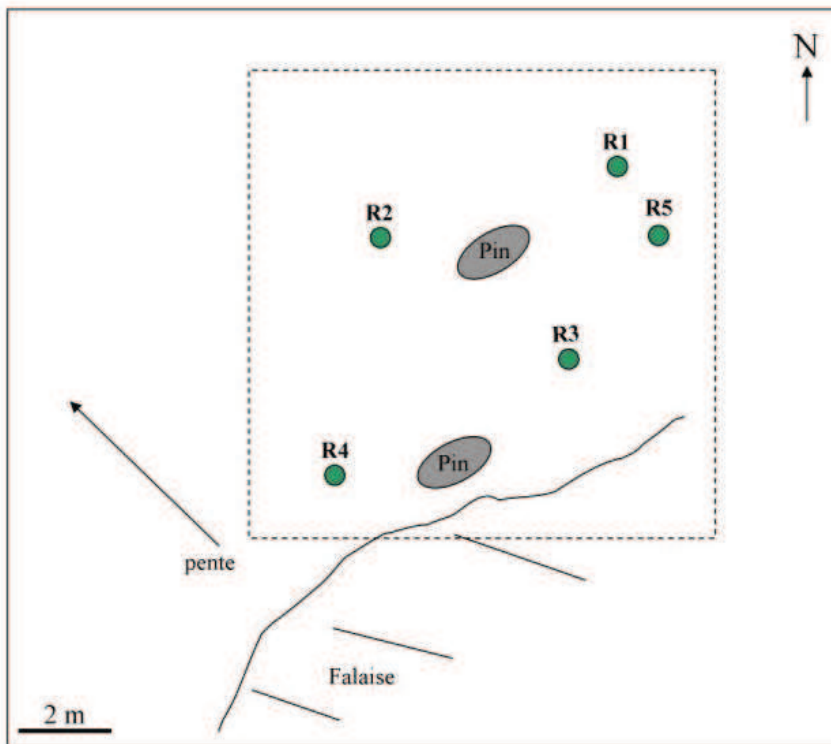
G3- R1 : romarin 1 (239 m) N 43°13350' et E 05°21538'

G3- R2 : romarin 2 (240 m) N 43°13350' et E 05°21533'

G3- R3 : romarin 3 (242 m) N 43°13347' et E 05°21536'

G3- R4 : romarin 4 (242 m) N 43°13346' et E 05°21528'

G3-R5 : romarin 5 (240 m) N 43°13349' et E 05°21539'



Photographie du site G3

Site G4 :

En surplomb du début du vallon de la Mounine, versant sud-est du pic de Marseilleveyre.

Altitude moyenne : 340 m

Orientation : SE

Pente assez forte (33%) et milieu ouvert, site quelques mètres en dessous du sentier rouge.

Relevé GPS : G4 = N 43°13 285' et E 05°22 175'

5 romarins sélectionnés sur une zone de 10 × 10 m (en pointillé figure ci-dessous)

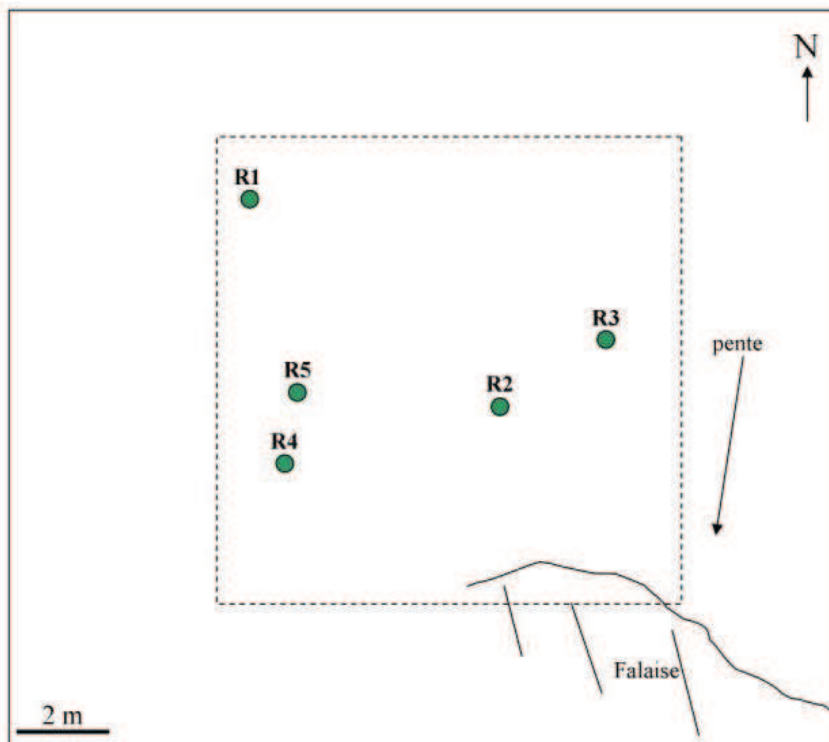
G4- R1 : romarin 1 (340 m) N 43°13284' et E 05°22170'

G4- R2 : romarin 2 (340 m) N 43°13285' et E 05°22175'

G4- R3 : romarin 3 (340 m) N 43°13289' et E 05°22176'

G4- R4 : romarin 4 (337 m) N 43°13280' et E 05°22174'

G4-R5 : romarin 5 (338 m) N 43°13284' et E 05°22175'



Photographie site G4.

• **Site G5 :**

Dans le vallon de la Mounine, en aval, près du littoral.

Altitude moyenne : 40 m

Orientation : NNO

Pente forte (45%) et milieu assez ouvert.

Relevé GPS : G5 = N 43°12 745' et E 05°21 997'

5 romarins sélectionnés sur une zone de 10 × 10 m (en pointillé figure ci-dessous)

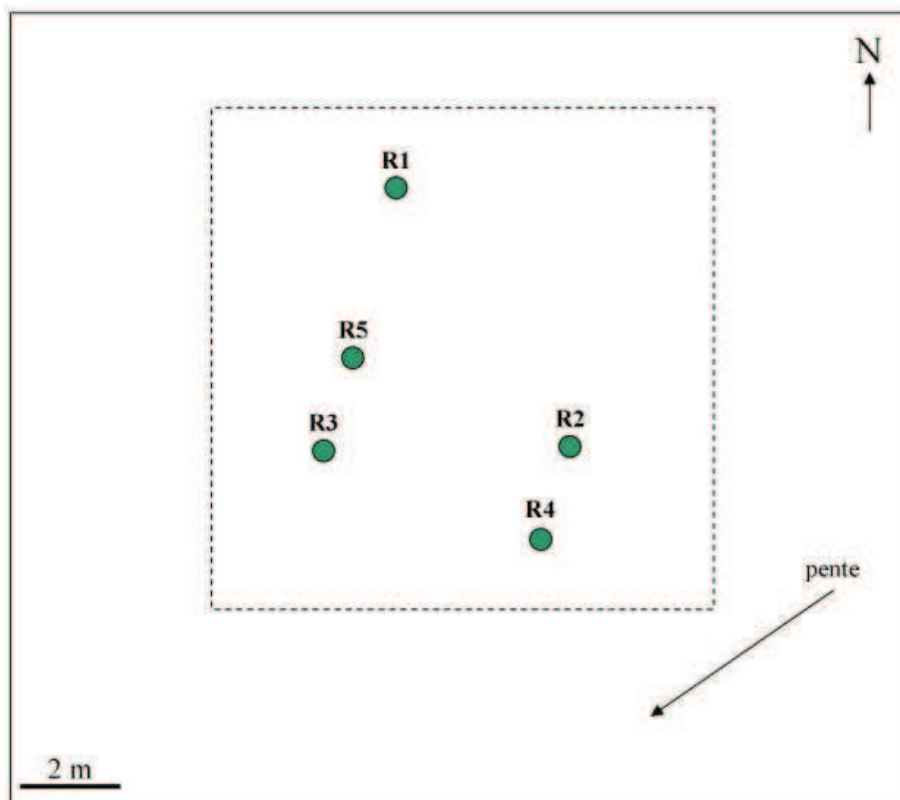
G5- R1 : romarin 1 (39 m) N 43°12741' et E 05°22001'

G5- R2 : romarin 2 (39 m) N 43°12740' et E 05°21998'

G5- R3 : romarin 3 (38 m) N 43°12743' et E 05°21997'

G5- R4 : romarin 4 (38 m) N 43°12741' et E 05°21994'

G5- R5 : romarin 5 (38 m) N 43°12741' et E 05°21995'



Site G6 :

Dans le vallon de SORMIOU, en aval près du littoral.

Altitude moyenne : 60 m

Orientation : SE

Pente moyenne (24%) et milieu ouvert (pas d'arbre).

Relevé GPS : G6 = 43°12-806' N - 05°24-966' E

5 romarins sélectionnés sur une zone de 10 × 10 m (en pointillé figure ci-dessous):

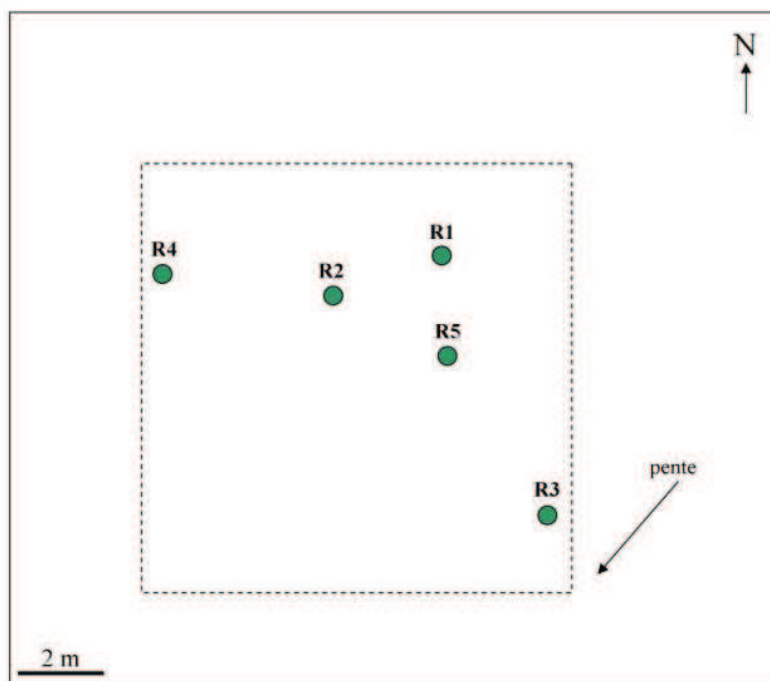
G6- Romarin R1 (62m) = Relevé GPS : 43°12-811' N - 05°24-959' E

G6- Romarin R2 (58m) = Relevé GPS : 43°12-807' N - 05°24-963' E

G6- Romarin R3 (57m) = Relevé GPS : 43°12-814' N - 05°24-970' E

G6- Romarin R4 (60m) = Relevé GPS : 43°12-803' N - 05°24-959' E

G6- Romarin R5 (59m) = Relevé GPS : 43°12-811' N - 05°21-963' E



Photographie Romarin R1 sur G6

Annexe 2 : concentration ($\mu\text{g/g}$) et pourcentage par rapport à la concentration pseudo-totale d'As, Pb et Zn extraits par différents extractants : eau, acide citrique, cystéine, glutathion réduit (GSH) et EDTA

Extractants	Eléments					
	As		Pb		Zn	
	Concentration ($\mu\text{g/g}$)	% ETMM pseudo-total	Concentration ($\mu\text{g/g}$)	% ETMM pseudo-total	Concentration ($\mu\text{g/g}$)	% ETMM pseudo-total
Eau	1,72	0,37	2,12	0,05	0,06	0,005
Acide citrique	1,66	0,36	3,12	0,07	<LQ	-
cystéine	1,74	0,38	4,94	0,11	5,14	0,40
GSH	1,28	0,28	2,68	0,06	5,22	0,41
EDTA	3,76	0,82	2224	50	371	29

Annexe 3a : limites de quantification en ICP-AES et GF-AAS des ETMM après minéralisation acide, extraits EDTA et Ca(NO₃)₂ des sols, en µg/L

ETMM	Minéralisation acide		Extraits EDTA		Extraits Ca(NO₃)₂	
	ICP-AES	GF-AAS	ICP-AES	GF-AAS	ICP-AES	GF-AAS
As	27,79	2,28	49,01	1,49		1,03
Cu	1,12		12,36		6,08	
Fe	16,88		12,78		10,82	
Mn	1,66		5,90		1,62	
Pb	34,38		37,59			0,15
Sb	34,51	2,66	30,90	1,30		1,36
Zn	3,25		12,87		1,64	

Annexe 3b : limites de quantification en ICP-AES et GF-AAS des ETMM après minéralisation acide des feuilles, tiges et racines de romarin, en µg/L

ETMM	ICP-AES	GF-AAS
As	33,90	0,80
Cu	3,01	
Fe	36,23	
Mn	1,45	
Pb	23,88	0,30
Sb	23,15	1,37
Zn	1,69	

Annexe 4 : Concentrations pseudo-totales moyennes±écart type (moy), valeurs minimales (min) et maximales (max) d'As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn en mg/kg dans les sols de tous les sites. De G0 à G6 : points du transect, S3 : référence

Sites		Eléments						
		As	Cu	Fe	Mn	Pb	Sb	Zn
G0	min	461	27,3	17107	515	4492	133	1278
	moy	1134±935	31,6±5,4	20640±2629	550±44	9210±6193	319±256	2723±1874
	max	2738	39,4	24070	610	19646	759	5843
G1	min	116	20,4	17078	556	858	37,6	328
	moy	306±156	39,5±16,1	24073±4293	660±97	3031±1835	112±61	1017±540
	max	517	60,9	28285	795	5437	190	1669
G2	min	379	34,4	21071	668	4163	118	974
	moy	949±543	39,6±4,6	23670±1596	723±51	8940±4475	284±158	2821±1802
	max	1560	60,9	28285	795	19646	759	5843
G3	min	89,1	15,4	19330	494	593	23,3	231
	moy	390±503	27,7±14,5	20513±1608	540±68	3445±4367	119±159	1523±2182
	max	1277	52,9	23339	660	11110	400	5397
G4	min	20,3	15,4	11848	426	593	9,1	231
	moy	53,1±37	33,1±7,0	15852±7226	525±243	605±250	10,5±4,2	295±87
	max	116	42,3	27080	885	896	15,4	382
G5	min	33,4	21,6	13244	362	278	8,1	186
	moy	53,3±14,2	32,8±11,2	21329±6546	559±152	480±247	9,6±2,8	293±115
	max	72,1	49,1	29993	749	867	14,5	473
G6	min	34,5	12,9	12682	355	37,4	1,7	70,1
	moy	48,1±9,9	17,0±2,8	21357±5505	490±87	62,0±15,0	4,0±3,1	100±18
	max	56,5	20,2	26987	574	73,0	9,4	119
S3	min	4,0	4,9	8140	264	21,4	1,5	45,6
	moy	4,9±0,7	7,5±2,7	10518±2183	330±54	42,9±17,3	3,1±1,8	66,0±23,3
	max	5,8	11,7	13266	407	65,9	5,9	102

Annexe 5 : Concentrations mobilisables moyennes±écart type (moy), valeurs minimales (min) et maximales (max) d'As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn en mg/kg dans les sols de tous les sites. De G0 à G6 : points du transect, S3 : référence

Sites		Eléments						
		As	Cu	Fe	Mn	Pb	Sb	Zn
G0	min	19,3	4,8	66,1	48,9	981	3,8	176
	moy	155±213	7,2±2,3	102±23	71,1±11,4	2631±2270	17,1±23,4	429±350
	max	523	8,9	128	83,1	6260	58,2	894
G1	min	7,82	9,7	45,2	35,1	603	1,6	63,9
	moy	27,6±22,6	13,6±5,3	72,8±23,9	50,9±13,3	1847±691	3,3±1,9	165±71
	max	67,0	21,8	100	77,7	2869	6,6	257
G2	min	19,3	8,9	36,1	30,7	1604	2,9	190
	moy	72,8±57,1	10,3±5,1	144±149	48,2±15,5	3522±2551	8,9±7,1	560±421
	max	135	17,0	387	67,2	6360	17,1	991
G3	min	1,0	3,1	27,1	19,0	260	0,22	32,8
	moy	26,2±45,7	7,7±4,6	58,0±42,1	36,9±20,7	1337±1565	3,1±5,4	309±411
	max	107	14,9	73,7	36,8	4067	12,7	1038
G4	min	0,29	4,7	29,9	43,1	162	0,07	44,1
	moy	0,28±0,23	5,5±2,7	68,9±56,1	62,7±31,1	180±91	0,13±5,4	56,0±38,5
	max	0,54	9,7	167	106	295	0,26	166
G5	min	0,04	3,2	38,2	38,0	84,1	0,06	0,07
	moy	0,37±0,32	6,0±3,6	63,7±48,5	61,4±23,5	182±179	0,10±0,08	53,0±63,7
	max	0,77	9,8	147	93,1	390	0,18	128
G6	min	0,01	1,9	22,0	29,6	7,5	0,01	5,9
	moy	0,24±0,21	2,3±0,8	69,7±56,8	44,5±4,0	13,9±5,6	0,07±0,05	11,1±9,1
	max	0,36	3,2	35,0	53,3	19,6	0,08	26,8
S3	min	0,24	1,4	67,0	40,0	8,3	0,04	5,4
	moy	0,56±0,30	2,6±0,9	106±28,9	44,9±4,1	18,5±8,0	0,07±0,02	14,3±7,3
	max	0,92	3,8	140	50,1	27,3	0,16	24,7

Annexe 6 : Concentrations échangeables moyennes±écart type (moy), valeurs minimales (min) et maximales (max) d'As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn en mg/kg dans les sols de tous les sites. De G0 à G6 : points du transect, S3 : référence

Sites		Eléments						
		As	Cu	Fe	Mn	Pb	Sb	Zn
G0	min	0,28	0,05	0,04	2,1	0,23	0,51	0,90
	moy	0,66±0,44	0,09±0,04	0,49±0,61	3,0±1,1	0,77±0,59	1,5±0,8	3,1±2,9
	max	1,4	0,14	1,5	4,3	1,5	2,8	6,4
G1	min	0,05	0,09	0,02	0,71	0,03	0,13	0,23
	moy	0,09±0,05	0,15±0,07	0,04±0,03	1,3±0,4	0,56±0,73	0,21±0,08	0,91±1,01
	max	0,17	0,27	0,08	1,7	1,8	0,34	2,6
G2	min	0,15	0,09	0,03	0,89	0,37	0,25	0,44
	moy	0,34±0,17	0,12±0,02	0,14±0,08	2,0±1,0	0,73±0,32	0,79±0,55	3,8±3,8
	max	0,57	0,14	0,23	3,7	1,0	1,6	10,0
G3	min	0,08	0,06	0,02	1,1	0,01	0,06	0,19
	moy	0,16±0,07	0,09±0,05	0,04±0,02	1,9±0,5	0,29±0,51	0,30±0,37	2,5±4,7
	max	0,26	0,17	0,07	2,3	1,2	0,92	10,8
G4	min	0,02	0,04	0,05	0,69	0,00	0,00	0,20
	moy	0,08±0,07	0,08±0,03	0,12±0,09	3,0±1,9	0,10±0,15	0,01±0,01	1,4±2,2
	max	0,18	0,11	0,27	5,5	0,35	0,03	5,3
G5	min	0,04	0,11	0,02	3,8	0,13	0,02	0,14
	moy	0,08±0,05	0,16±0,06	0,48±0,56	5,2±1,1	0,73±0,55	0,03±0,01	0,57±0,40
	max	0,16	0,25	1,4	6,3	1,6	0,05	1,2
G6	min	<LQ	0,04	0,01	1,11	<LQ	0,0005	0,07
	moy	0,009±0,016	0,06±0,01	0,06±0,03	2,3±1,1	0,0005±0,0011	0,003±0,003	0,20±0,14
	max	0,04	0,08	0,08	3,8	0,0027	0,006	0,40
S3	min	0,01	0,01	<LQ	0,46	0,003	0,003	<LQ
	moy	0,06±0,04	0,02±0,01	0,009±0,013	1,0±0,5	0,008±0,004	0,009±0,011	0,16±0,29
	max	0,11	0,03	0,03	1,48	0,01	0,03	0,67

Annexe 7 : concentrations moyennes±écart-type (moy), valeurs minimales et maximales en As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn dans les racines et les parties aériennes des romarins des sites étudiés (mg/kg MS). De G0 à G6 : points du transect, S3 : référence.

Sites	Éléments														
	As		Cu		Fe		Mn		Pb		Sb		Zn		
	Parties aériennes	racines	Parties aériennes	racines	Parties aériennes	racines	Parties aériennes	racines	Parties aériennes	racines	Parties aériennes	racines	Parties aériennes	racines	
G0	min	0,28	9,0	6,8	7,9	287	313	14,6	14,1	7,7	152	0,28	2,9	49,9	81,3
	moy	0,37±0,08	18,8±6,1	11,6±6,1	11,5±2,1	592±320	702±342	19,3±5,4	34,7±15,3	10,3±2,9	442±183	0,48±0,14	8,6±3,6	59,9±8,3	199±91
	max	0,48	24,1	21,9	13,4	1013	1059	25,8	52,8	14,5	607	0,67	12,7	69,2	317
G1	min	0,30	8,9	7,6	13,1	253	853	10,4	23,3	9,8	169	0,55	7,1	27,6	66,8
	moy	0,48±0,14	23,8±22,7	8,6±0,6	26,6±15,1	576±448	1562±1026	21,4±13,6	59,9±31,0	16,2±5,1	699±759	1,2±1,2	14,4±8,1	47,6±15,1	161±131
	max	0,67	63,1	9,2	48,1	1266	3341	42,9	108,2	22,8	1984	3,38	27,8	70,1	390
G2	min	0,20	23,6	8,0	5,1	191	591	11,8	27,2	2,8	412	0,15	9,0	36,1	136
	moy	0,26±0,06	49,2±27,3	8,9±0,7	15,7±6,7	291±112	1290±95	14,1±2,3	63,7±27,6	3,6±1,2	936±496	0,22±0,06	19,6±11,1	43,2±6,8	370±130
	max	0,32	84,9	10,0	21,6	479	2167	17,5	96,0	5,6	1560	0,30	34,4	54,4	803
G3	min	0,30	1,9	7,1	1,8	220	335	11,0	10,0	5,4	79,0	0,34	2,3	44,6	53,3
	moy	0,35±0,07	5,3±2,5	9,5±2,2	13,4±6,7	252±30	668±345	12,6±1,2	25,0±12,1	8,0±2,2	358±417	0,47±0,11	12,6±13,8	57,7±7,9	151±257
	max	0,47	9,0	13,0	18,6	284	1177	13,8	37,2	10,7	1041	0,65	35,4	65,9	400
G4	min	0,13	0,38	7,2	3,6	166	173	10,0	9,4	2,5	9,1	0,04	0,02	34,0	18,8
	moy	0,19±0,10	2,8±2,6	8,5±1,1	10,9±4,8	244±87	444±320	11,3±0,9	21,2±13,1	3,6±1,7	34,1±19,4	0,06±0,01	0,49±0,43	41,5±4,5	41,8±146,6
	max	0,37	6,8	10,0	15,2	348	988	12,4	42,7	6,6	56,2	0,07	1,1	46,4	65,5
G5	min	0,58	0,86	7,6	2,2	243	105	14,0	2,6	6,2	12,0	0,41	0,57	45,0	5,4
	moy	0,80±0,36	2,0±1,5	8,7±1,1	11,1±5,4	295±65	284±136	18,3±3,9	12,5±6,0	10,6±3,9	25,2±13,8	0,66±0,34	1,5±1,1	58,8±18,6	41,1±20,5
	max	1,4	4,6	10,2	15,6	408	453	23,5	18,1	16,6	47,1	1,2	3,3	90,2	57,3
G6	min	0,10	0,22	4,48	5,28	116	216	5,2	12,3	0,95	0,86	0,05	0,05	21,2	11,2
	moy	0,90±0,69	0,41±0,21	6,1±1,7	8,6±3,5	246±141	364±109	12,2±4,3	17,8±3,8	7,9±4,8	2,6±1,5	0,25±0,16	0,08±0,02	28,9±10,4	18,8±5,7
	max	1,9	0,76	8,9	14,1	476	506	16,4	22,1	12	4,4	0,48	0,11	47,1	24,7
S3	min	0,05	0,78	6,8	5,7	134	545	8,8	15,9	0,16	2,7	0,07	0,16	25,5	5,7
	moy	0,09±0,03	1,1±0,33	8,8±1,8	9,1±3,2	235±67	1141±541	10,9±1,6	30,6±13,8	0,58±0,37	10,1±6,5	0,09±0,02	0,38±0,21	37,0±10,9	16,2±8,7
	max	0,11	1,5	11,8	13,7	314	1755	12,9	46,2	0,98	17,3	0,11	0,69	53,0	25,6

Annexe 8 : concentrations moyennes±écart-type (moy), valeurs minimales et maximales en As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn dans les feuilles et les tiges des romarins des sites étudiés (mg/kg MS). De G0 à G6 : points du transect, S3 : référence

Sites	Éléments																		
	As			Cu			Fe			Mn			Pb			Sb			Zn
	tiges	feuilles		tiges	feuilles		tiges	feuilles		tiges	feuilles		tiges	feuilles		tiges	feuilles	tiges	feuilles
	min	0,28	0,21	6,6	7,0	503	149	15,1	15,9	2,6	0,18	0,34	27,6	60,5					
G0	moy	0,41±0,11	0,35±0,12	15,3±13,2	9,3±2,1	1066±603	296±191	17,9±2,5	20,3±5,1	4,1±1,6	0,34±0,11	0,56±0,16	35,0±5,9	75,4±13,2					
	max	0,58	0,54	38,5	11,6	1774	618	21,6	27,6	6,3	0,47	0,80	43,5	89,4					
	min	0,25	0,34	11,6	4,2	344	118	11,7	6,7	10,3	0,38	0,52	9,9	38,7					
G1	moy	0,49±0,22	0,47±0,12	13,1±2,0	5,7±1,3	1256±1187	151±32	15,9±3,0	13,2±8,3	18,0±4,7	2,1±3,3	0,69±0,19	33,6±16,6	56,4±14,2					
	max	0,75	0,63	16,6	7,0	3104	196	19,9	26,9	22,1	7,9	0,96	56,5	78,6					
	min	0,16	0,19	8,0	7,4	264	101	7,7	2,7	1,9	0,03	0,07	26,1	40,9					
G2	moy	0,26±0,12	0,26±0,08	9,6±1,1	8,5±1,1	471±201	177±73	16,8±4,1	4,9±2,6	2,8±0,7	0,23±0,25	0,22±0,12	32,6±7,9	49,8±12,8					
	max	0,46	0,37	10,5	10,0	771	296	23,6	9,1	3,6	0,56	0,38	45,5	72,1					
	min	0,25	0,29	9,1	5,8	329	138	12,7	3,4	4,9	0,26	0,40	20,2	59,9					
G3	moy	0,35±0,13	0,35±0,05	12,4±4,7	7,7±1,3	394±69	164±18	15,4±2,0	5,9±1,6	9,4±3,6	0,43±0,17	0,49±0,10	31,3±11,7	74,2±9,5					
	max	0,58	0,41	20,4	9,3	487	182	17,3	7,8	13,7	0,66	0,65	48,9	83,7					
	min	0,04	0,13	8,5	6,3	266	102	12,1	2,7	2,4	0,03	0,02	25,3	39,0					
G4	moy	0,10±0,05	0,25±0,15	9,7±1,4	7,8±1,7	386±129	155±71	13,6±0,9	3,3±0,6	3,8±2,5	0,04±0,01	0,08±0,03	29,0±3,5	49,4±6,2					
	max	0,17	0,50	11,9	10,7	579	256	14,5	4,2	8,1	0,07	0,10	32,7	55,0					
	min	0,46	0,59	7,3	6,4	380	99	14,3	5,6	6,6	0,29	0,48	21,5	43,8					
G5	moy	0,69±0,21	0,87±0,47	9,9±2,3	7,9±1,1	527±170	150±32	21,1±5,3	9,0±2,3	11,6±5,1	0,53±0,22	0,75±0,43	36,1±11,6	73,1±35,8					
	max	1,0	1,7	11,8	9,5	801	186	28,6	12,0	19,4	0,85	1,5	46,8	130,6					
	min	0,21	0,04	3,1	3,9	149	95	6,5	1,4	0,7	0,08	0,03	16,0	18,0					
G6	moy	1,30±1,47	0,64±0,51	7,1±3,0	5,5±1,3	349±165	181±136	14,6±5,9	10,8±7,6	6,1±4,5	0,41±0,30	0,16±0,09	32,5±15,6	26,6±10,5					
	max	3,9	1,3	11,1	7,5	567	419	20,9	18,7	12,1	0,90	0,28	57,4	40,6					
	min	0,05	0,05	5,9	7,4	114	120	8,5	0,04	0,23	0,08	0,05	17,3	30,7					
S3	moy	0,10±0,04	0,09±0,03	7,3±1,2	9,7±2,4	320±120	182±74	12,2±5,7	0,72±0,55	0,49±0,32	0,10±0,03	0,08±0,03	22,8±3,9	45,8±15,6					
	max	0,15	0,13	8,9	13,6	423	301	15,5	1,5	1,0	0,15	0,12	26,2	69,7					

Annexe 9 : article accepté dans Science of the total environnement en 2013-05-22

Affholder M-C, Prudent P, Masotti V, Coulomb B, Rabier J, Nguyen-The B, Laffont-Schwob I. Transfer of metals and metalloids from soil to shoots in wild rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) growing on a former lead smelter site: Human exposure risk. *Sci. Total Environ.* 2013;454–455:219–29.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

Transfer of metals and metalloids from soil to shoots in wild rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) growing on a former lead smelter site: Human exposure risk

Marie-Cécile Affholder^{a,*}, Pascale Prudent^a, Véronique Masotti^b, Bruno Coulomb^a, Jacques Rabier^b, Bénédicte Nguyen-The^{c,d}, Isabelle Laffont-Schwob^b

^a Aix-Marseille Université, CNRS, LCE, FRE 3416, 3 pl. Victor Hugo, case 29, 13331 Marseille, France

^b Aix-Marseille Université, CNRS, IMBE, UMR 7263/IRD 237, 3 pl. Victor Hugo, case 4, 13331 Marseille, France

^c Montpellier Supagro, UMR MISTEA, 2 pl. Pierre Viala, bat. 29, 34060 Montpellier CEDEX 2, France

^d INRA, UMR 0729 MISTEA, 2 pl. Pierre Viala, 34060 Montpellier CEDEX 2, France

HIGHLIGHTS

- Metal & metalloid contamination of soils & plants from a former smelting factory.
- Low metal and metalloid transfer from soil to rosemary edible aerial parts.
- Low contaminants transfer into herbal tea, below drinking water regulation level.
- Restricted health risk associated with ingestion of contaminated rosemary.
- More antioxidant compounds in essential oils obtained from contaminated rosemary.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 November 2012

Received in revised form 24 February 2013

Accepted 25 February 2013

Available online xxx

Keywords:

Aromatic plant

Essential oils

Health risk

Herbal tea

Trace elements mixed contamination

ABSTRACT

This study aimed at estimating exposition risks to wild rosemary used as herbs in the contaminated area of the former smelting factory of L'Escalette (South of Marseille, France). Metals and metalloids *i.e.* Pb, As, Sb, Zn, and Cu concentrations were analyzed in soils and in rosemary aerial parts (stems and leaves) on two sites: one heavily contaminated and the other far away from the pollution source, considered as reference. The metal and metalloid transfer into water during the brewing process of herbal tea was also determined. A mixed contamination by the above-cited contaminants was demonstrated in soils of the factory site, with average concentrations of 9253, 1127, 309, 2698 and 32 mg/kg for Pb, As, Sb, Zn and Cu, respectively. However, metals and metalloids' transfer in rosemary aerial parts was limited, as bioaccumulation factors were under 1. Thus, Pb, As and Cu concentrations in leaves were below international regulation limits concerning ingestion of medicinal herbs (no regulation values available for Sb and Zn). This study highlighted that, if contaminated rosemary leaves were ingested, health risks may be limited since acceptable daily intake (ADI) for Pb, As, Sb and Cu (no ADI value available for Zn) will only be reached if very high quantities are consumed. Furthermore, we aimed to establish if this mixed contamination could alter rosemary's essential oil quality, and thereby the compositions of essential oils obtained from individuals on the heavily contaminated soil were compared to those obtained from the reference population. An increased biosynthesis of antioxidant compounds was favored in essential oils from rosemary individuals growing in contaminated site. Although the health risk of a long-term exposition of low level of the mixed contamination by rosemary ingestion is not easy to elucidate, the use of rosemary essential oils from contaminated site appears as safe.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Rosmarinus officinalis L., known as rosemary, is a perennial plant species, growing wild in the Mediterranean Basin (Zaouli et al., 2003). Due to its antibacterial and antioxidant activities, rosemary essential oils are widely used in pharmaceutical, cosmetic and food industry (Al-Sereitia et al., 1999; Cheung, 2007). Moreover, Mediterranean people commonly use it for cooking as herb, as well as herbal tea and some of them use its essential oil for therapeutic treatments amongst antispasmodic, diuretic

* Corresponding author at: Université Aix-Marseille, CNRS, Laboratoire de Chimie de l'Environnement (FRE 3416), Equipe: Développement Métrologique et Chimie des Milieux (DMCM), 3 place Victor Hugo, case 29, 13331 Marseille CEDEX 3, France. Tel.: +33 4 13 55 10 36; fax: +33 4 13 55 10 60.

E-mail addresses: marie-cecile.affholder@univ-amu.fr (M.-C. Affholder), pascale.prudent@univ-amu.fr (P. Prudent), veronique.masotti@imbe.fr (V. Masotti), bruno.coulomb@univ-amu.fr (B. Coulomb), jacques.rabier@imbe.fr (J. Rabier), benedicte.fonze@supagro.inra.fr (B. Nguyen-The), isabelle.laffont-schwob@imbe.fr (I. Laffont-Schwob).

and choleric activities (Lopez-Munoz et al., 2006). During the middle age, rosemary was thought to possess magical properties. Indeed, in the 14th century, this plant was recorded to be one of the principal components of the Queen of Hungary water formula, thought to maintain the youthful appearance far beyond the normal span of time (Sullivan, 1994).

In Provence (South-East of France), people harvest aromatic herbs and particularly, rosemary, directly from the countryside, and prepare many meals with them. In fact, rosemary is in part involved in the “French paradox” phenomenon of healthy food (Kaloustian et al., 2000) owing to its richness in phenolic compounds. Rosemary essential oil is also commonly used in food enhancement (Boskou, 2006). However, in this geographical area, past industrial activities of the XIXth century lead to many ruins and polluted wastelands that were surrounded by matorrals and/or on which a spontaneous re-colonization by the typical vegetation of matorrals occurred.

In the peri-urban area of the French Mediterranean city of Marseille, in the enclosure of the National Park of Calanques (south of Marseille), the former smelting factory of L'Escalette converting galena into lead and silver is a typical example of the current incidence of past industrial activity (referenced in the French database of polluted soils BASOL, 2006). Heavy metals and metalloids (MM) from this industrial activity were detected all over the Marseillevyre hills (Laffont-Schwob et al., 2011; Testiati et al., 2013). In 1925, the silver–lead ore smelting activities ceased. It has been evaluated that many thousands of m³ of slag heaps and rubbles are still present in the valley of L'Escalette but it is difficult to assess the extent of pollution dispersed all around the industrial site. However, this area is inhabited and these pollutants may cause health risk to humans (Lasalle, 2007). Several wild native plant species, including rosemary, have colonized the contaminated industrial site and the surrounding area.

Previous studies evidenced MM transfer to the aerial parts of rosemary (Cala et al., 2005; Abdul-Wahab et al., 2008; Sekeroglu et al., 2008). Thus, consumption of edible parts contaminated by these toxic elements may induce a risk for human health. Translocation of heavy metals from soil to aerial parts of rosemary, particularly in the case of mixed pollution as in L'Escalette surroundings, has to be evaluated depending on soil contamination. Previous studies highlighted that no transfer of heavy metals was observed in essential oils obtained by steam distillation of various plant species (Zheljzkov et al., 2006, 2008a, 2008b). Thus, an interesting alternative of using rosemary from the contaminated area without health risk could be the use of its essential oil. Furthermore, rosemary essential oil composition, and also its antioxidant properties, are linked to soil characteristics (Ormeno et al., 2008) and plant development stages (Del Bano et al., 2003), so the possible alteration of the chemical composition of the essential oil needs to be investigated.

This study aimed at determining exposition risks for the local population picking rosemary for cooking and herbal tea consumption in the contaminated area of L'Escalette. Furthermore, it aimed at highlighting if MM contamination could alter rosemary essential oil quality by repressing or enhancing some compound biosynthesis. Therefore, we first analyzed MM transfer from a representative heavily contaminated soil to the aerial part of rosemary *in natura* as well as their transfer into water during brewing process and compared it to a population growing far away from the pollution source, considered as reference. Secondly, compositions of essential oils obtained from plant grown on the heavily contaminated soil were compared to those obtained from the reference population.

2. Material and Methods

2.1. Study Area

Two sites were selected for this study so that they have very similar soil composition, vegetation and climatic conditions. These sites, located in the peri-urban area of Marseille, in South-East France, were

characterized by a matorral vegetation dominated by *Rosmarinus officinalis*, *Cistus albidus*, *Quercus coccifera* and *Pistacia lentiscus* under Mediterranean climatic conditions. The site A (43°13.583' N; 5°21.322' E), so called “polluted site”, was located in the vicinity of the former factory of L'Escalette (close to the chimney exit) and the site B (43°14.075' N; 5°23.197' E), in the suburban area of Marseille, in the never industrialized part of the Calanques hills, so called “reference site” (Fig. 1). Activities at L'Escalette lasted from 1851 to 1925 and during this period around 30,000 t/year of silver–galena were treated by pyrometallurgical processes. The factory, situated at the lower part of a hill, is characterized by a horizontal chimney (creeping chimney) built up on the hillside. Slags have been deposited on the factory site or nearby. The climate is characteristic of the Mediterranean areas with average minimal and maximal temperatures of 7.1 and 24.1 °C, respectively, and an annual average rainfall of 554 mm during 56 days (reference period: 1971–2000). Dominant winds are North and North-East and can reach 120 km/h. The geological substrate is limestone and bare rocks dominate. The soils of selected sites were stony; their thicknesses varied from place to place, but were generally less than 50 cm. Soils were alkaline with pH (ISO 10390, 2005) between 7.7 and 8.2, belonging to the typical pH range of soils from calcareous areas (Fernández-Ugalde et al., 2011). Soil fertility was low with total organic carbon contents varying from 3 to 7%, total Kjeldahl nitrogen (ISO 11261, 1995) contents from 3 to 7 mg N/g, assimilable phosphorous contents (ISO 11263, 1995) from 0.01 to 0.04 mg P/g, a cation exchange capacity (CEC, ISO 23470, 2007) varying from 15 to 30 cmol⁺/kg, and clay contents varying from 10 to 27%. The soils collected in site A presented CEC and clay contents in the top part of the range of values measured in the Calanques hills area, and the soils collected in site B were in the middle range.

2.2. Plant and Soil Sampling

Sample collection was done on five rosemary individuals of a same population on each site. In order to obtain representative samples of each site, an area of 100 m² (10 × 10 m) was delimited on each site. The plant cover in both sites was over 60% on the selected areas, *R. officinalis* populations corresponded to 15 to 20 old and large individuals. The 5 rosemary individuals were selected according to a cross pattern inside the delimited area, spaced by around 2 m, with similar sizes, i.e. heights and collar diameters, and same phenological stage. Therefore, on each site, a total of 5 plant/soil couples were taken. Stems and leaves were collected for metals and metalloids (MM) and for essential oil analyses. Soil samples were collected from the top 15 cm (after removal of the litter) in the rhizospheric area of the plants. Fresh plant and soil samples were stored in clean plastic bags for transport.

2.3. Soil MM Analysis

Soil samples were sieved on site to 2 mm mesh, air-dried at room temperature and then ground (RETSCH zm 1000 with tungsten blades) to pass through a 0.2 mm titanium sieve before analyses. Soils were mineralized in a microwave mineralizer (Milestone Start D) using *aqua regia* (1/3 HNO₃ + 2/3 HCl). The mineralization products were filtered with a 0.45 μm mesh and the metal levels were determined by ICP-AES (Jobin Yvon Horiba, Spectra 2000) for Zn, Cu, Fe, Mn and Pb (Lotmani et al., 2011), and by graphite furnace AAS (Thermo Scientific ICE 3000) for As and Sb. Quality assurance–quality controls and accuracy were checked using standard soil reference materials (CRM 049–050, from RTC-USA) with accuracies within 100 ± 10%.

2.4. Plant MM Analysis

Rosemary stems and leaves were washed separately with Milli-Q water to remove possible attached particles. All samples were dried at 40 °C during one week and then ground at 0.2 mm (RETSCH zm 1000

blender). About 0.5 g of dry matter was digested with the microwave digestion system Milestone Start D with a HNO₃–HCl mixture (volume proportion ratio 2/1). Extracts were analyzed for Cu, Pb, Zn contents by ICP-AES, and for As and Sb by graphite furnace AAS (Rabier et al., 2007). Standard plant reference materials (DC 73349) from China National Analysis Center for Iron and Steel (NCS) were analyzed as a part of the quality assurance–quality control protocol (accuracies within 100 ± 10%). Bioaccumulation factors (BAFs), i.e. ratios of shoot concentration vs. soil concentration, were calculated.

2.5. Hydrodistillation and Essential Oil Analysis

2.5.1. Isolation of the Essential Oils

Oil samples were isolated from freshly air-dried (room temperature) leaves, by hydrodistillation for 2 h using a Clevenger-type apparatus as previously described (Schwob et al., 2004). For each plant, a separate essential oil (EO) sample was obtained, i.e. five EO per population. EO yields were then estimated on the basis of the dry weight of plant material.

2.5.2. Chemical Analysis of the Essential Oils

2.5.2.1. Gas Chromatography (GC). GC analyses of the EO were performed on a GC instrument (Varian, model 3900GC) with a flame ionization detector (FID), equipped with a CP SIL 8CB fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm film thickness). Oven temperature was programmed from 50°–200 °C at 3 °C/min, after an isothermal step at 50 °C for 2 min. The carrier gas was hydrogen, with a flow rate of 0.5 mL/min. Split–splitless injector and detector were heated to 220 °C and 230 °C, respectively. Essential oil solutions in n-pentane (5%) were injected in split mode (1:30).

2.5.2.2. Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry. GC/MS analyses were also carried out on a GC/MS Hewlett-Packard (Model 5972) chromatograph equipped with a DB5 fused silica capillary column (25 m × 0.2 mm, film thickness 0.25 μm) coupled with a quadrupole mass spectrometer. Temperature program was 3 °C/min from 60 to 220 °C. Split–splitless injector and detector were heated to 220 °C and 270 °C, respectively. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The instrument was operated under electronic impact ionization with 70 eV as ionizing energy. Total ion current (TIC) data were collected with a scan time of 0.1 s over a mass range of 38 to 400 Da.

2.5.3. Identification of Components

Individual components were identified by comparison of both mass spectra and GC retention data with those of authentic compounds previously analyzed and stored in the data system (computer matching with the NBS 98K and WILEY 275 libraries). Other identifications were made by comparison of mass spectra with those in the data system libraries and cited in the literature (Adams, 2001). The retention indices were calculated for all volatile constituents using a *n*-alkanes homologous series (Jennings and Shibamoto, 1980).

2.6. Herbal Tea

Herbal teas were prepared according to common consumer practices. Therefore, floral heads were collected on each rosemary individual, rinsed with tap water and then oven-dried at 35 °C during 3 days. Stems were removed to only keep the leaves. Volume prepared was 250 mL herbal tea for each rosemary sample, with a concentration of 50 g dry leaves/L. Infusions were made with a low mineralized natural spring water (pH: 5.85, dry residue: 25 mg/L). Boiling water was added to the leaves and brewed during 15 min. Leaves were then removed, and herbal tea filtered at 0.45 μm. Solutions obtained were

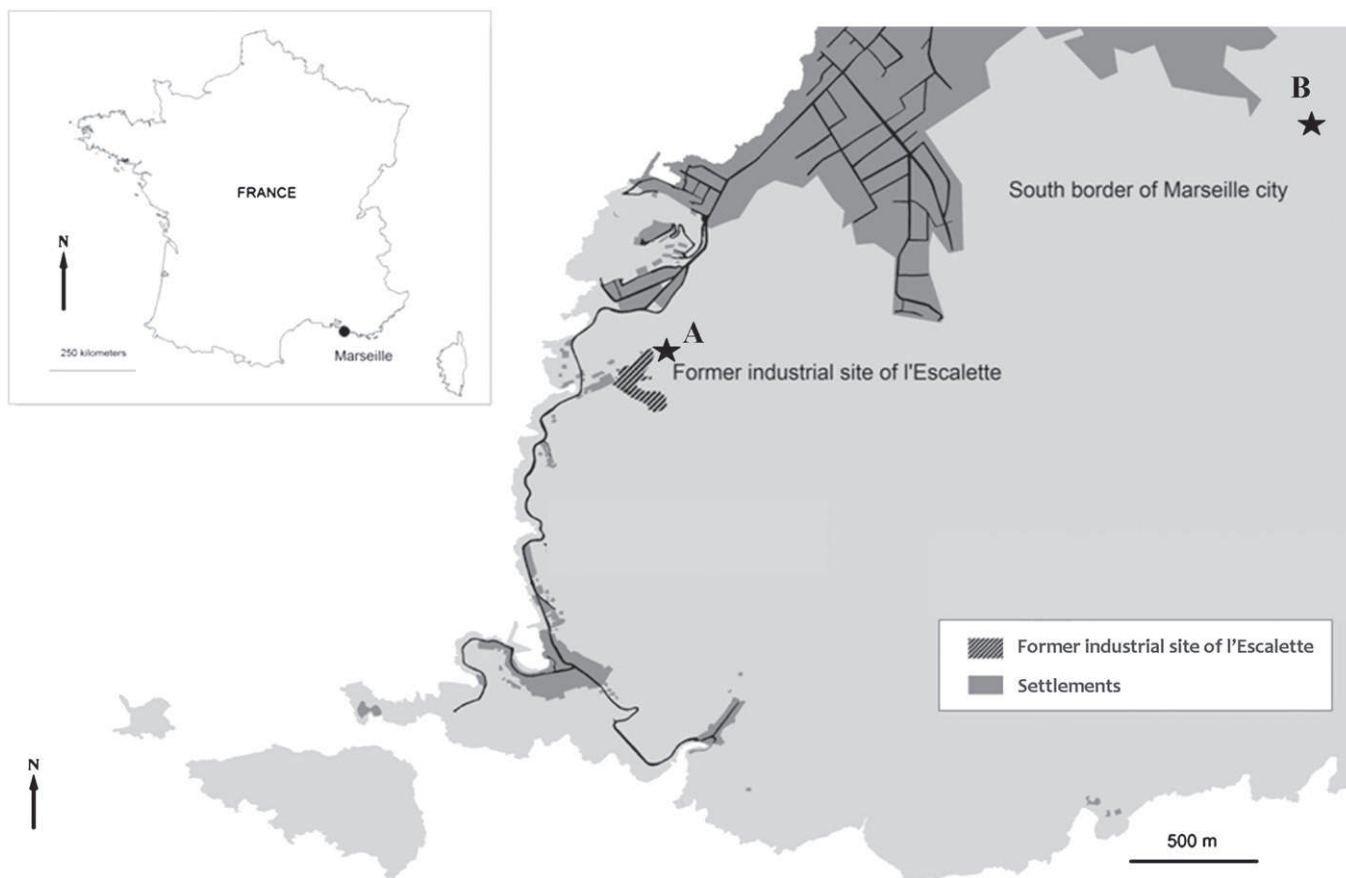


Fig. 1. Localization map of the studied sites (A: contaminated site and B: reference site).

then acidified at pH 4 with HNO₃ (Supra-pur) and stored at 4 °C until analysis. MM were measured by ICP-AES for Cu and Zn, and by GF-AAS for As, Pb and Sb.

2.7. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with R. A rank based Wilks' lambda statistic was used as proposed by Nath and Pavur (1985) to test the equality of the group means of A and B soil properties, soil MM concentrations, shoot bioaccumulation, herbal tea MM concentrations and average chemical composition of essential oils (function Wilks' test, package rr covrank). Heterogeneous covariance matrices were observed between the two groups, but as stated by Finch (2005), "early research found that when the groups did not differ in size, the effect of heterogeneous covariances is very small". A two factor Manova, with a label permutation test, was performed (Manly, 1997) to test interaction and simple effects on MM concentrations from populations (A and B) and from organs of rosemary (leaves and stems). Post hoc mean comparisons were carried out with nonparametric test, Wilcoxon, using Bonferroni correction.

To study the links of MM concentration table with the composition of essential oil table, a co-inertia analysis (Dray et al., 2003) was performed with package Ade4. This analysis consists of two separates PCA (one for each table). The first principal component axis of each PCA is then rotated so that the covariance between the two sets of projected scores is maximal, and so on. In addition, the RV coefficient (Robert and Escoufier, 1976) was used to measure the closeness between the MM concentrations and the composition of essential oil data matrix. This coefficient is a multivariate generalization of the squared Pearson correlation coefficient. The permutation test of association between configurations by means of the RV coefficient suggested by Heo and Gabriel (1997), available from package Ade4, was conducted with $n = 10,000$ permutations.

3. Results and Discussion

3.1. MM in Soils and Rosemary

MM concentrations were significantly higher in soil samples collected in site A compared to B (Table 1) despite the high heterogeneity observed between the soil samples from a same site, especially at the contaminated site, located near the creeping chimney exit. These observations concerned particularly some elements such as As, Pb, Sb and Zn. Indeed, relative standard deviations (RSD %) exceeded 50% for the contaminated soil samples analyzed. This is typical of anthropogenic contamination and particularly contamination with atmospheric deposit from industrial activities (Yaylali-Abanuz, 2011; Testiati et al., 2013). Contamination relative to the former smelting factory of L'Escalette concerned especially xenobiotics elements such as As, Pb and Sb for which the ratios of A to B concentrations were higher than 200. Soil concentration ratio between site A and B was about 50 for Zn and stays under 5 for Cu, Fe and Mn. The presence of these MM in site A could be linked to the composition of silver-galena ores treated in the former factory, which contain high levels of Pb, Fe, Zn, Sb and As (Palero-Fernandez and Martin-Izard, 2005). Thus oligo-element (Zn and Cu) and soil major element (Fe and Mn) variation was less important. No information are available on the MM natural geological background of the studied areas, but, a mapping of element concentrations in an extended area around the factory site was conducted. This zone was divided into 250 squares all over the Marseilleveyre hills, with a mesh size of 250 × 250 m each. On the center of each square, a top-soil sample (0-15 cm depth) was collected from a mesh size of 1 m². For all these 250 samples, MM contents were determined with a portable X-ray fluorescence spectrometer (Niton XLT 792, Fondis electronic). The numerous data obtained were compiled into a database, and their analyses lead to an estimation of the local contamination background level by comparing the 1st percentiles 0.05 ($n = 250$) that are of <50, <10, 40, <50 and 53 mg/kg for As, Cu, Pb, Sb and Zn, respectively. Results clearly evidenced high contamination

Table 1

Average MM concentrations (mg/kg) in soil samples from each site (A: contaminated site and B: reference site).

Element type	Element concentrations (mg/kg) in each site	
	Site A	Site B
As	1127 ± 836 a	5 ± 2 b
Cu	32 ± 5 a	7 ± 3 b
Fe	20,204 ± 2582 a	10,486 ± 1954 b
Mn	551 ± 39 a	340 ± 54 b
Pb	9253 ± 5540 a	41 ± 17 b
Sb	309 ± 230 a	1.5 ± 0.5 b
Zn	2698 ± 1677 a	55 ± 22 b

Means (± standard deviation) followed by different letters in the same line are significantly different (Wilcoxon test, $\alpha = 0.05$, $m = 7$, Bonferroni: significant p -value < 0.007) after a one-way MANOVA: rank Wilks' lambda = 0.0163, Chi2-value = 18.519, DF = 7, p -value = 0.0098.

of the site A, and this, for every element analyzed. Concentration values for these same MM were below the estimated background level in the site B, confirming its legitimacy as reference soil. To our knowledge, only few guidelines concerning soil contamination are available, but these concentrations could also be compared to some National thresholds for heavy metals and to the predictable non-effect concentration (PNEC) values for soils (Table 2). No values are available for Sb. The reference soil MM concentrations were below National thresholds, but some of them were above PNEC values. For the site A, only copper values are below the National threshold. Moreover, the high contamination was again highlighted with concentration ratios between the site A and PNEC values higher than 500, 700, 100 and 10 for As, Pb, Zn and Cu, respectively.

Fig. 2 shows MM results in rosemary stems and leaves for each area. Only oligo-elements and xenobiotic absorptions by rosemary are discussed in this paper. The MANOVA global test indicated no significant interaction or organ (stem, leaf) effects. Only the site effect was significant (p -value < 10⁻³). A high heterogeneity was observed between stems and leaves from the site A notably for As, Pb and Sb for which some high and low outlier values were highlighted. Rosemary leaves being used for culinary and medicinal purposes, it was important to check if MM concentrations in these plant parts from field were below the food regulation level. Only few regulations exist concerning rosemary use as herbs and we refer to the National limits (WHO, 2007) and the European Pharmacopoeia (Herbal drugs monograph, 2008) concerning toxic metals in herbal products for As, Pb and Cu only. Proposed limits are 5 mg/kg for As (Canada, Malaysia and Singapore) (WHO, 2007) and Pb (Herbal drugs monograph, 2008) and 150 mg/kg for Cu (Singapore).

Concerning As contamination, only stems showed a significant difference depending on the site. For Cu, stems' and leaves' results showed no significant differences between concentrations in rosemary individuals

Table 2

Russian (from a neutral soil i.e. pH > 5.5), Netherlands (as reference value), Canadian (from an industrial zone) and Turkish thresholds for MM in soils and PNEC values expressed in mg/kg (dry soil).

Elements	Concentrations of elements in soil (mg/kg dry soil) from different sources				
	Russian ¹	Netherland ¹	Canadian ¹	Turkey ²	PNEC ³
As	10	20	50	-	1.8
Cu	-	-	-	140	12
Pb	-	-	-	300	21
Sb	-	-	-	-	-
Zn	220	-	800	300	2.7

¹ Komnitsas and Modis (2006, 2009).

² Yenilmez et al. (2011).

³ INERIS (2010, 2005a, 2005b, 2003).

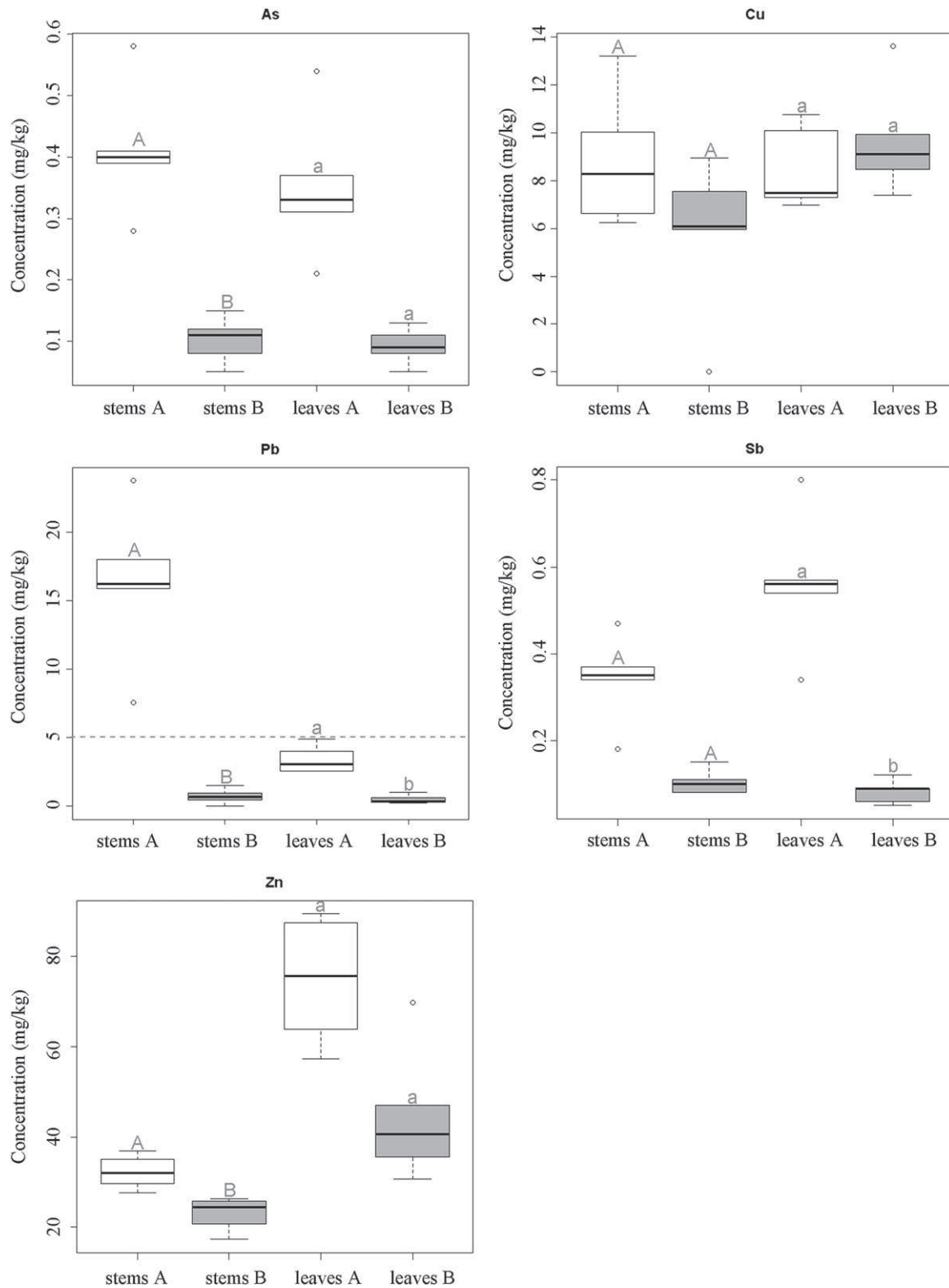


Fig. 2. Concentrations (mg/kg) of As, Cu, Pb, Sb, Zn in different organs of rosemary (leaves and stems) for each site (A in blank, contaminated site; and B in gray, reference site). Two-way MANOVA: simulated p-values for interaction = 0.146, organ = 0.056, population <math> < 10^{-3}</math>. Statistical significant difference (Wilcoxon test; $\alpha = 0.05$, $m = 10$, Bonferroni: significant p-value < 0.005) is represented by different letters above each boxplot (capitals for stems and lower-case letter for leaves). Dotted line represents regulation limit for Pb, not represented for As (5 mg/kg) and Cu (150 mg/kg) since values are not in the scale interval.

from A and B, this could be explained by the low level of Cu soil content and because Cu is an essential element to plants. For both latter elements, all the concentration results in leaves of rosemary individuals collected in the contaminated site were largely below the permissible limits.

Concerning Pb, for both plant parts, concentrations were significantly higher in rosemary from site A compared to site B. Pb concentrations in stems from rosemary individuals collected in site A reached a mean of around 16 mg/kg. However, this element was less concentrated in the corresponding leaves, i.e. the mean value was about 3.5 mg/kg, with a

maximum reaching 4.9 mg/kg. This latter value was close to the European pharmacopoeia (Herbal drugs monograph, 2008) limits concerning Pb i.e. 5 mg/kg in herbal products. Moreover, concentrations measured in all the stems from rosemary individuals collected in the site A were over this permissible limit. Thus, Pb exposure risk for the local population collecting rosemary growing around the smelter factory seemed low,

with the advice to use leaves without stems. Sb concentrations in leaves collected in individuals from the site A were higher than those from the non-contaminated reference site. No significant difference was highlighted concerning stems' concentrations. For Zn, results showed concentrations significantly higher in stems from rosemary grown wild on the site A compared to those on the site B, while concentrations in leaves

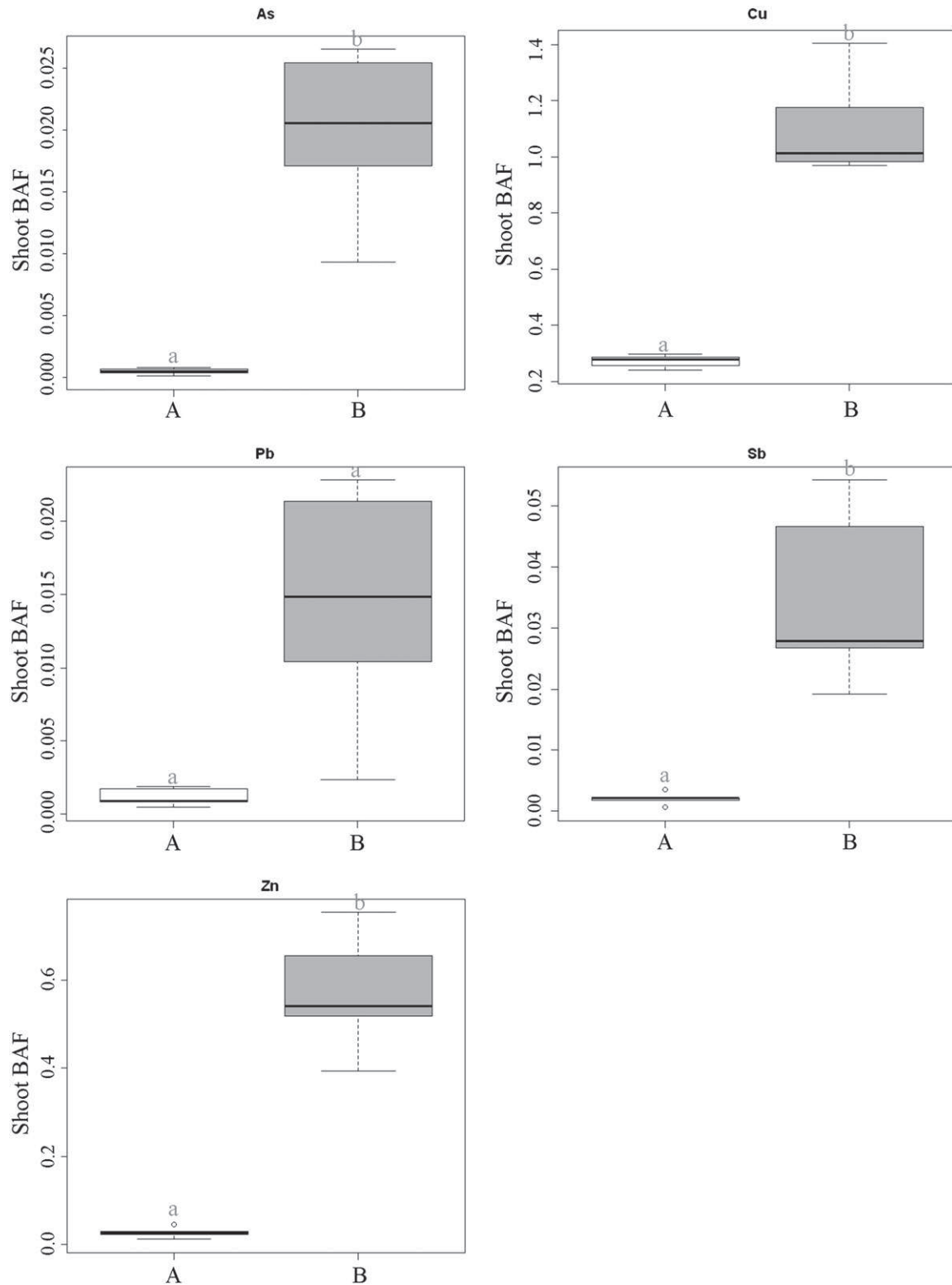


Fig. 3. Rosemary shoot bioaccumulation factors for As, Cu, Pb, Sb and Zn on each location (A in blank, contaminated site; and B in grey, reference site). One-way MANOVA: rank Wilks' lambda = 0.044, Chi2-value = 17.179, DF = 5, p-value = 0.004172. Significant difference (Wilcoxon test; $\alpha = 0.05$, $m = 5$, Bonferroni: significant p-value < 0.01) is represented by different letters above each boxplot.

did not differ significantly. Zn was preferentially stored in leaves in agreement with the involvement of this element in plant respiration as enzyme co-factor (Todeschini et al., 2011). In the observed rosemary individuals, Zn levels in leaves were not significantly different for both sites. Previous researches showed that Zn translocation could be modulated by mycorrhizal associations (El-Kherbawy et al., 1989) and our own study highlighted that roots from rosemary individuals collected on the site A, with significantly higher Zn levels, were indeed highly endomycorrhized compared to those from the site B (results not shown).

Bioaccumulation factors for As, Cu, Pb, Sb and Zn were calculated for each site (Fig. 3). Results showed significantly higher BAFs for rosemary individuals growing on the site B compared to those on the site A, and this, for all the oligo-elements and xenobiotics studied. Shoot BAF levels were very low, particularly for plants from the site A, i.e. average BAFs for A were 0.0005, 0.014, 0.0012, 0.002 and 0.027 for, As, Cu, Pb, Sb and Zn, respectively. Except for Cu in the non-contaminated site, rosemary shoot BAFs were lower than 1, highlighting that this plant species was not an accumulator *sensu* Baker, 1981. Moreover, inorganic uptake by plant depends on a discrete number of membrane proteins, saturable following Michaelis Menten kinetics (Pilon-Smits, 2005). Thereby, lower BAFs in rosemary from the site A could be explained by uptake saturation related to the important mixed MM concentrations on this site. This uptake saturation hypothesis is reinforced by the results of Domiguez et al. (2008). Thus, MM concentrations in rosemary aerial parts in this latter study were of the same order than those we obtained, since the authors found 0.79, 13.2, 2.01, 0.046 and 51.2 mg/kg for As, Cu, Pb, Sb and Zn, respectively in rosemary leaves collected in a spill-affected site. However, soil contamination of this authors' site was lower than in L'Escalette. Another explanation could be linked to the phytodisponibility of MM in soil from site A. Indeed, total MM concentrations are generally not representative of concentrations really available to be taken up by plants (Chojnacka et al., 2005). Thus, other extraction solvents must be used i.e. EDTA (Quevauviller et al., 1997), calcium nitrate (Quevauviller, 1998) or ammonium citrate (Chojnacka et al., 2005), aiming to highlight labile and bioavailable MM concentrations.

3.2. Essential Oil Chemical Composition

For all the essential oils, a yield of ca. 1% was obtained in both sites. This yield corresponds to the average yield encountered in the literature i.e. yields from 0.10 to 2.13 using the same process of isolation (Angioni et al., 2004; Boutekedjiret et al., 2003). Chemical compositions were the same for both sites with 46 identical identified components (>98% of total composition) (Table 3). Major components were camphor, α -pinene and 1,8-cineole for both sites enabling to assert both rosemary populations belong to the same chemotype. Chemical composition of essential oils from both populations (contaminated and non-contaminated areas) being the same, it seemed that no variation of regulation of a specific biosynthesis pathway in the terpenoid synthesis was observed depending on pollution.

However, despite the low variation of composition between essential oils obtained from both sites, a co-inertia analysis between essential oil composition and MM was done (Fig. 4). The first axis represented 92.2% of variability, while the second one represented 6.3% of variability. The first two principal component information from respectively oil compositions and MM were well represented in this plane with ratios of 99% and 76% for MM and oil compositions, respectively. It highlighted a link between soil MM contamination and essential oil composition (correlation between metals' and oils' principal components was around 0.7 for co-inertia axis 1 and also for axis 2). Fig. 4 shows that As, Sb, Zn and Pb varied in the same way and were positively associated with linalyl cations and sesquiterpenes, whereas they were negatively associated with lipids and bornyl cations. Cu, Fe and Mn formed another group and this latter was positively associated with phenolic compounds and negatively with sabinyl cations. Information from some oil groups (pinyl cation, 4 terpinyl cation and α -terpinyl cation) was not clearly

related with metals. We projected, as supplementary information, the terpenes detailed components (Fig. 4 in grey). In non-contaminated soils, verbenone, pino-carvone, myrtenol (monoterpenes, pinyl cation) and sabinene (monoterpene, sabinyl cation) seemed more represented. These latter were best known as odorous components of the volatile essence of flowers and of the essential oils of herbs. They were considerably used as flavors and perfumes (Croteau et al., 2000). Some compound likes myrcene (monoterpene, linalyl cation), β -farnesene and β -caryophyllene (two sesquiterpenes) seemed linked to As, Pb, Sb and Zn. As a primary stress response of plants exposed to MM, reactive oxygen species (ROS) may be generated (Yadav, 2010), although antioxidants' capacities depend on compound reducing abilities (Apak et al., 2007). Presence of methylation in sesquiterpenes, found in higher quantity in rosemary essential oils from the contaminated site, seemed to confer them a high reducing potential (Ben Sghaier et al., 2011), and therefore better antioxidant properties. Both kinds of biomolecules were classified as terpenoids, but sesquiterpenoids were mainly produced in the cytosol *via* the acetate mevalonate pathway, and monoterpenoids arising in the plastids *via* the still not totally understood methylerythritol phosphate independent pathway (Davis and Croteau, 2000). Since two different pathways are involved in monoterpenoids and sesquiterpenoids synthesis, observed chemical composition alterations may not be only linked to MM oxidation but also to an enzymatic regulation.

Table 3

Average chemical composition of essential oils from both populations (A: contaminated site and B: reference site) expressed as percentage. Major compounds in bold.

Compounds	Percentage of each compound in each population	
	A*	B*
α -Thujene	0.3 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1
α-Pinene	20 \pm 6	19 \pm 7
Camphene	10 \pm 2	8 \pm 2
Thuja 2,4 diene	0.3 \pm 0.1	0.14 \pm 0.12
Octen-3-one	1.4 \pm 0.6	1.6 \pm 0.2
β -Pinene	0.07 \pm 0.07	0.25 \pm 1.19
1-Octen-3-ol	0.02 \pm 0.03	0.08 \pm 0.10
Myrcene	11 \pm 7	6.9 \pm 7.2
Sabinene	0.06 \pm 0.04	0.17 \pm 0.07
α -Phellandrene	2 \pm 1	0.76 \pm 0.63
<i>o</i> -Cymene	0.44 \pm 0.95	0.01 \pm 0.00
1,8-Cineole	11 \pm 5	14 \pm 6
Limonene	6 \pm 2	3.7 \pm 6.7
δ -3-Carene	0.01 \pm 0.00	2 \pm 3
E- β -ocymene	0.28 \pm 0.22	0.02 \pm 0.02
γ -Terpinene	0.4 \pm 0.3	0.5 \pm 0.2
<i>p</i> -Cymene	2.1 \pm 0.6	1.6 \pm 0.9
Linalool	0.8 \pm 0.7	0.5 \pm 0.2
<i>p</i> -Cymenone	0.5 \pm 0.2	0.5 \pm 0.2
Myrcenol	0.38 \pm 0.35	0.7 \pm 0.2
α -Campholenal	0.25 \pm 0.22	0.3 \pm 0.2
Camphor	23 \pm 9	26 \pm 7
Pinocarvone	0.05 \pm 0.05	0.23 \pm 0.07
α-Terpineol	4 \pm 2	5 \pm 2
Terpinen-4-ol	0.45 \pm 0.42	0.8 \pm 0.1
Pinocamphone	0.4 \pm 0.2	0.4 \pm 0.2
Verbenone	1.1 \pm 0.4	2.2 \pm 0.5
Myrtenol	0.9 \pm 0.2	1.5 \pm 0.3
Borneol	0.09 \pm 0.08	0.17 \pm 0.10
Z-ocymenone	0.5 \pm 0.7	0.05 \pm 0.05
Cis-myrtanol	0.03 \pm 0.02	0.02 \pm 0.01
E-ocymenone	0.07 \pm 0.09	0.05 \pm 0.06
Trans-myrtanol	0.01 \pm 0.00	0.02 \pm 0.02
Linalyl acetate	0.44 \pm 0.35	0.5 \pm 0.3
Bornyl acetate	0.02 \pm 0.02	0.23 \pm 0.47
Z-3 hexenyl tiglate	0.06 \pm 0.08	0.04 \pm 0.05
Methyl eugenol	0.25 \pm 0.24	0.08 \pm 0.13
β -Caryophyllene	0.15 \pm 0.20	0.04 \pm 0.04
β -Farnesene	1.1 \pm 0.7	0.65 \pm 0.63
Identified percentage	99.7 \pm 0.3	99.7 \pm 0.2

* Means of 5 essential oils per population.

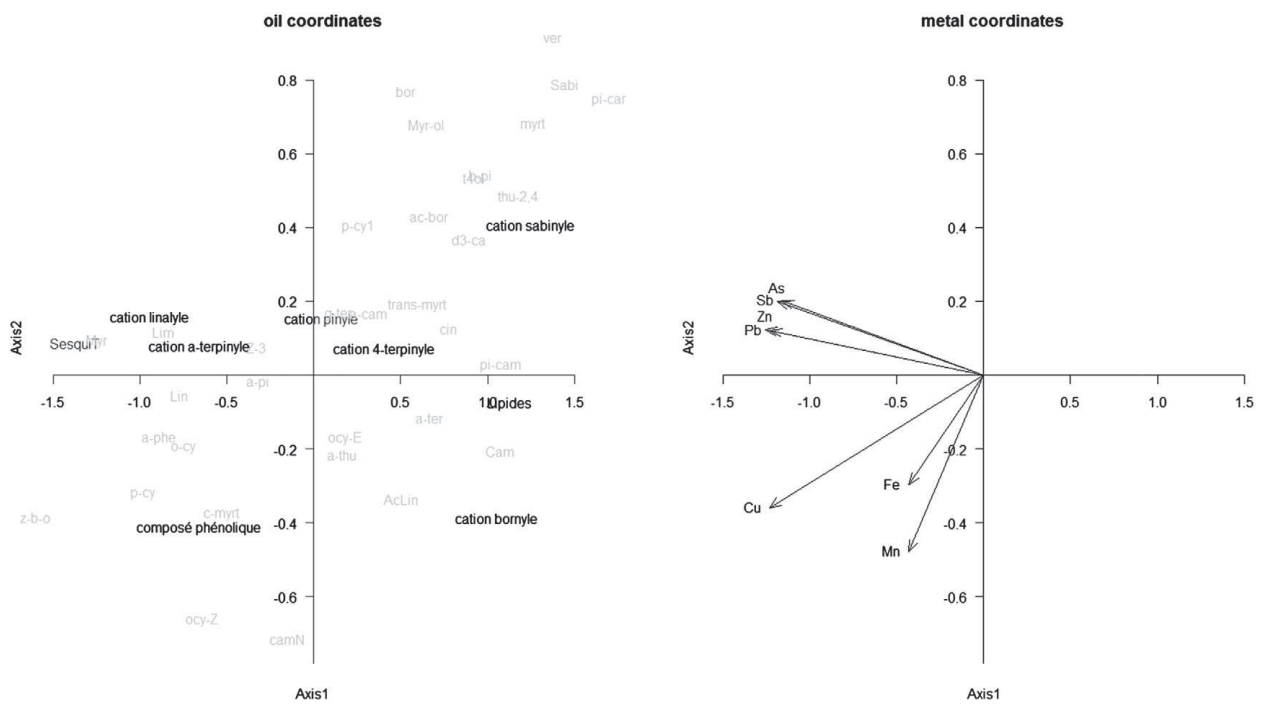


Fig. 4. Coinertia analysis between essential oil chemical composition and MM soil contamination.

3.3. MM in Herbal Teas

MM were analyzed in herbal teas (Table 4). Results obtained with rosemary samples from contaminated and non-contaminated sites were compared with the FAO/WHO guideline concerning drinking water (FAO/WHO, 2008). Our results showed that MM transfer during brewing process was limited. However, there were significantly more As and Sb in herbal teas obtained with rosemary from the site A than from the site B. Contrariwise, Cu concentration in herbal teas was significantly higher when obtained with rosemary individuals from the site B than those from the site A (97 µg/L and 27 µg/L, respectively) while concentrations in leaves were almost the same (9.7 and 8.5 mg/kg, respectively). Calculation of the metal transfer ratio (%) into infusion highlighted that, extraction efficiency was elemental dependent and in most cases, dependent on leaf concentration. Thereby, except for As (transfer ratio about 12), percentages of elements released were significantly different between both sites. Indeed, transfer percentages from rosemary were 6.6, 2.0, 3.4, and 0.64 in herbal teas from the site A, and were about 19.4, 5.5, 10.8 and 2.5 in herbal teas from the site B for Cu, Pb, Sb and Zn, respectively. For these latter elements, except Cu, transfer ratios into herbal teas were proportionally higher when leaf contamination was lower.

Thus, MM concentrations in herbal teas obtained with rosemary leaves from contaminated and non-contaminated areas were below the permissible limits proposed by the *Codex Alimentarius* concerning drinking water (FAO/WHO, 2008) and this, for the 4 elements considered. However, MM speciation in herbal tea has to be taken into account, since toxicity and bioavailability are highly dependent on speciation for some elements such as As (Creelius, 1977), Pb (Oomen et al., 2003) and Sb (Sundar and Chakravarty, 2010).

A previous study showed that in herbal infusions, As was mainly (72–98%) associated with biomacromolecules, in the same way, the main part of Pb forms strong complexes (Aspadjan et al., 2008). It was assumed that the element-binding organic ligand in herbal teas were largely polyphenolic compounds (Toda, 2011). Since polyphenols were reported as poorly absorbable chemical species (Manach et al., 2004), it could be assumed that As and Pb from herbal teas were almost not bioavailable and therefore less toxic.

3.4. Human Risk

Table 5 presents the minimal quantities of leaves (in g) and herbal tea (in L) from both sites (A and B) to consume in order to reach the acceptable daily intake (ADI, Baars et al., 2001; WHO, 2006) for As, Cu, Pb and Sb (no values for Zn). For As, Cu and Sb in both sites, dry leaves quantity necessary to exceed recommended limits was above 300 g per day, and volumes of herbal tea was above 40 L per day. We could notice the particularity for Pb in the site A with a quantity of dry leaves corresponding to only 51 g per day. Thus, in all cases, masses and volumes were high, and overtake widely the quantity a

Table 4

MM concentrations in rosemary herbal tea in µg/L (A: contaminated site and B: reference site).

Site	Elements µg/L				
	As	Cu	Pb	Sb	Zn
A	2.7 ± 1.1 a	27 ± 7 a	3.7 ± 1.5 a	0.9 ± 0.3 a	23 ± 10 a
B	0.35 ± 0.06 b	97 ± 23 b	1.1 ± 0.3 a	0.42 ± 0.06 b	28 ± 6 a
Reference FAO/WHO regulation*	10	1000	10	5	–

Means (± standard deviation) followed by different letters in the same column are significantly different (Wilcoxon test, $\alpha = 0.05$, $m = 5$, Bonferroni: significant p -value < 0.01) after a one-way MANOVA: rank Wilks' lambda = 0, Chi2-value = 406.559, DF = 5, p -value < $2.2e^{-16}$.

* FAO/WHO *Codex Alimentarius* commission, 2008.

Table 5

Minimal quantities of rosemary leaves (g of dry weight, DW) or herbal tea (L) to consume to reach acceptable daily intake (ADI) for As, Cu, Pb and Sb (no value available for Zn; A: contaminated site and B: reference site).

	Site	Elements			
		As	Cu	Pb	Sb
ADI (mg/day) for a 60 kg adult		0.12 ^a	8.4 ^a	0.21 ^a	0.36 ^b
Leaves (g DW)	A	342	900	51	643
	B	1318	866	437	4500
Herbal tea (L)	A	44	314	57	387
	B	343	87	180	857

^a Baars et al. (2001).

^b WHO (2006).

consumer may ingest. Although for herbal, the European Pharmacopoeia recommends to drink 250 to 500 mL of a 5 g/L rosemary tea, daily. This suggests that MM exposure risk for people picking and eating rosemary in Calanques hills, and notably in the contaminated area, is low, if nonexistent in the case of non-exceptional consumption, considering separately every element. However, health risks could not be completely excluded since Pb is cumulative in body. As reviewed by Pounds et al. (1991), Pb may be stored in bones, substituting calcium on its receptors. This stored Pb could be remobilized in the case of increasing bone turnover, due to osteoporosis for example, with lead intoxication as a consequence (Berlin et al., 1995). Moreover, nothing is known about long time exposition effects to the cocktail of these toxic elements even at low concentrations and this represents a challenge for future research.

4. Conclusion

Under our field conditions, MM accumulation in *R. officinalis* aerial parts was limited, as bioaccumulation factors (BAFs) were under 1 for all MM studied, except for Cu in the non-contaminated site. However, more experimentations have to be carried out to highlight if rosemary is really not able to accumulate MM in its aerial parts or if it is the occurrence of a low phytoavailability of MM in soils. The fact remains that in this case, despite a high pseudo total soil contamination, As, Cu and Pb concentrations in rosemary leaves were below international regulation levels concerning ingestion of medicinal herbs (no values available for Sb and Zn). MM concentrations in herbal teas were also under drinking water regulation. This study highlighted that health risks related to ingestion of contaminated rosemary, may be limited since ADI for As, Cu, Pb and Sb will require high quantities to be reached (from 50 g to almost 1 kg per day for an adult). As analyses were done only on washed plant parts and since this study took place in the second higher French peri-urban area, it could be interesting, in future studies, to investigate the possible contamination provided by dust due to aeolian transport. However, since MM are known not to be transferred during steam distillation, using contaminated rosemary for essential oil production could be a recovering opportunity. Moreover, essential oils' composition from rosemary individuals growing at the site contaminated by MM seemed to exhibit an enhancement of antioxidant compounds biosynthesis. Further studies will be necessary to confirm if these moderate variations of essential oil composition have an impact on its global antioxidant properties. With regard to the question of the treatment of hydrodistillation byproducts (water and residual biomass) containing MM, our results showed no accumulation of MM in edible parts of rosemary. Another perspective is to use rosemary for a phytostabilization process. Indeed, a previous study showed its ability to accumulate MM in the root parts and reduce MM phytodisponibility in soil (Madejon et al., 2009). Thus, speciation of contaminants, phytoavailability and mobility of MM in soil and in rhizosphere need to be investigated to evaluate rosemary potential for phytostabilization in this context.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was financially supported by the Agence Nationale de la Recherche, ANR CES Marséco program (2008 CESA 018) and by the National Innovative Cluster on Risks Management. Many thanks to Botlik L, Cézanne F, Ifrah C, Vinviollet D for their help to prepare the rosemary essential oils, to Bruel R for herbal tea preparation, to Vassalo L and Demelas C for their help for ICP-AES analyses, to Greff S. for GC-MS analyses and to Dumas PJ for the map. The authors thank the three anonymous reviewers for their constructive comments that improved the manuscript.

References

- Abdul-Wahab O, El-Rjoob AWO, Massadeh AM, Omari MN. Evaluation of Pb, Cu, Zn, Cd, Ni and Fe levels in *Rosmarinus officinalis* Labiatea (rosemary) medicinal plant and soils in selected zones in Jordan. *Environ Monit Assess* 2008;140:61–8.
- Adams RP. Identification of essential oils by gas chromatography quadrupole mass spectroscopy. Carol Stream, USA: Allured Publishing Corporation; 2001.
- Al-Sereitia MR, Abu-Amerb KM, Sena P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* linn.) and its therapeutic potentials. *Indian J Exp Biol* 1999;37:124–31.
- Angioni A, Barra A, Cereti E, Barile D, Coisson JD, Arlorio M, et al. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *J Agric Food Chem* 2004;52:3530–5.
- Apak A, Güçlü K, Demirata B, Özyürek M, Celik SE, Bektasoglu B, et al. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAD assay. *Molecules* 2007;12:1496–547.
- Aspadjan S, Celik G, Taskesen S, Güçer S. Arsenic, cadmium and lead in medicinal herbs and their fractionation. *Food Chem Toxicol* 2008;46:2871–5.
- Baars AJ, Theelen RMC, Janssen PJCM, Hesse JM, van Apeldoorn ME, Meijerink MCM, et al. Re-evaluation of human-toxicological maximum permissible risk levels RIVM, Rijnsinstituut voor volksgezondheid en milieu. Report 711 701 025; 2001.
- Baker AJM. Accumulators and excluders—strategies in the response of plants to heavy metals. *J Plant Nutr* 1981;3:643–54.
- Basol : basol.ecologie.gouv.fr, sheet n° 13.0098, update 13/03/2006.
- Ben Sghaier M, Skandrani I, Nasr N, Dijoux France MG, Chekir-Ghedira L, Ghedira K. Flavonoids and sesquiterpenes from *Teucrium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: a structure-activity relationship study. *Environ Toxicol Pharmacol* 2011;32:336–48.
- Berlin K, Gerhardsson L, Börjesson J, Lindh E, Lundström N, Schütz A, et al. Lead intoxication caused by skeletal disease. *Scand J Work Environ Health* 1995;21(4):296–300.
- Boskou D. Olive oil, chemistry and technology. 2nd ed. AOCs Publishing; 2006.
- Boutekedjiret C, Bentahar F, Belabbes R, Bessiere JM. Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. *Flavour Fragr J* 2003;18:481–4.
- Cala V, Cases MA, Walter I. Biomass production and heavy metal content of *Rosmarinus officinalis* grown on organic waste-amended soil. *J Arid Environ* 2005;62:401–12.
- Cheung STJ. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. *Oncol Rep* 2007;17:1525–31.
- Chojnacka K, Chojnacki A, Gorecka H, Gorecki H. Bioavailability of heavy metals from polluted soils to plants. *Sci Total Environ* 2005;337:175–82.
- Creclius EA. Changes in the chemical speciation of arsenic following ingestion by man. *Environ Health Perspect* 1977;19:147–50.
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. Chapter 24, products secondary metabolites. In: Buchanan B, Gruissem W, Jones R, editors. *Natural biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists; 2000. p. 1250–318.
- Davis EM, Croteau R. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. *Top Curr Chem* 2000;209:53–94.
- Del Bano MJ, Lorente J, Castillo J, Benavente-Garcia O, Del Rio JA, Ortuno A, et al. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2003;51:4247–53.
- Domiguez MT, Maranon T, Murillo JM, Schulin R, Robinson BH. Trace element accumulation in woody plants of the Guadamar Valley, SW Spain: a large-scale phytomanagement case study. *Environ Pollut* 2008;152:50–9.
- Dray S, Chessel D, Thioulouse J. Co-inertia analysis and the linking of the ecological data tables. *Ecology* 2003;84:3078–89.
- EI-Kherbawy M, Angle JS, Heggio A, Chaney RL. Soil pH, rhizobia, and vesicular-arbuscular mycorrhizae inoculation effects on growth and heavy metal uptake of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Biol Fertil Soils* 1989;8:61–5.
- FAO/WHO. Food standards programme, codex alimentarius commission. Thirty-first sessions, International Conference Centre Geneva Geneva, Switzerland, 30 June – 4 July 2008 31th session – Alinorm 08/31/20; 2008.
- Fernández-Ugalde O, Virto I, Barré P, Gartzia-Bengoetxea N, Enrique A, Imaz MJ, et al. Effect of carbonates on the hierarchical model for aggregation in calcareous semi-arid Mediterranean soils. *Geoderma* 2011;164:203–14.
- Finch H. Comparison of the performance of nonparametric and parametric MANOVA test statistics when assumptions are violated. *Method Eur J Res Methods Behav Soc Sci* 2005;1(1):27–38.
- Heo M, Gabriel KR. A permutation test of association between configurations by means of the RV coefficient. *Commun Stat Simul* 1997;27:843–56.
- Herbal drugs monograph 1433. Pharmeuropa 2008;20(2):302–3.
- INERIS-Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (France). Fiche de données toxicologiques et environnementales du Plomb. Version 2; 2003.
- INERIS-Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (France). Fiche de données toxicologiques et environnementales du Cuivre. Version 1; 2005a.
- INERIS-Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (France). Fiche de données toxicologiques et environnementales du Zinc. Version 2; 2005b.
- INERIS-Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (France). Fiche de données toxicologiques et environnementales de l'Arsenic. Version 4; 2010.
- Jennings W, Shibamoto T. Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography. New York: Academic Press; 1980.
- Kaloustian J, Pauli AM, Pastor J. Evolution of camphor and other components in the essential oils of two labiate species during the biological cycle. *Analisis* 2000;28:308–15.
- Komnitsas K, Modis K. Soil risk assessment of As and Zn contamination in a coal mining region using geostatistics. *Sci Total Environ* 2006;371:190–6.
- Komnitsas K, Modis K. Geostatistical risk estimation at waste disposal sites in the presence of hot spots. *J Hazard Mater* 2009;164:1185–90.
- Laffont-Schwob I, Dumas PJ, Pricop A, Rabier J, Miché L, Affre L, et al. Insights on metal-tolerance and symbionts of the rare species *Astragalus tragacantha* aiming at phytostabilization of polluted soils and plant conservation. *Ecol Mediterr* 2011;37(special issue 2):57–62.
- Lasalle JL. Présence de plomb et d'arsenic sur le littoral sud de Marseille : une étude de santé (juillet 2005). INVS report; 2007.
- Lopez-Munoz F, Alamo C, Garcia-Garcia P. The herbs that have the property of healing: the phytotherapy in Don Quixote. *J Ethnopharmacol* 2006;106:429–41.
- Lotmani B, Fatarna L, Berkani A, Rabier J, Prudent P, Laffont-Schwob I. Selection of Algerian populations of the Mediterranean saltbush, *Atriplex halimus*, tolerant to high concentrations of lead, zinc and copper for phytostabilization of heavy metal-contaminated soils. *Eur J Plant Sci Biotechnol* 2011;5(special issue 2):20–6.
- Madejon P, Burgos P, Cabrera F, Madejon E. Phytostabilization of amended soils polluted with trace elements using the Mediterranean shrub: *Rosmarinus officinalis*. *Int J Phytorem* 2009;1:542–57.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79:727–47.
- Manly BFJ. Randomization, bootstrap, and Monte Carlo methods in biology. 2nd ed. London: Chapman & Hall; 1997.
- Nath R, Patur R. A new statistic in the one way multivariate analysis of variance. *Comput Stat Data Anal* 1985;2:297–315.
- Oomen AG, Tolls J, Sips AJAM, Groten JP. *In vitro* intestinal lead uptake and transport in relation to speciation. *Arch Environ Contam Toxicol* 2003;44:116–24.
- Ormeno E, Baldy V, Ballini C, Fernandez C. Production and diversity of volatile terpenes from plant on calcareous and siliceous soils: effect of soil nutrients. *J Chem Ecol* 2008;34:1219–29.
- Palero-Fernandez FJ, Martin-Izard A. Trace element contents in galena and sphalerite from ore deposits of the Alcudia Valley mineral field (Eastern Sierra Morena, Spain). *J Geochem Explor* 2005;86:1–25.
- Pilon-Smits E. Phytoremediation. *Annu Rev Plant Biol* 2005;56:15–39.
- Pounds JG, Long GJ, Rosen JF. Cellular and molecular toxicity of lead in bone. *Environ Health Perspect* 1991;91:17–32.
- Quevauviller P. Operationally defined extraction procedures for soil and sediment analysis I. Standardization. *Trends Anal Chem* 1998;17:289–98.
- Quevauviller P, Rauret G, Ure A, Bacon J, Muntau H. Report EUR 17127 EN. Brussels: European Commission; 1997.
- Rabier J, Laffont-Schwob I, Bouraïma-Madjèdi S, Léon V, Prudent P, Viano J, et al. Characterization of metal tolerance and accumulation in *Grevilla exul var exul*. *Int J Phytorem* 2007;9:419–35.
- Robert P, Escoufier Y. A unifying tool for linear multivariate statistical methods: the RV-coefficient. *Appl Stat* 1976;25(3):257–65.
- Schwob I, Bessiere JM, Masotti V, Viano J. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during the phenological cycle. *Biochem Syst Ecol* 2004;32(8):735–45.
- Sekeroglu N, Ozkutlu F, Kara M, Ozguven M. Determination of cadmium and selected micronutrients in commonly used and traded medicinal plants in Turkey. *J Sci Food Agric* 2008;88:86–90.
- Sullivan C. Searching for nineteenth-century Florida water bottles. *Hist Archaeol* 1994;28:78–98.
- Sundar S, Chakravarty J. Antimony toxicity. *Int J Environ Res Public Health* 2010;7:4267–77.
- Testiati E, Parinet J, Massiani C, Laffont-Schwob I, Rabier J, Pfeifer HR, et al. Trace metal and metalloids contamination level in soils and two native plant species of a former industrial site: evaluation of the phytostabilization potential. *J Hazard Mater* 2013;248–249:131–41.
- Toda S. Polyphenol content and antioxidant effects in herb teas. *Chin Med* 2011;2:29–31.
- Todeschini V, Lingua G, D'Agostino G, Carniato F, Rocciotello E, Berta G. Effect of high zinc concentration on polar leaves: a morphological and biochemical study. *Environ Exp Bot* 2011;71:50–6.
- World Health Organization (WHO). Guidelines for drinking-water quality First addendum to 3rd ed. ; 2006 [Geneva].

- World Health Organization (WHO). WHO guideline for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residue; 2007 [Geneva].
- Yadav SK. Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatin in heavy metals stress tolerance of plants. *S Afr J Bot* 2010;76: 167–79.
- Yaylali-Abanuz G. Heavy metal contamination of surface soil around Gebze industrial area, Turkey. *Microchem J* 2011;99:82–92.
- Yenilmez F, Kuter N, Emil MK, Aksoy A. Evaluation of pollution levels at an abandoned coal mine site in Turkey with the aid of GIS. *Int J Coal Geol* 2011;86(1):12–9.
- Zaouli Y, Messouad C, Boussaid M. Genetic diversity of wild populations of *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) in Tunisia. *Ecol Mediterr* 2003;29:199–216.
- Zheljazkov VD, Craker LE, Xing B. Effects of Cd, Pb, and Cu on growth and essential oil contents in dill, peppermint, and basil. *Environ Exp Bot* 2006;58:9–16.
- Zheljazkov VD, Craker LE, Xing B, Nielsen NE, Wilcox A. Aromatic plant production on metal contaminated soils. *Sci Total Environ* 2008a;395:51–62.
- Zheljazkov VD, Jeliaskova EA, Kovacheva N, Dzhurmanski A. Metal uptake by medicinal plant species grown in soils contaminated by a smelter. *Environ Exp Bot* 2008b;64: 207–16.

Annexe 10 : BCF_{total} racinaire ([ETMM racinaire]/[ETMM pseudo-total du sol])

moyens±écart-type (moy), valeurs minimales (min), maximales (max) pour As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn sur les individus de tous les sites. De G0 à G6 : points du transect, S3 : référence.

Sites	Eléments							
		As	Cu	Fe	Mn	Pb	Sb	Zn
G0	min	0,009	0,29	0,016	0,027	0,028	0,013	0,053
	moy	0,023±0,014	0,37±0,09	0,034±0,015	0,063±0,028	0,057±0,030	0,035±0,020	0,082±0,028
	max	0,046	0,48	0,053	0,10	0,092	0,062	0,11
G1	min	0,034	0,26	0,038	0,034	0,081	0,038	0,081
	moy	0,076±0,048	0,79±0,60	0,066±0,044	0,094±0,057	0,21±0,15	0,17±0,14	0,18±0,13
	max	0,16	1,8	0,14	0,19	0,457	0,40	0,36
G2	min	0,015	0,11	0,024	0,034	0,029	0,021	0,057
	moy	0,064±0,036	0,41±0,20	0,055±0,024	0,090±0,042	0,13±0,07	0,083±0,046	0,15±0,09
	max	0,11	0,61	0,086	0,14	0,231	0,15	0,29
G3	min	0,001	0,033	0,014	0,015	0,043	0,040	0,031
	moy	0,033±0,022	0,64±0,38	0,033±0,018	0,048±0,026	0,14±0,13	0,16±0,15	0,19±0,14
	max	0,064	1,1	0,059	0,074	0,359	0,37	0,41
G4	min	0,007	0,13	0,009	0,016	0,017	0,002	0,095
	moy	0,063±0,052	0,33±0,15	0,029±0,013	0,042±0,017	0,059±0,029	0,053±0,044	0,13±0,03
	max	0,13	0,55	0,038	0,056	0,085	0,10	0,17
G5	min	0,016	0,044	0,006	0,006	0,014	0,070	0,011
	moy	0,035±0,018	0,41±0,27	0,013±0,004	0,022±0,011	0,068±0,054	0,16±0,12	0,17±0,10
	max	0,064	0,73	0,017	0,034	0,15	0,37	0,28
G6	min	0,005	0,33	0,010	0,021	0,023	0,009	0,134
	moy	0,009±0,007	0,50±0,19	0,018±0,006	0,037±0,010	0,039±0,017	0,030±0,024	0,19±0,04
	max	0,022	0,82	0,024	0,049	0,061	0,064	0,231
S3	min	0,17	0,74	0,052	0,049	0,076	0,083	0,124
	moy	0,23±0,07	1,31±0,56	0,11±0,05	0,093±0,038	0,26±0,20	0,13±0,04	0,25±0,11
	max	0,33	1,9	0,16	0,13	0,51	0,17	0,40

Annexe 11 : BCF_{mobilisable} racinaire ([racinaire]/[ETMM mobilisable du sol] pour As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn sur les individus de tous les sites. De G0 à G6 : points du transect, S3 : référence

Site	Individu	Eléments						
		As	Cu	Fe	Mn	Pb	Sb	Zn
G0	1	0,20	1,51	4,46	0,29	0,08	0,77	0,30
G0	2	0,21	2,65	10,77	0,46	0,29	0,96	0,63
G0	3	1,10	2,82	8,23	0,65	0,39	2,18	0,82
G0	4	0,15	1,50	3,90	0,34	0,16	1,03	0,36
G0	5	0,05	1,34	9,39	0,98	0,09	0,17	0,35
G1	1	1,22	3,79	8,49	0,61	0,34	9,16	1,84
G1	2	0,73	1,76	17,29	1,05	0,14	4,33	0,61
G1	3	1,02	1,56	33,66	1,60	0,28	7,24	1,10
G1	4	2,45	2,20	57,28	3,08	1,06	9,35	2,47
G1	5	0,35	0,82	10,09	0,40	0,27	1,08	0,53
G2	1	2,18	2,35	9,26	0,82	0,46	5,80	1,30
G2	2	0,97	0,97	5,59	1,52	0,20	2,27	0,49
G2	3	0,62	2,25	18,66	1,91	0,39	2,81	0,81
G2	4	0,94	1,57	37,92	1,76	0,30	3,10	0,72
G2	5	0,17	0,39	3,16	0,42	0,08	0,57	0,31
G3	1	5,49	5,41	32,58	1,01	0,32	28,28	1,62
G3	2	1,74	3,39	17,40	0,85	0,16	7,38	0,81
G3	3	0,52	4,35	13,46	0,86	0,85	16,29	2,08
G3	4	1,51	2,78	30,54	1,26	0,18	9,36	0,98
G3	5	0,02	0,12	4,55	0,29	0,12	1,24	0,16
G4	1	6,82	1,16	3,60	0,32	0,16	10,83	0,40
G4	2	1,88	2,39	9,59	0,41	0,13	1,95	0,80
G4	3	23,33	3,17	15,23	0,50	0,22	6,60	1,11
G4	4	0,70	0,96	1,04	0,09	0,06	0,08	0,18
G4	5	67,23	1,14	7,19	0,31	0,19	7,49	0,76
G5	1	71,71	4,51	11,84	0,48	0,56	44,77	1,77
G5	2	6,37	2,66	7,33	0,23	0,17	11,47	791
G5	3	1,11	1,20	1,78	0,14	0,04	3,13	0,36
G5	4	1,73	1,17	3,61	0,21	0,07	16,45	0,49
G5	5	26,79	1,12	3,48	0,09	0,73	14,76	0,68
G6	1	3,38	2,61	7,50	0,32	0,15	1,08	1,19
G6	2	0,88	2,97	17,60	0,52	0,23	4,94	0,83
G6	3	81,34	6,29	13,99	0,44	0,48	1,01	4,18
G6	4	18,10	1,68	11,02	0,41	0,05	1,72	1,00
G6	5	1,17	3,97	2,88	0,26	0,08	0,33	3,58
S3	1	2,33	6,98	10,69	0,74	2,10	16,21	2,58
S3	2	1,61	1,52	4,01	0,36	0,40	3,72	0,23
S3	3	1,86	3,67	13,77	0,81	0,72	8,17	1,86
S3	4	3,53	3,94	9,04	0,42	0,48	5,59	1,45
S3	5	1,43	6,22	15,29	1,02	0,16	2,05	2,24

Annexe 12 : BCF_{échangeable} racinaire ([racinaire]/[ETMM échangeable du sol] pour As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn sur les individus de tous les sites. Pas de données pour les échantillons ayant une concentration d'ETMM échangeables inférieurs à la limite de quantification (-). De G0 à G6 : points du transect, S3 : référence.

Site	Individu	Eléments						
		As	Cu	Fe	Mn	Pb	Sb	Zn
G0	1	31,8	127	7452	6,6	456	5,7	79,7
G0	2	31,1	251	6420	17,9	1300	7,3	223
G0	3	41,8	140	691	17,4	1654	6,6	159
G0	4	15,8	83,7	801	5,8	412	8,0	39,6
G0	5	43,2	132	4518	12,7	358	3,6	49,7
G1	1	140	397	48901	27,7	6833	97,8	44,8
G1	2	167	147	54070	43,1	1231	47,9	285
G1	3	314	136	71428	50,7	1968	99,3	426
G1	4	473	177	68169	151	3038	121	858
G1	5	138	80,9	12148	15,2	438	21,0	134
G2	1	172	177	7748	15,0	2591	65,3	633
G2	2	189	120	10035	74,0	1250	27,4	90,1
G2	3	240	233	17168	37,9	1848	38,9	80,6
G2	4	168	105	39113	27,9	1164	36,4	136
G2	5	41,5	42,9	2585	30,5	409	6,3	70,9
G3	1	71,8	275	33676	18,2	3817	98,5	262
G3	2	29,8	191	8943	15,4	787	26,7	347
G3	3	60,5	338	15268	14,3	82160	99,1	340
G3	4	39,6	208	38538	16,6	1003	43,8	325
G3	5	7,4	10,1	5165	4,3	396	17,3	15,6
G4	1	196	278	3741	8,3	9708	360	165
G4	2	51,9	218	5979	25,8	10305	36,8	173
G4	3	127	153	14826	21,0	2598	159	246
G4	4	2,1	88,2	1822	1,7	26,0	1,1	26,3
G4	5	21,4	33,4	1179	3,1	148	18,4	3,5
G5	1	41,2	62,2	328	4,8	69,9	160	38,8
G5	2	23,6	87,5	582	3,8	14,6	85,4	69,5
G5	3	16,0	67,7	16630	2,1	29,7	11,8	135
G5	4	31,0	90,7	1960	2,0	38,8	43,6	395
G5	5	10,4	20,5	434	0,5	93,8	46,4	12,8
G6	1	205	138	4843	15,2	-	16,3	35,9
G6	2	237	140	6280	5,8	-	8,8	75,1
G6	3	20,6	302	4195	5,7	-	66,8	203
G6	4	-	126	4656	10,7	324	69,2	83,7
G6	5	82,1	80,5	37630	8,5	-	114	300
S3	1	35,2	1414	43832	22,4	1509	24,8	20,8
S3	2	125	804	41105	12,3	2984	58,1	237
S3	3	13,9	344	-	77,2	1347	147	299
S3	4	8,6	276	-	36,2	367	49,9	555
S3	5	22,4	563	-	38,4	913	52,5	-

Annexe 13 : facteurs de translocation ([ETMM parties aériennes]/[ETMM racines] pour As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn sur les individus de tous les sites. De G0 à G6 : points du transect, S3 : référence.

Sites		Eléments						
		As	Cu	Fe	Mn	Pb	Sb	Zn
G0	min	0,012	0,54	0,37	0,29	0,016	0,047	0,21
	moy	0,022±0,009	1,14±0,93	1,26±1,27	0,77±0,65	0,034±0,035	0,061±0,019	0,36±0,18
	max	0,035	2,77	3,23	1,83	0,096	0,095	0,66
G1	min	0,011	0,18	0,091	0,14	0,011	0,033	0,12
	moy	0,032±0,021	0,41±0,20	0,55±0,54	0,58±0,72	0,046±0,037	0,13±0,19	0,44±0,36
	max	0,058	0,68	1,30	1,84	0,094	0,47	1,05
G2	min	0,002	0,38	0,14	0,13	0,002	0,004	0,050
	moy	0,007±0,004	0,78±0,67	0,30±0,29	0,27±0,12	0,006±0,005	0,016±0,012	0,17±0,14
	max	0,013	1,97	0,81	0,43	0,014	0,033	0,40
G3	min	0,037	0,44	0,19	0,30	0,010	0,013	0,15
	moy	0,094±0,087	1,90±3,07	0,48±0,25	0,65±0,41	0,051±0,037	0,087±0,074	0,66±0,42
	max	0,25	7,40	0,74	1,29	0,096	0,20	1,13
G4	min	0,019	0,54	0,21	0,28	0,051	0,068	0,64
	moy	0,15±0,15	1,02±0,72	0,71±0,34	0,68±0,33	0,14±0,09	0,81±1,43	1,32±0,84
	max	0,41	2,28	1,08	1,07	0,28	3,35	2,27
G5	min	0,31	0,63	0,54	0,91	0,35	0,32	0,90
	moy	0,49±0,20	1,25±1,27	1,33±0,80	2,41±2,59	0,46±0,10	0,54±0,26	2,68±3,16
	max	0,78	3,52	2,55	7,00	0,59	0,94	8,27
G6	min	0,28	0,32	0,38	0,30	0,65	0,96	0,86
	moy	2,15±1,17	0,83±0,43	0,81±0,78	0,73±0,38	3,37±2,06	3,40±2,35	1,65±0,68
	max	3,30	1,45	2,20	1,33	5,70	6,29	2,47
S3	min	0,055	0,62	0,13	0,24	0,038	0,16	1,00
	moy	0,086±0,030	1,03±0,30	0,25±0,15	0,41±0,15	0,065±0,035	0,29±0,14	2,92±1,63
	max	0,14	1,32	0,50	0,60	0,12	0,51	5,25

Annexe 14 : pourcentage de colonisation endomycorhizienne par les champignons arbusculaires et les champignons fongés septés (DSE) sur tous les sites (de G0 à G6 : points du transect, S3 : référence). Valeurs minimales, moyennes (\pm écart-type), maximales. DSE non comptés pour G0 et S3.

Sites	Vésicules			DSE		
	min	moyenne	max	min	moyenne	max
G0	70	86±11	100	-	-	-
G1	27	51±24	86	1,3	11,3±7,0	20,0
G2	44	59±16	87	11,3	24,3±11,0	37,5
G3	10	42±28	85	10,0	13,4±4,1	20,0
G4	14	38±14	51	0,0	5,4±4,5	10,0
G5	11	24±19	57	3,8	11,6±8,9	24,3
G6	2	37±22	58	7,5	13,3±8,8	28,8
S3	0	18±22	50	-	-	-

Annexe 15: As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn absorbés et adsorbés (en pourcentage) dans les racines de romarin contaminé. Valeurs minimale, moyenne (\pm écart-type) et maximale.

Type de racine	Mécanismesimpliqués	Éléments							
		As	Cu	Fe	Mn	Pb	Sb	Zn	
Pivot	absorbé	min	37,2	87,4	94,5	60,2	37,7	92,3	56,9
		moy	43,2 \pm8,2	91,6 \pm3,9	96,8 \pm2,0	67,8 \pm9,5	44,1 \pm10,8	96,1 \pm3,4	61,5 \pm7,7
		max	52,5	94,9	97,9	78,4	56,5	98,7	70,5
	adsorbé	min	47,5	7,5	2,1	21,6	43,5	1,3	29,5
		moy	56,8 \pm8,2	8,4 \pm3,9	3,2 \pm2,0	32,2 \pm9,5	55,9 \pm10,8	3,9 \pm3,4	38,5 \pm7,7
		max	62,8	12,6	5,5	39,8	62,3	7,7	43,1
Grosse	absorbé	min	11,6	95,4	94,5	55,7	26,0	85,9	57,8
		moy	55,6 \pm28,5	96,4 \pm0,9	96,6 \pm1,8	65,0 \pm9,1	38,0 \pm11,0	91,2 \pm5,2	66,5 \pm7,5
		max	62,9	97,1	97,9	73,9	47,6	96,3	71,1
	adsorbée	min	37,1	2,9	2,1	26,1	52,4	3,7	28,9
		moy	44,4 \pm28,5	3,6 \pm0,9	3,4 \pm1,8	35,0 \pm9,1	62,0 \pm11,0	8,8 \pm5,2	33,5 \pm7,5
		max	88,4	4,6	5,5	44,3	74,0	14,1	42,2
Moyenne	absorbé	min	27,2	75,8	90,8	42,1	23,6	89,1	45,1
		moy	54,0 \pm19,9	85,8 \pm8,8	92,8 \pm2,2	50,0 \pm7,2	29,6 \pm6,7	91,3 \pm2,3	48,6 \pm4,9
		max	66,9	91,8	95,0	55,9	36,8	93,7	54,3
	adsorbé	min	33,1	8,2	5,0	44,1	63,2	6,3	45,8
		moy	46,0 \pm19,9	14,2 \pm8,8	7,3 \pm2,2	50,0 \pm7,2	70,4 \pm6,7	8,7 \pm2,3	51,4 \pm4,9
		max	72,8	24,2	9,2	57,9	76,4	10,9	54,9
Fine	absorbé	min	55,2	91,7	97,2	65,0	41,4	94,2	60,7
		moy	29,8 \pm14,2	93,6 \pm1,9	97,7 \pm0,5	75,3 \pm9,1	50,5 \pm9,4	92,5 \pm2,7	64,8 \pm4,6
		max	83,4	95,5	98,2	82,4	60,1	94,2	69,8
	adsorbé	min	16,6	4,5	1,8	17,6	40,0	5,8	30,2
		moy	70,2 \pm4,2	6,4 \pm1,9	2,3 \pm0,5	24,7 \pm9,1	49,5 \pm9,4	7,5 \pm2,7	35,2 \pm4,6
		max	44,8	8,3	2,8	35,0	58,7	10,7	39,3

Annexe 16 : Concentrations pseudo-totales moyennes \pm écart type (moy), valeurs minimales (min) et maximales (max) en mg/kg de As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn dans les rhizotrons.

Rhizotrons	Eléments							
	As	Cu	Fe	Mn	Pb	Sb	Zn	
1	min	15,2	12,5	15006	321	43,1	2,1	115
	moy	16,4\pm0,9	13,6\pm0,8	16274\pm983	345\pm19	46,4\pm2,6	2,2\pm0,2	124\pm7
	max	17,8	14,8	17702	374	49,9	2,6	134
2	min	13,9	11,6	15347	328	44,0	1,7	117
	moy	14,8\pm0,9	12,8\pm1,3	16351\pm671	347\pm13	46,5\pm1,6	1,2\pm0,2	124\pm5
	max	16,1	14,4	17115	361	47,7	2,2	130
3	min	13,3	11,2	15900	329	46,5	2,6	105
	moy	14,2\pm0,8	13,2\pm1,3	17287\pm1071	355\pm31	52,6\pm4,2	3,3\pm0,7	114\pm7
	max	15,5	14,6	18656	383	56,8	4,4	122
4	min	14,3	13,2	16557	342	50,1	2,5	107
	moy	15,0\pm0,6	14,3\pm1,0	17259\pm730	356\pm15	51,7\pm1,8	2,8\pm0,2	111\pm4
	max	15,9	15,4	18441	379	54,7	3,1	118
5	min	13,3	12,6	17073	347	102	2,3	116
	moy	15,8\pm1,6	13,3\pm0,9	18147\pm691	365\pm10	112\pm5	3,0\pm0,4	125\pm5
	max	16,1	15,4	18642	379	114	4,4	128
6	min	14,6	12,3	17339	348	108	2,9	122
	moy	15,0\pm0,4	12,9\pm0,4	17621\pm260	354\pm6	110\pm2	3,1\pm0,2	127\pm4
	max	15,6	13,5	17927	363	113	3,4	132
7	min	1081,6	26,5	15360	393	9113	291	2267
	moy	1152\pm50	27,3\pm0,9	15989\pm701	404\pm13	9280\pm231	301\pm9	2356\pm69
	max	1217	28,8	17195	426	9668	313	2458
8	min	1015	23,8	14018	361	8817	278	2158
	moy	1033\pm16	24,3\pm0,5	14237\pm293	372\pm7	8923\pm120	286\pm9	2197\pm37
	max	1050	25,1	14728	380	9110	301	2245

Annexe 17 : Concentrations mobilisables moyennes±écart type (moy), valeurs minimales (min) et maximales (max) en mg/kg de As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn dans les rhizotrons.

Rhizotrons		Eléments						
		As	Cu	Fe	Mn	Pb	Sb	Zn
1	min	0,10	1,7	33,4	31,5	9,3	0,03	23,4
	moy	0,10±0,004	1,9±0,2	35,0±2,1	33,5±4,0	10,4±1,0	0,04±0,004	26,0±2,6
	max	0,11	2,1	38,3	42,2	11,7	0,04	29,3
2	min	0,05	1,9	30,0	36,2	10,9	0,02	26,8
	moy	0,07±0,01	2,0±0,2	35,3±5,4	39,5±10,4	12,2±1,2	0,03±0,003	28,0±1,4
	max	0,08	2,4	44,3	59,4	14,1	0,03	29,7
3	min	0,06	1,8	25,1	29,3	12,2	0,01	21,3
	moy	0,07±0,01	1,9±0,1	29,2±4,1	54,8±1,8	13,1±0,8	0,03±0,01	22,2±0,8
	max	0,09	2,0	35,5	34,2	14,3	0,04	23,1
4	min	0,04	1,8	26,3	24,9	13,3	0,00	20,6
	moy	0,05±0,006	1,8±0,05	26,5±0,2	39,0±11,9	13,8±0,5	0,02±0,01	21,6±1,5
	max	0,06	1,9	26,9	58,2	14,6	0,02	24,2
5	min	0,07	1,8	24,7	23,9	40,7	0,03	23,0
	moy	0,08±0,007	1,8±0,04	26,1±1,1	31,3±1,3	41,9±1,1	0,005±0,005	24,2±0,9
	max	0,08	2,0	35,5	58,2	42,1	0,04	24,8
6	min	0,04	1,8	27,6	28,3	41,5	0,01	23,1
	moy	0,05±0,02	1,9±0,06	33,2±4,7	33,4±37,5	43,8±2,2	0,02±0,01	24,4±1,2
	max	0,07	2,0	38,4	101	46,6	0,03	26,2
7	min	122	5,2	46,3	28,3	3250	15,8	363
	moy	132±11	5,4±0,3	49,6±5,4	41,3±2,1	3383±160	16,3±0,5	375±11
	max	148	6,0	59,1	32,7	3628	17,2	390
8	min	152	5,6	46,0	53,7	3488	15,5	375
	moy	155±3	5,6±0,07	48,4±1,9	44,3±2,2	3555±52	16,6±1,1	383±7
	max	159	5,7	51,0	58,9	3629	18,3	388

Annexe 18 : Concentrations de As, Pb, Sb et Zn (en mg/kg) dans les feuilles et les tiges des individus de romarins des rhizotrons.

Individus	Eléments selon les organes							
	Feuilles				Tiges			
	As	Pb	Sb	Zn	As	Pb	Sb	Zn
1A	0,93	5,29	0,16	203,34	0,31	3,82	0,16	83,93
1B	0,18	3,30	0,09	70,99	0,53	7,83	0,55	61,35
1C	0,24	3,97	0,01	93,22	0,26	6,39	0,16	44,45
1D	0,09	5,41	0,40	104,21	0,16	3,29	0,10	54,57
1E	0,04	2,66	0,13	161,29	0,24	3,58	0,17	89,21
2A	0,53	2,93	0,43	61,28	0,12	1,77	0,37	58,47
2B	0,23	3,53	0,17	61,61	0,28	5,58	0,41	38,98
2C	0,19	5,12	0,11	110,34	0,18	1,75	0,34	42,63
2D	0,13	3,84	0,04	105,82	0,07	2,25	0,14	58,63
2E	0,08	3,14	0,24	93,83	0,34	13,01	8,49	198,72
3A	0,07	4,19	0,09	90,60	0,07	2,45	0,73	71,54
3B	0,11	3,20	0,07	82,10	0,22	5,03	0,24	50,73
3C	0,23	4,53	0,01	105,77	0,39	7,32	0,14	54,87
3D	0,13	3,40	0,10	100,69	0,15	2,60	0,09	49,89
3E	0,04	4,15	0,41	90,90	0,11	0,91	0,07	56,96
4A	na	na	na	na	na	na	na	na
4B	0,34	5,50	0,03	69,17	0,20	5,24	0,11	49,14
4C	0,06	2,71	0,07	82,73	0,00	0,53	0,16	42,91
4D	0,36	4,13	0,11	131,23	0,04	0,48	0,08	71,93
4E	0,06	2,45	0,17	93,20	0,18	1,61	0,07	66,57
5A	0,75	5,83	0,84	60,64	0,45	5,77	0,22	46,25
5B	0,65	7,38	0,10	112,72	0,79	10,39	0,87	70,86
5C	0,08	3,56	0,00	73,45	1,37	4,42	0,23	67,72
5D	0,10	4,02	0,22	81,63	2,48	5,16	1,15	59,75
5E	1,01	7,07	0,52	111,75	1,43	19,32	0,80	0,70
6A	0,08	3,14	0,11	109,30	0,32	3,38	0,11	58,37
6B	0,47	9,35	0,18	43,76	1,11	26,43	0,57	58,18
6C	0,10	3,47	0,11	105,26	0,25	2,58	0,04	56,90
6D	0,20	8,91	0,06	115,22	0,19	5,02	0,15	66,05
6E	0,00	35,23	-0,07	342,14	1,51	18,25	0,31	70,02
7A	2,07	12,89	1,10	63,52	1,65	35,94	0,94	87,63
7B	4,90	28,09	1,16	86,48	4,80	58,52	1,03	69,44
7C	5,97	25,30	1,81	132,24	8,19	119,69	2,77	103,60
7D	7,30	45,86	2,03	102,95	2,39	25,95	1,17	75,67
7E	12,58	138,24	5,04	122,39	11,78	140,03	7,69	131,13
8A	3,37	21,94	1,20	82,01	0,75	14,23	0,17	69,43
8B	3,31	24,06	1,29	129,18	2,66	64,44	1,44	82,68
8C	4,25	22,83	1,08	177,96	3,13	61,53	2,15	105,52
8D	3,72	23,96	1,04	117,20	5,42	58,63	1,87	91,46
8E	3,82	32,66	1,72	134,65	4,50	85,22	1,60	125,98

na : non analysé. En gras, individus morts.

Annexe 19 : Concentrations moyennes±écart type (moy), valeurs minimales (min) et maximales (max) en mg/kg de As, Cu, Fe, Mn, Pb, Sb et Zn dans racines et les parties aériennes des romarins des rhizotrons.

Rhizotrons		Eléments en fonction de l'organe							
		Racine				Parties aériennes			
		As	Pb	Sb	Zn	As	Pb	Sb	Zn
1	min	1,38	6,21	0,63	97,5	0,11	3,01	0,07	67,3
	moy	2,25±1,22	11,7±8,1	1,41±0,55	159±74	0,30±0,24	4,45±0,82	0,19±0,09	103±40
	max	4,41	25,9	2,13	259	0,69	5,04	0,28	157
2	min	1,07	9,25	0,67	100	0,10	2,48	0,08	52,9
	moy	1,19±0,13	14,1±6,3	1,43±0,50	173±46	0,22±0,10	4,16±1,70	0,87±1,43	83,9±31,9
	max	1,38	24,6	2,04	224	0,37	6,93	3,41	134
3	min	1,18	5,88	0,98	81,6	0,07	2,91	0,06	70,0
	moy	1,90±0,79	8,85±3,95	1,27±0,32	140±52	0,14±0,09	3,80±1,08	0,18±0,12	79,7±6,2
	max	2,94	15,0	1,78	219	0,29	5,60	0,34	86,2
4	min	1,30	10,4	0,84	118	0,04	1,87	0,06	61,5
	moy	1,91±0,55	14,3±3,80	1,29±0,57	168±64	0,17±0,11	3,03±1,62	0,10±0,03	80,1±21,0
	max	2,42	18,6	2,03	252	0,28	5,40	0,13	108
5	min	1,09	16,4	0,49	82,7	0,57	3,89	0,09	55,1
	moy	1,14±0,06	18,6±3,2	0,76±0,38	102±27	0,82±0,26	6,90±3,27	0,46±0,23	73,1±15,0
	max	2,42	18,6	2,03	252	1,17	11,8	0,63	96,6
6	min	0,56	36,9	0,54	114	0,16	3,13	0,08	49,3
	moy	1,08±0,41	44,18±7,6	0,74±0,27	192±82,0	0,37±0,26	11,7±10,8	0,14±0,11	112±73
	max	1,56	54,1	1,12	292	0,72	28,7	0,33	237
7	min	222	2387	52,8	602	1,91	21,8	1,04	72,8
	moy	276±61	2848±481	62,3±10,6	723±142	6,26±3,81	60,1±46,3	2,42±2,09	98,4±24,0
	max	340	3311	72,2	896	12,3	139	6,06	126
8	min	70,40	2303	30,4	477	2,37	19,0	0,80	77,2
	moy	178±94	3105±848	52,2±19,5	735±189	3,54±0,82	37,29±12,1	1,34±0,33	115±27
	max	307	4217	76,2	923	4,37	52,9	1,68	150

Annexe 20 : Concentrations moyennes \pm écart type (moy), valeurs minimales (min) et maximales (max) d'oxygène consommé en mg O₂/g de sol sec/ jour par les sols des rhizotrons.

Rhizotrons	Consommation d'O ₂ (mg O ₂ /g sol sec/j)		
	min	moyenne	max
1	3,75	4,17\pm0,39	4,81
2	3,43	6,08\pm1,69	7,39
3	3,47	3,90\pm0,35	4,23
4	3,46	5,53\pm1,23	6,45
5	3,05	4,07\pm0,62	4,63
6	4,22	6,28\pm1,89	8,17
7	15,52	16,28\pm1,06	18,16
8	26,72	27,84\pm0,98	28,90