UNIVERSITE ECOLOGIE BRETAGNE GEOSCIENCES LOIRE AGRONOMIE ALIMENTATION

UNIVERSITÉ DE NANTES

THESE DE DOCTORAT EN COTUTELLE

DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 600

Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation

Spécialité : « *Biologie des organismes* »

ET

L'UNIVERSITE DE SFAX

L'ÉCOLE NATIONALE D'INGENIEURS DE SFAX

Ecole doctorale Sciences et Technologies

Spécialité : « *Génie Biologique* »

Par

Jihen JALALI

Contribution à la gestion environnementale des zones de stockage des phosphogypses en Tunisie Traitement par association bioaugmentation / phytoextraction

Thèse présentée et soutenue à « Nantes »**,** le « 3 décembre 2018 »
Unités de recherche : *LPG-Nantes (UMR 6112) ; IPEIS (LASED)*

Rapporteurs avant soutenance :

Isabelle LAFFONT	Professeur, Université de Marseille
Haïtham SGHAIER	Maître de conférences, Université de Tunis

Composition du Jury :

Président :	Philippe DELAVAULT	Professeur, Université de Nantes
Examinateur :	Chedly ABDELLY	Professeur, Université de Tunis
Rapporteurs :	Isabelle LAFFONT	Professeur, Université de Marseille
	Haïtham SGHAIER	Maître de conférences, Université de Tunis
Dir. de thèse :	Thierry LEBEAU	Professeur, Université de Nantes
Co-dir. de thèse :	Emna AMMAR	Professeur, Université de Sfax

Thèse de doctorat en cotutelle

Présentée par

Jihen Jalali

En vue de l'obtention du grade de Docteur
De

L'Université de Sfax
Et
L'Université de Nantes

Contribution à la gestion environnementale des zones de stockage des phosphogypses en Tunisie-Traitement par association bioaugmentation / phytoextraction

Composition du jury de thèse :

Président :	**Philippe DELAVAULT**	Professeur, Université de Nantes
Examinateur :	**Chedly ABDELLY**	Professeur, Université de Tunis
Rapporteurs :	**Isabelle LAFFONT**	Professeur, Université de Marseille
	Haïtham SGHAIER	Maître de conférences, Université de Tunis
Dir. de thèse :	**Thierry LEBEAU**	Professeur, Université de Nantes
Co-dir. de thèse :	**Emna AMMAR**	Professeur, Université de Sfax

AVANT-PROPOS

Cette thèse de Doctorat a été réalisée dans le cadre d'une convention de cotutelle entre l'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, et l'université de Nantes et entrepris en partie au Groupe Chimique Tunisien (GCT), avec le soutien financier du Ministère tunisien de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, du Groupe Chimique Tunisien et du Conseil régional des Pays de la Loire (dans le cadre du projet POLLUSOLS-OSUNA).

REMERCIEMENTS

C'est avec mon enthousiasme le plus vif et le plus sincère que je voudrai rendre mérite à tous ceux qui à leur manière m'ont aidé à bien mener ce travail. J'espère que ces lignes exprimeront convenablement ma gratitude à toutes les personnes qui ont contribué, à quelque niveau que ce soit, à l'achèvement de ce travail. J'espère surtout n'oublier aucun de vous… Au cas où, merci à toutes et tous de m'avoir agréablement accompagnée et grandement aidé en cours de ces quelques années inoubliables.

Avant tout je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné la force, le courage, la santé et la patience pour pouvoir accomplir ce travail.

J´exprime ma plus profonde reconnaissance au Pr. Thierry Lebeau mon directeur de thèse. Merci Thierry, pour m´avoir épaulé tout au long de ce travail, dans les réussites et d'autant plus dans les échecs, soutenu et orienté avec discernement, tout en me laissant une grande liberté dans les décisions à prendre et les propositions à amener. Merci pour m´avoir fait profiter de tes connaissances et pour ton soutien précieux lors de la rédaction de cette thèse. Pour tout cela, mais aussi pour ta patience, ton optimisme et tes grandes qualités scientifiques et humaines, je te remercie de tout cœur.

Mes plus sincères remerciements s'adressent également au Pr. Emna Ammar, ma co-directrice de thèse, Merci Madame, pour la confiance que vous m'avez accordée, pour votre soutien, vos critiques constructives, vos conseils qui m'ont permis d'évoluer dans ma vision de la recherche et dans la façon de la mener. Merci aussi d'avoir fait le nécessaire pour tous les problèmes administratifs.

J'adresse mes respectueux remerciements aux membres du jury qui me font l'honneur de juger ce travail de thèse : Pr. Chedly Abdelly, Pr. Philippe Delavault, Dr. Haïtham Sghaier et Pr Isabelle Laffont.

Je remercie le membre de mon Comité de Suivi Individuel : Pr. Yves Andres, Dr. David Huguenot et Pr. Neji Gharsallah qui ont accepté de me faire partager leurs conseils et leur réflexion sur ce travail.

Je remercie Mr. Olivier Grasset, de m'avoir accueillie dans le laboratoire de Planétologie et Géodynamiques (LPG). Je remercie également Mr. Lazhar Koubaa directeur centrale de la recherche scientifique du Groupe Chimique Tunisien (GCT) ainsi que les responsables des laboratoires du GCT notamment pour l'accueil chaleureux et la générosité qu'ils m'ont offerte au sein de ses laboratoires.

Je remercie Dr Didier Lièvremont (UMR CNRS 7156 - Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie) pour nous avoir fourni la souche Pseudomonas xanthamarina.

La qualité et la continuité des données présentées dans cette thèse sont le fruit d'un travail d'équipe.

Un grand merci à tous ceux qui font partie ou qui sont passés par l'équipe dépollution biologique des sols. J'ai pour cela pleinement profité de la présence et de l'efficacité de Pierre GAUDIN, Hervé CAPIAUX, Armelle BRAUD, Alexandra LEPINAY, Dorine BOUQUET, Alice HAZOTTE, Sitraka RANDRIAMAMONJY et Chloé BESNARD grâce à vous j'ai mesuré l'importance du travail en équipe. La force d'être uni fait toujours naître de grandes choses… Merci à vous.

Merci Pierre pour ton soutien technique, tes conseils pertinents et pour les nombreuses discussions que nous avons eues qui ont contribué à m'ouvrir vers le monde de la recherche appliquée, pour ton accueil et ta disponibilité dont j'ai parfois peut-être abusé… sans toi la mise en place et le suivi des expérimentations n'auraient pas été réalisables. Tu m'as appris toujours que « le mieux est l'ennemi de bien » Merci.

Je remercie infiniment tout le personnel et les techniciens du département de Génie Biologique à l'ENIS. Il n'y a pas de termes assez forts pour décrire le profond respect et l'admiration que je vous porte

Un Grand merci à tous les membres du LPG qui ont contribué de loin ou de près à mon intégration au sein de leur laboratoire et au bon déroulement de ma thèse dans une ambiance familiale

Un merci particulier à Esanam pour son amitié, sa bonne humeur, son soutien et sa gentillesse. Merci pour tous les bons moments passés ensemble.

Un deuxième merci particulier à Raoudha, Nesrine, Yosra, Fatma, Mouna, Aycha, Zahra, Imène, Marwa, Ferdawes, Maha. Voilà j'y suis, c'est la fin ! Les années sur les bancs de l'ENIS paraissent loin aujourd'hui ! Merci pour votre amitié, vos encouragements, votre soutien, votre écoute. Je vous souhaite un futur à la hauteur de vos attentes !

Mes plus sincères et profondes pensées s'adressent à ma famille. Maman et Papa, je tiens à vous féliciter, car c'est d'abord votre réussite avant d'être la mienne. Je vous remercie du plus profond de mon cœur pour votre amour quotidien pour votre présence dans tous les moments et pour vos sacrifices consentis pour ma réussite. Avec mes frères Houssem et Radhwen et ma sœurette Ibtissem, même à des milliers de kilomètres, vous avez toujours été là pour moi en toutes circonstances. Merci pour simplement m'avoir toujours comprise et soutenue dans mes choix et pour m'avoir donné la force de réaliser ce travail.

Enfin, Merci Mohamed (Momo). Je sais que ces derniers temps ça n'a pas été facile pour toi. Merci de me supporter, d'être aussi optimiste et d'avoir su calmer mes doutes. Tu as su me changer les idées lorsqu' il le fallait ! Merci pour ta présence car je pense que sans toi les choses auraient été bien plus difficiles. Le meilleur reste à venir Inch'Allah !

Je dédie ce travail à mon très cher pays « La Tunisie ».

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 6

1 Les éléments traces métalliques 6

1.1 Notion d'éléments traces métalliques (ETM) 6

1.2 Terres rares (TR) 6

1.2.1 Définition 6

1.2.2 Principales applications des terres rares 8

1.2.3 Réserves et productions des terres rares dans le monde 11

1.3 Différentes origines des éléments traces dans le sol 13

1.3.1 Origines naturelles 13

1.3.2 Origine anthropique 14

1.4 Risques écologique ou sanitaire des ETM 15

1.4.1 Ecotoxicité des ETM 15

1.4.2 Réglementation 18

2 Industrie des engrais phosphatés en Tunisie 22

2.1 Présentation de l'activité de transformation du phosphate en Tunisie 22

2.2 Production de l'acide phosphorique par voie humide 23

2.3 Emissions et rejets chimiques 25

3 Les phosphogypses (PG) : les sous-produits principaux de la transformation du phosphate 26

3.1 Généralités sur les phosphogypses 26

3.2 Composition élémentaire des phosphogypses 26

3.3 Concentration en éléments traces métalliques dont les terres rares dans les phosphogypses 28

3.4 Les phosphogypses et la radioactivité 31

3.5 Gestion des phosphogypses 32

4 Mobilité des éléments traces métalliques (ETM) 32

4.1 Notion de la mobilité 32

4.1.1 Interaction entre les phases minérales et les éléments traces métalliques 33

4.1.2 Comportement géochimique de certains éléments traces métalliques 35

4.1.2.1 Le cadmium et le strontium 35

4.1.2.2 Les terres rares 36
4.2 Biodisponibilité des éléments traces métalliques 37
4.2.1 Notion de la biodisponibilité 37
4.2.2 Facteurs influençant la biodisponibilité 37
4.2.2.1 Facteurs abiotiques 37
4.2.2.2 Facteur biotique : l'activité biologique (les micro-organismes et les plantes) 39
4.3 Phytodisponibilité des ETM 42
4.3.1 Notion de la phytodisponibilité 42
4.3.2 Mécanismes de prélèvement des ETM incluant les terres rares par les plantes 42
4.3.2.1 Prélèvement via la voie atmosphérique : absorption par les feuilles 42
4.3.2.2 Prélèvement racinaire : Absorption par les racines et translocation vers les parties aériennes 43
4.3.3 Variation de la réponse des plantes vis-à-vis de la présence des polluants (toxicité et tolérance) 44
4.4 Evaluations de la spéciation, la mobilité et la biodisponibilité des ETM 46
4.4.1 Méthodes physiques 46
4.4.2 Méthodes chimiques 47
4.4.2.1 Extractions chimiques simples 47
4.4.2.2 Extractions séquentielles 48
4.4.3 Méthodes biologiques 50
5 Technique de dépollution des déchets industriels 50
5.1 Méthodes physico-chimiques 50
5.2 Méthodes biologiques 52
5.2.1 Bioremédiation 52
5.2.1.1 La bioaugmentation 53
5.2.1.2 La biostimulation 53
5.2.2 Phytoremédiation 54
5.2.2.1 La phytostabilisation 55
5.2.2.2 La rhizofiltration 55
5.2.2.3 La phytovolatilisation 55
5.2.2.4 La phytodégradation 55
5.2.2.5 La phytoextraction 55
5.2.2.6 Les avantages et les limites de la phytoextraction 57
6 Amélioration du procédé de traitement par phytoextraction 59
6.1 La domestication et le croisement 59
6.2 Amélioration génétique classique et utilisation du génie génétique 59
6.3 Action sur la complexation des métaux 59
6.3.1 Phytoextraction assistée par des chélateurs chimiques de métaux 59
6.3.2 Phytoextraction couplée à la bioaugmentation 60
MATERIEL ET METHODES 64

1 Présentation générale des sites d'étude 64
1.1 Le site de l'usine de Sfax 64
1.2 Le site de l'usine de M'dhilla 65
1.3 Le site de l'usine de Gabès 65
2 Echantillonnages 66
2.1 Sol et sédiment 66
2.2 La végétation 67
3 Caractérisation et analyses des échantillons 68
3.1 Caractérisation physico-chimique des échantillons de sols et de sédiments communs à l'ensemble des expériences 68
3.1.1 Détermination de l'humidité relative (HR) 70
3.1.2 Détermination du potentiel d'hydrogène (pH_{eau}) 70
3.1.3 Détermination de la capacité de rétention (CR) 70
3.1.4 Analyse des éléments trace métalliques dans les sols / sédiment 71
3.1.4.1 Eléments trace métalliques totaux 71
3.1.4.2 Extraction simple des fractions phytodisponibles en éléments traces métalliques 73
3.1.4.2.1 Fraction mobile 73
3.1.4.2.2 Fraction mobilisable 73
3.1.4.2.3 Extraction séquentielle des fractions des éléments traces métalliques 74
3.2 Caractérisation des échantillons végétaux 74
3.2.1 Préparation des échantillons végétaux 74
3.2.2 Analyse des éléments traces métalliques dans les végétaux 75
3.2.3 Indices d'accumulation des éléments traces métalliques dans les végétaux 76
3.3 Caractérisation de la composante bactérienne des échantillons de sols 76
3.3.1 Enrichissement de la biomasse des échantillons de sol 77
3.3.2 Extraction d'ADN 77
3.3.3 Dosage ADN 77
3.3.4 PCR et TTGE 77
3.3.5 Indice de diversité spécifique de Shannon-Weaver (H') 78
4 Culture des plantes 79
4.1 Espèces végétales étudiées 79
4.1.1 Le trèfle violet 79
4.1.2 Le tournesol 79
4.2 Mode de cultures 80
4.2.1 Cultures en hydroponie 80
4.2.2 Cultures en pot 81
5 Cultures des bactéries 81

5.1 Isolement des bactéries cultivables des sols collectés 81
5.2 Milieux de cultures bactériennes 82

6 Mises au point des tests pour la sélection du couple plantes/bactéries 82

6.1 Phytoextraction des éléments traces métalliques par Trifolium pratense et Helianthus annuus 82

6.2 Sélection des souches bactériennes pour la bioaugmentation 85
6.2.1 Préculture des souches bactériennes 85
6.2.2 Capacité à mobiliser les ETM 85
6.2.2.1 Croissance dans les extraits de PG 85
6.2.2.2 Test de bioaugmentation en tube de PG-Terreau 87
6.2.2.2.1 Préparation des tubes de mélange PG-Terreau 87
6.2.2.2.2 Préparation des suspensions bactériennes et bioaugmentation 89
6.2.2.2.3 Analyse post-Bioaugmentation 90
6.2.3 Rôle dans la promotion de la croissance des plantes (PGPR) 90
6.2.3.1 Production de sidérophores 90
6.2.3.2 Production d'acide indole acétique (AIA) 91
6.2.3.3 Biodégradation de l'ACC 93

7 Phytoextraction couplée à la bioaugmentation des ETM 95

7.1 Préparation du mélange PG-Terreau 95

7.2 Plan d'expérience et préparation des pots 95

7.3 Repiquage et suivi des cultures de plantes 97

7.4 Préparation de l'inoculum et inoculation des pots 98
7.4.1 Préculture et préparation de l'inoculum bactérien 98
7.4.2 Inoculation des pots 98

7.5 Récolte des échantillons 99

8 Analyses statistiques 100

RESULTATS ET DISCUSSION 102

CHAPITRE 1 : Devenir et transfert des éléments traces métalliques dans les sols environnant les terrils des phosphogypses en Tunisie 102

Résumé 102

1 Introduction 104

2 Matériel et méthodes 106

2.1 Sites d'étude 106

2.2 Echantillonnage 107

2.3 Analyses chimiques 108

2.4 Structure de la communauté bactérienne par PCR-TTGE 110
2.4.1 Extraction d'ADN 110
2.4.2 Analyse de l'ADNr 16S par Electrophorèse temporelle sur gel à gradient thermique (TTGE) 110
2.4.3 Indice de diversité spécifique de Shannon-Weaver (H') 111
2.5 Analyse Statistique 111

3 Résultats et discussion 112

3.1 Caractéristiques du sol près des terrils de phosphogypse 112
3.2 Teneur en éléments traces métalliques dans les profils de sol 117
3.3 Spéciation chimique des éléments traces métalliques dans les échantillons de sols 119
3.4 Teneur en éléments traces métalliques dans les végétaux 121
3.5 Communautés bactériennes dans les sols aux alentours des terrils de PG 127

4 Conclusion 131

CHAPITRE 2 : Screening rapides d'isolats bactériens pour la mobilisation d'éléments traces par bioaugmentation de phosphogypses 132

Résumé 132

1 Introduction 133

2 Matériel et méthodes 135

2.1 Isolement des bactéries cultivables 135
2.2 Tests biochimiques pour la sélection des souches 135
2.2.1 Mise au point des tests de sélections en microplaque 135
2.2.2 Tolérance et mobilisation des éléments traces métalliques 136
2.2.3 Rôle des bactéries dans la croissance des plantes et la mobilisation des ETM 137
2.2.3.1 Production de sidérophores 137
2.2.3.2 Production d'acide indole acétique (AIA) 138
2.2.3.3 Biodégradation de l'ACC 139
2.2.4 Evaluation du potentiel des souches par scoring et identification 139
2.3 Test de bioaugmentation en pot de PG 140
2.4 Analyses chimiques 141
2.4.1 Extractions simples des fractions phytodisponibles des éléments traces métalliques 141
2.4.1.1 Fraction mobile 141
2.4.1.2 Fraction potentiellement mobilisable 141
2.4.2 Détermination des métaux totaux 142
2.5 Analyses Statistiques 142

3 Résultats et discussion 142

3.1 Isolement des bactéries cultivables 142
3.2 Tests biochimiques pour la sélection des isolats 143
3.2.1 Croissance sur milieu de culture à l'extrait de phosphogypse (PG) et tolérance aux éléments traces métalliques 143
3.2.2 Production de métabolites 144
3.2.2.1 Production de sidérophores 144
3.2.2.2 Production d'AIA 146
3.2.2.3 Dégradation d'ACC désaminase 147
3.2.2.4 Sélection des souches bactériennes pour la bioaugmentation 147
3.2.3 Test de la bioaugmentation 150

4 Conclusion 152

CHAPITRE 3 : Procédé de phytoextraction couplé à la bioaugmentation pour le traitement du Cd, Sr et la valorisation de terres rares dans des phosphogypses. 153

Résumé 153

1 Introduction 155

2 Matériel et méthodes : 157

2.1 Culture des plantes 157
2.1.1 Désinfection et germination des graines 157
2.1.2 Pré-culture des plantes en hydroponie 157

2.2 Culture en pot du mélange phosphogypse-terreau 158

2.3 Culture des souches et préparation des inoculas bactériens 160
2.3.1 Description des souches 160
2.3.2 Préparation des inoculas : 160

2.4 Expérimentation 161
2.4.1 Phytoextraction des ETM par Trifolium pratense et Helianthus annuus : culture en hydroponie 161
2.4.2 Phytoextraction couplée à la bioaugmentation des ETM : Culture en pot 162

2.5 Récolte des échantillons 163

2.6 Analyses 163
2.6.1 Analyse des Eléments Trace Métalliques totaux dans les supports de culture et les plantes 163
2.6.2 Analyse des Eléments Trace Métalliques totaux et des extraits au $CaCl_2$ et EDTA du mélange PG-terreau 164

2.7 Traitement des résultats 165
2.7.1 Indices d'accumulation des éléments traces métalliques dans les végétaux 165
2.7.2 Analyse Statistique 165

3 Résultats et discussion 165

3.1 Evaluation du potentiel d'accumulation des éléments traces métalliques par des plantes commerciales (Trifolium pratense et Helianthus annuus) en hydroponie.....165

3.2 Phytoextraction couplée à la Bioaugmentation des élements traces métalliques.....171

4 Conclusion : 179

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....181

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....189

ANNEXES.....211

TABLE DES ABREVIATIONS.....214

TABLE DES ACRONYMES 216

VALORISATION SCIENTIFIQUE 217

LISTE DES FIGURES

Partie 1

Figure 1.1. Tableau de Mendeleïev situant les Terres Rares.

Figure 1.2. Evolution de la consommation et de la production des terres rares, en milliers de tonnes (Kt) d'oxydes de Terres rares. Données 2006-2016 et estimation/ prévision 2017 à 2025.

Figure 1.3. Les principales réserves et productions de terres rares des principaux pays ayant exploité ces minéraux.

Figure 1.4. Cycle d'apport des éléments traces métalliques dans les sols.

Figure 1.5. Schéma typique du procédé humide de la fabrication de l'acide phosphorique.

Figure 1.6. Localisation et mobilité des métaux dans le sol.

Figure 1.7. Différentes formes et mécanismes de fixation des ETM dans le sol.

Figure 1.8. Spectres de TR ; normalisation par rapport au PAAS pour les sols de trois études différentes.

Figure 1.9. Interactions sol-plante dans la rhizosphère.

Figure 1.10. Schéma de synthèse du transfert des terres rares (TR) à l'intérieur de la plante, des racines via les deux voies de transfert (apoplastique et symplastique), puis via le xylème jusque dans les feuilles.

Figure 1.11. Catégories de plantes poussant sur des sols métallifères.

Figure 1.12. Méthode d'extraction séquentielle BCR.

Figure 1.13. Méthode d'extraction séquentielle adaptée aux terres rares.

Figure 1.14. Exemples de quelques mécanismes bactériens de résistances aux métaux.

Figure 1.15. Les différentes stratégies de phytoremédiation.

Figure 1.16. Principe de la phytomine.

Figure 1.17. Schéma récapitulatif des actions des bactéries favorisant la croissance des plantes, sur la mobilité des éléments traces métalliques (ETM) dans la

rhizosphère.

Partie 2

Figure 2.1. Configuration plane du terril de phosphogypse de l'usine de Sfax et localisation des points d'échantillonnages de sols (SSP1-SSP4) et de plantes (PS1-PS4).

Figure 2.2. Configuration plane du terril des phosphogypses de l'usine de M'dhilla et localisation des points d'échantillonnages de sols (SGP1-SGP4) et de plantes (PG1-PG4).

Figure 2.3. Configuration plane du port de Gannouche, lieu de déversement des phosphogpyses à Gabès et localisation des points d'échantillonnages de sédiments marins (SGB1-SGB6).

Figure 2.4. Espèces végétales collectées à proximité des terrils de Sfax et de M'Dhilla.

Figure 2.5. Représentation schématique du protocole de traitement et d'analyses des échantillons de sols et de sédiment.

Figure 2.6. Minéralisation des échantillons par voie acide.

Figure 2.7. Représentation schématique du protocole de traitement et d'analyse des échantillons végétaux récoltés après culture en hydroponie ou en pot de mélange PG-Terreau.

Figure 2.8. Présentation du système de culture en hydroponie pour *Helianthus annus* et *Trifolium pratense.*

Figure 2.9. Purification des souches bactériennes isolées des phosphogypses tunisiens par repiquage par épuisement en stries sur milieu solide (souche M1B1).

Figure 2.10. Schéma du dispositif expérimental de phyotextraction en hydroponie pour *Trifolium pratense* et *Helianthus annuus* dans un milieu LPP (Low phosphate, low pH).

Figure 2.11. Cultures hydroponiques de Trèfle et de Tournesols dernier jour d'exposition des plantes aux ETM (J12).

Figure 2.12. Test CAS-Fe en microplaque : estimation de la production de sidérophores totaux dans le surnageant d'une culture en milieu sans fer (CAA).

Figure 2.13. Gammes et droites étalons de l'Absorbance à 451 nm de l'acide indole

acétique en fonction de sa concentration (mM) avec et sans éléments traces métalliques.

Figure 2.14. Gammes et droites étalons de l'absorbance à 541 nm de l'α-cétobutyrate en fonction de sa concentration (µM), sans et en présence des éléments traces métalliques.

Figure 2.15. Phytoextraction couplée à la bioaugmentation, les 5 réplicats des pots de mélanges PG-Terreau à J0 : Témoin non inoculé (NPNI) et pots inoculés (NPIS1, 2 et 3).

Figure 2.16. Schéma du dispositif expérimental de couplade de la phytoextraction en pot dans un mélange Phosphogypse-Terreau, sans et avec bioaugmentation par 3 souches bactériennes pré-sélectionnées,

Figure 2.17. Phytoextraction couplée ou non à la bioaugmentation : pots à J5 de *Trifolium pratense* dans l'enceinte phytotronique, avant inoculations.

Figure 2.18. Phytoextraction couplée ou non à de la bioaugmentation : pots inoculés (PIS) et non inoculés (PNI) de *Trifolium pratense* à J final.

Partie 3

Chapitre 1

Figure 3.1. Evolution de la distribution verticale des éléments traces métalliques (Cd, Ce, La, Nd, Y et Sr) près des zones de stockage des phosphogypse des sites de Sfax (SSP1 à SSP4) et M'dhilla (SMP1 à SMP4).

Figure 3.2. Schéma d'extraction séquentielle des element traces métalliques presents dans les échantillons de sol en utilisant une méthode nouvellement développée adaptée aux éléments sélectionnés (terres rares)

Figure 3.3. Concentration des éléments traces métalliques (ETM) en mg/Kg MS dans les parties aériennes (PA) et les parties racinaires (PR) de plantes récoltées dans les sites contaminés de M'dhilla et de Sfax et dans des sites témoins.

Figure 3.4. Analyse PCR-TTGE (Electrophorèse temporelle sur gel à gradient thermique) de l'ARNr 16S

Figure 3.5. Biplot d'analyse en composantes principales (ACP) montrant les relations entre la structure de la communauté bactérienne (indice de Shannon) et la composition physico-chimique des échantillons de sol.

Chapitre 2

Figure 4.1. Biomasse moyenne (mesurée à l'aide de la densité optique (DO) à 620 nm) des 32 isolats bactériens cultivés dans le milieu MLM enrichi avec un extrait de phosphogypse.

Figure 4.2. Production spécifique de pyoverdine (a) et de sidérophores totaux (b) des 8 isolats bactériens testés : G1B1, G1B2, G1B3, G3B2, M1B4, M1B5, M7B2, S3B1 ainsi que 2 bactéries productrices des sidérophores, *Pseudomonas aeruginosa (Pa) et Pseudomonas fluorescens (Pf)* dans le milieu de culture Casamino acid (CAA) en présence ou non du mélange d'ETM. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés par ANOVA.

Figure 4.3. Production spécifique d'acide indole acétique (AIA) des 8 isolats bactériens testés : G1B1, G1B2, G1B3, G3B2, M1B4, M1B5, M7B2, S3B1 ainsi que 2 bactéries productrices des sidérophores, *Pseudomonas aeruginosa (Pa) et Pseudomonas fluorescens (Pf)* dans le milieu de culture DF AIA, en présence ou non du mélange d'ETM. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés par ANOVA.

Figure 4.4. Dégradation spécifique de l'enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase des 8 isolats bactériens testés : G1B1, G1B2, G1B3, G3B2, M1B4, M1B5, M7B2, S3B1 ainsi que 2 bactéries productrices des sidérophores, *Pseudomonas aeruginosa (Pa) et Pseudomonas fluorescens (Pf)* dans le milieu de culture DF modifié (DF ACC) en présence ou non du mélange d'ETM. Les lettres représentent les groupes homogènes déterminés par ANOVA.

Figure 4.5. Teneurs en Cd, Ce, La, Nd et Sr totaux, extractibles au $CaCl_2$ et à l'EDTA après 3 semaines d'incubation sans bioaugmentation (T) et après inoculation du mélange PG-Terreau avec les deux isolats bactériens pré-sélectionnées M1B4 et S3B1 et un témoin « positif » *Pseudomonas*.

Chapitre 3

Figure 5.1. Concentrations des éléments traces métalliques (ETM) en mg/Kg MS dans les parties aériennes (PA) et les parties racinaires (PR) chez *Trifolium pratense* et *Helianthus annuus* cultivées en hydroponie en milieu Low phosphate, low pH (LPP).

Figure 5.2. Concentration des éléments traces métalliques (ETM) en mg/Kg MS dans les parties aériennes (PA) et les parties racinaires (PR) chez *Trifolium pratense* et *Helianthus annuus* cultivées sur un mélange PG -Terreau bioaugmenté (PI) ou non (PNI) par les 3 souches : *Bacillus cereus* S3B1(PIS1) ; *Bacillus cereus* M1B4 (PIS2) et *Pseudomonas Xanthamarina* (PIS3).

Figure 5.3. Concentration des éléments traces métalliques (ETM) Totaux, extractibles au $CaCl_2$ et à l'EDTA en mg/Kg du mélange PG-Terreau après 4 semaines d'incubation : non planté inoculé (bioaugmenté) avec les 3 souches : *Bacillus cereus* S3B1(NPIS1) ; *Bacillus cereus* M1B4 (NPIS2) et *Pseudomonas Xanthamarina* (NPIS3) ; planté avec *Helianthus annus* ou *Trifolium pratense non inoculé (non bioaugmenté)(PNI) ; planté* avec *Helianthus annus* ou *Trifolium pratense inoculé avec* les 3 souches : *Bacillus cereus* S3B1(PIS1) ; *Bacillus cereus* M1B4 (PIS2) et *Pseudomonas Xanthamarina* (PIS3) plus un témoin non planté non inoculé (NPNI)

Figure 5.4. Effet de des souches S3B1 (PIS1), M1B4 (PISS2) et *Pseudomonas Xanthamarina* (PIS3) sur la croissance des plants de (a) tournesol et (b) de trèfle entre l'inoculation (ti) et la récolte après 4 semaines de culture (tf) sur le mélange PG-Terreau.

LISTE DES TABLEAUX

Partie 1

Tableau 1.1. Abondance des terres rares dans la croûte terrestre et leurs principales utilisations.

Tableau 1.2. Principaux risques environnementaux associés aux mines de terres rares.

Tableau 1.3. Effets physiologiques des terres rares sur la germination des graines et l'élongation des racines des plantes.

Tableau 1.4. Composition élémentaire des phosphogypses.

Tableau 1.5. La composition élémentaire majeur en pourcentage de différentes sources de phosphogypses.

Tableau 1.6. Concentration en éléments traces rencontrés dans le PG tunisien exprimée en (mg/kg) comparé à des valeurs de fond géochimique dans les sols français (ASPITET) et à des valeurs seuils d'intervention ou qui règlementent l'usage des boues de stations d'épuration.

Tableau 1.7. Activité radioactive des radioéléments dans les minerais de phosphate et dans le Phosphogypse.

Tableau 1.8. Influence des propriétés du sol sur la mobilité des métaux.

Tableau 1.9. Mécanismes de mobilisation et immobilisation des éléments traces métalliques par les microorganismes du sol.

Tableau 1.10. Exemple de solutions d'extraction utilisées pour estimer la biodiponibilité des métaux dans le sol.

Tableau 1.11. Méthodes de dépollution des sols par les éléments traces métalliques et ordres de grandeur des coûts associés.

Tableau 1.12. Options de traitement des déchets issus de la phytoextraction.

Tableau 1.13. Avantages et limites de la phytoextraction.

Partie 2

Tableau 2.1. Programmes de minéralisation des sols et des végétaux utilisés avec la micro-onde CEM MARS 6.

Tableau 2.2. Synthèse des valeurs pour l'indice de diversité spécifique de Shannon Weaver (H').

Tableau 2.3. Concentrations des éléments traces métalliques (ETM) testées.

Tableau 2.4. Composition des milieux de culture pour le test de croissance des bactéries en milieu à l'extrait de phosphogypse.

Tableau 2.5. Caractéristiques physico-chimiques des phosphogypses (PG) Tunisien.

Tableau 2.6. Caractéristiques physico-chimiques du Terreau selon le fournisseur.

Partie 3

Chapitre 1

Tableau 3.1. Caractéristiques physico-chimiques des sols collectés à proximité des terrils de phosphogypse (PG) à Sfax, M'dhilla et Gabès par rapport aux PG de M'dhilla et aux sols « témoins » (collectées à 12 km des terrils de PG pour chaque site).

Tableau 3.2. Espèces végétales collectées à proximité des terrils de Sfax et de M'Dhilla.

Tableau 3.3. Concentration des éléments traces métalliques (ETM) en mg/Kg MS dans les parties aériennes (PA) et les parties racinaires (PR) et calcul de Facteurs de Bioconcentration (FBC) et de Translocation (FT) de ces éléments dans les plantes collectées dans les sols contaminés des sites de Sfax (a) et Md'hilla (b) et les sites témoins.

Tableau 3.4. Indice de Shannon (H ') dérivé de la structure de la communauté bactérienne

Chapitre 2

Tableau 4.1. Caractéristiques physico-chimiques des phosphogypses (PG).

Tableau 4.2. Caractéristiques physico-chimiques du Terreau selon le fournisseur (Florentaise CTRU70-St Mars du Désert-France).

Tableau 4.3. Statistiques descriptives de chaque paramètre choisi pour la sélection des

isolats bactériens : croissance dans un extrait de PG (Ccc ExPG) exprimée en % par rapport à la croissance dans TSB ½, production spécifique de pyoverdine (PS PVD), production spécifique de sidérophores totaux (PS ST), production spécifique d'acide indole acétique (PS AIA) et dégradation spécifique de l'enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase (DS ACC) exprimées en µM/DO 620 nm.

Tableau 4.4. Synthèse des résultats de la sélection des isolats bactériens pour les différents tests en présence du mélange d'ETM, et détail des notes attribuées pour chaque isolat sur un maximum de 12 points. (2 points maximum par test : Croissance dans un extrait de PG (Cce ExPG), production spécifique de pyoverdine (PS PVD), production spécifique de sidérophores totaux (PS ST), production spécifique d'acide indole acétique (PS AIA) et dégradation spécifique de l'enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase (DS ACC)).

Chapitre 3

Tableau 5.1. Composition des milieux de culture pour plantes : Hoagland et Low Phosphate Low pH (LPP).

Tableau 5.2. Caractéristiques physico-chimiques du phosphogypse (PG) tunisien utilisé (prélevé à M'dhilla-Gafsa).

Tableau 5.3. Caractéristiques physico-chimiques du Terreau selon le fournisseur (Florentaise CTRU70-St Mars du Désert-France).

Tableau 5.4. Concentrations des éléments traces métalliques (ETM) testées pour chaque extractant

Tableau 5.5. Concentration (en mg/Kg MS) et quantité (en mg) des éléments traces métalliques (ETM) dans les parties aériennes (PA) et les parties racinaires (PR) et calcul des Facteurs de Bioconcentration (FBC) et de Translocation (FT) et % de dépollution de ces ETM dans (a) *Trifolium pratense* et (b) *Helianthus annuus* cultivées pendant 14 jours en hydroponie en milieu Low phosphate, low pH (LPP), T : solution de culture sans ETM.



Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

Depuis le vingtième siècle, la révolution industrielle et le développement démographique ont abouti à l'accumulation d'énormes quantités de déchets domestiques et industriels. Ces derniers se traduisent par des effets néfastes sur la santé humaine et l'environnement. Tel est le cas des industries d'engrais chimiques, en raison d'émissions gazeuses, d'effluents liquides et de déchets solides qui souillent les sols et les milieux aquatiques. Le cas des rejets de phosphogypses (PG), sous-produits majeurs de la production d'acide phosphorique (constituant de base des engrais phosphatés) en est un bon exemple, qui pose un problème environnemental d'impact sanitaire pour les pays producteurs d'engrais phosphatés, parmi lesquels figure la Tunisie.

Le Groupe Chimique Tunisien (GCT), industrie spécialisée dans l'enrichissement et la transformation du phosphate, génère d'énormes quantités de PG (10 Mt/an), qui sont soit stockés à l'air libre soit rejetés à la mer. Les PG stockés en terril couvraient environ 90 ha en 2011. A partir de cette date, le projet Taparura consistant à résoudre ce problème de PG et financé par la Banque Européenne d'Investissement (soit 86 Millions d'Euros) a fini par remblayer les PG en mer et épargner le pays d'un déchet nuisible par réhabilitation de la zone de stockage à Sfax Nord. Toutefois, une montagne de quelques milliers de tonnes de PG occupant plus de 48 ha demeure et ne cesse de s'accroitre à Sfax Sud. Et les villes de Gafsa et Gabès font toujours face au problème d'évacuation des PG.

Les PG concentrent des teneurs importantes en éléments traces métalliques (ETM), incluant des métaux lourds et des terres rares (TR) utilisés dans des fabrications de haute technologie. Par conséquent, les PG représentent à la fois un problème environnemental – une grande diversité de micropolluants a été décelée dans les sols et les eaux impactés par les PG, et les risques engendrés ont été largement étudiés – mais aussi une ressource potentiellement valorisable, dans la perspective d'une demande croissante de TR dans les prochaines décennies.
Une option pour réduire ces nuisances environnementales liées aux énormes quantités de PG générés est de tenter de valoriser ces sous-produits et plus particulièrement les éléments traces à haute valeur commerciale tels les terres rares qu'ils renferment. Différentes tentatives de valorisation des PG par voies physiques et chimiques ont été tentées dans les principaux

domaines de l'agriculture, l'industrie chimique et le génie civil. Ces études et travaux publiés sur les PG se focalisent principalement sur leurs caractérisations, leur traitement pour l'élimination des impuretés et la récupération des TR. En dépit de leur efficacité, ces méthodes présentent des limites d'application. Elles sont par ailleurs coûteuses, et restreintes à des volumes limités de déchets. Au cours des dernières décennies, plusieurs travaux de recherche se sont orientés davantage vers l'utilisation de méthodes biologiques alternatives offrant le plus d'avantages écologiques, économiques et techniques.

La phytoextraction, la seule méthode de dépollution *in situ* des sols contaminés par les PG, peut ainsi contribuer à décontaminer ces déchets tout en valorisant les TR, sans compter ses propriétés de phytostabilisation des zones de stockage afin de limiter la dispersion des PG par érosion éolienne et hydrique. Cependant, la durée importante du traitement limite son utilisation. Parmi différentes solutions pour augmenter la vitesse de dépollution, l'ajout de microorganismes visant à accélérer le potentiel de dépollution par des plantes, en augmentant la biomasse végétale et/ou en optimisant la mobilisation des métaux, fait l'objet de travaux de recherche depuis une dizaine d'années. Le couplage bioaugmentation – phytoextraction est à la base de ce travail de thèse.

Dans un premier temps, une évaluation environnementale des effets de la pollution sur des sols contaminés collectés aux alentours des sites de stockage de PG a été réalisée (caractérisation physico-chimique des sols collectés, dont la spéciation des ETM), analyse de la structure des communautés microbiennes, analyse des végétaux colonisant les sites étudiés). Dans un deuxième temps, à partir d'isolats bactériens provenant de prélèvements effectués sur sites, leurs aptitudes à tolérer les ETM (plus particulièrement le cadmium, le strontium, le cérium, le lanthane, le néodyme et l'yttrium) ont été testées. Des tests biochimiques ont été également réalisés pour évaluer leur capacité à produire des métabolites impliqués notamment des sidérophores dans la mobilisation des métaux. Les isolats sélectionnés, dont on a également évalué la capacité à améliorer la croissance des plantes (production d'acide indole acétique) et à augmenter leur tolérance au stress métallique (production d'ACC-désaminase), ont été associés à des plantes commerciales accumulatrices de métaux (trèfle violet et tournesol). Il est attendu que ces isolats bactériens tolérant la contamination en PG et potentiellement capables de stimuler la croissance des plantes permettront d'augmenter les performances de traitement des PG par

phytoextraction et de réduire l'impact de ces déchets sur l'environnement, tout en offrant la possibilité de récupérer et valoriser les métaux accumulés dans la biomasse végétale.

A notre connaissance, aucune recherche couplant ces deux techniques (bioaugmentation et phytoextraction) n'a été mise en œuvre pour le traitement des PG jusqu'à présent. L'association bioaugmentation–phyotextraction semble une solution d'autant plus intéressante pour contribuer à gérer le problème de PG que celui-ci n'est plus valorisé actuellement en Tunisie.

Dans ce travail de thèse, deux objectifs ont été poursuivis : 1/ extraire les contaminants pour réduire le risque environnemental et 2/ valoriser les terres rares, éléments à haute valeur ajoutée. Plus précisément, la méthode de phytoextraction associée à la bioaugmentation a été appliquée au cadmium et strontium (objectif environnemental) au cérium, lanthane, néodyme et l'yttrium (valorisation économique des terres rares par phytomine).

Le mémoire de thèse se structure en 3 parties. **Les parties 1 et 2** sont respectivement consacrées à « l'état de l'art » et aux « matériels et méthodes ».

La **partie 1** présente une étude bibliographique sur les PG et les ETM dont les terres rares qu'ils renferment, la bioremédiation et la phytoremédiation ainsi que l'association de ces deux méthodes.

Le **partie 2** détaille les expériences réalisées pour caractériser les PG, les sols, les communautés microbiennes et végétales des zones proches de dépôt de PG. Les tests biochimiques de sélection des bactéries et d'association bioaugmentation–phytoextraction en conditions de laboratoire, les différentes méthodes analytiques utilisées au cours de ce travail, sont également présentés.

Le **partie 3** présente l'ensemble des résultats (et discussions) obtenus dans ce travail de thèse présentés en trois chapitres sous la forme de 3 articles soumis dans des revues internationales à comité de lecture (les articles sont rédigés dans ce manuscrit en français) :

- **Chapitre 1** : Caractérisation environnementale de tous les sites de dépôts ou de rejet des PG des unités industrielles en Tunisie et évaluation de l'impact environnemental sur les sols, les communautés végétales colonisant naturellement les sites d'étude, et la structure des communautés microbiennes de ces sites. Ce chapitre a fait l'objet d'un article accepté dans « Ecotoxicological and Environmental Safety » ;
- **Chapitre 2** : Isolement à partir de prélèvements effectués sur les sites d'étude, et sélection de bactéries capables de tolérer la toxicité des PG, de stimuler la croissance végétale et de

mobiliser les ETM des sols contaminés par ces PG. Ce chapitre a fait l'objet d'un article soumis dans « Journal of Hazardous Materials » ;

- **Chapitre 3** : Phytoextraction de PG dilués avec du terreau, présentant le potentiel d'accumulation des ETM par des plantes commerciales (*Trifolium pratense* et *Helianthus annuus*) et le couplage plantes/bactéries pour améliorer les performances de phytoextraction. Ce chapitre a fait l'objet d'un article à soumettre dans « Journal of Hazardous Materials ».

Enfin, une « conclusion générale » est consacrée à la synthèse de l'ensemble des principaux résultats. Elle est suivie de perspectives pour orienter la suite de ce travail.

Etude Bibliographique

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Les éléments traces métalliques

1.1 Notion d'éléments traces métalliques (ETM)

Les éléments traces (ET) sont des éléments chimiques inorganiques présents sur la surface terrestre à de très faibles concentrations <0.1 %. Ils représentent que 0,6 % du total de la lithosphère, tandis que les 12 éléments majeurs (O, Si, Al, Fe, Ca, Na, K, Mg, Ti, H, P et Mn) représentent les 99,4 % (Baize, 1997). Certains éléments traces sont des non métaux (C, N, O, P, S, Se, …), d'autres sont des métaux (Cd, Cr, Zn, Pb, Cu, …). L'appellation de « métaux lourds » est souvent utilisée à tort, car les métaux lourds sont caractérisés par une masse volumique élevée, supérieure à 5 grammes par cm^3 et présentent une toxicité sur les organismes vivants, ce qui n'est pas le cas de tous les ET. En effet, certains d'entre eux sont des oligo-éléments indispensables aux organismes vivants à des concentrations normales (Cu, Zn, Fe, Co.…), d'autres ne sont pas des métaux mais des métalloïdes (B, Si, Ge, As, Sb, Te et Po). Finalement, les métaux, qu'ils soient lourds ou pas et les métalloïdes, sont regroupés et désignés par l'appellation « éléments traces métalliques » (ETM) plutôt que par celle de « métaux lourds » (Tremel-Schaub et Feix, 2005).

1.2 Terres rares (TR)

1.2.1 Définition

Les terres rares (TR) sont des métaux traces représentant le groupe des lanthanides, constitué de quinze éléments dont le numéro atomique varie de Z=57 (lanthane) au Z=71 (lutécium), situés tous sur une même ligne du tableau périodique (Figure 1.1), auxquels sont ajoutés, du fait de leurs propriétés chimiques voisines, l'yttrium et le scandium (Reisman et al., 2013 ; Bru et al., 2015). En raison de leurs propriétés physiques et chimiques très proches, elles sont difficiles à séparer les unes des autres. On distingue trois groupes : les TR **légères** (cériques), les plus abondantes : lanthane (^{57}La), cérium (^{58}Ce), praséodyme (^{59}Pr), néodyme (^{60}Nd), prométhéum (^{61}Pm), les TR **moyennes** : samarium (^{62}Sm) et europium (^{63}Eu) gadolinium (^{64}Gd), terbium (^{65}Tb), dysprosium (^{66}Dy), holmium (^{67}Ho), et les TR **lourdes** (yttriques), les moins

abondantes : erbium (^{68}Er), thulium (^{69}Tm), ytterbium (^{70}Yb), lutécium (^{71}Lu) et yttrium (^{39}Y) (Van Gosen et al., , 2014).

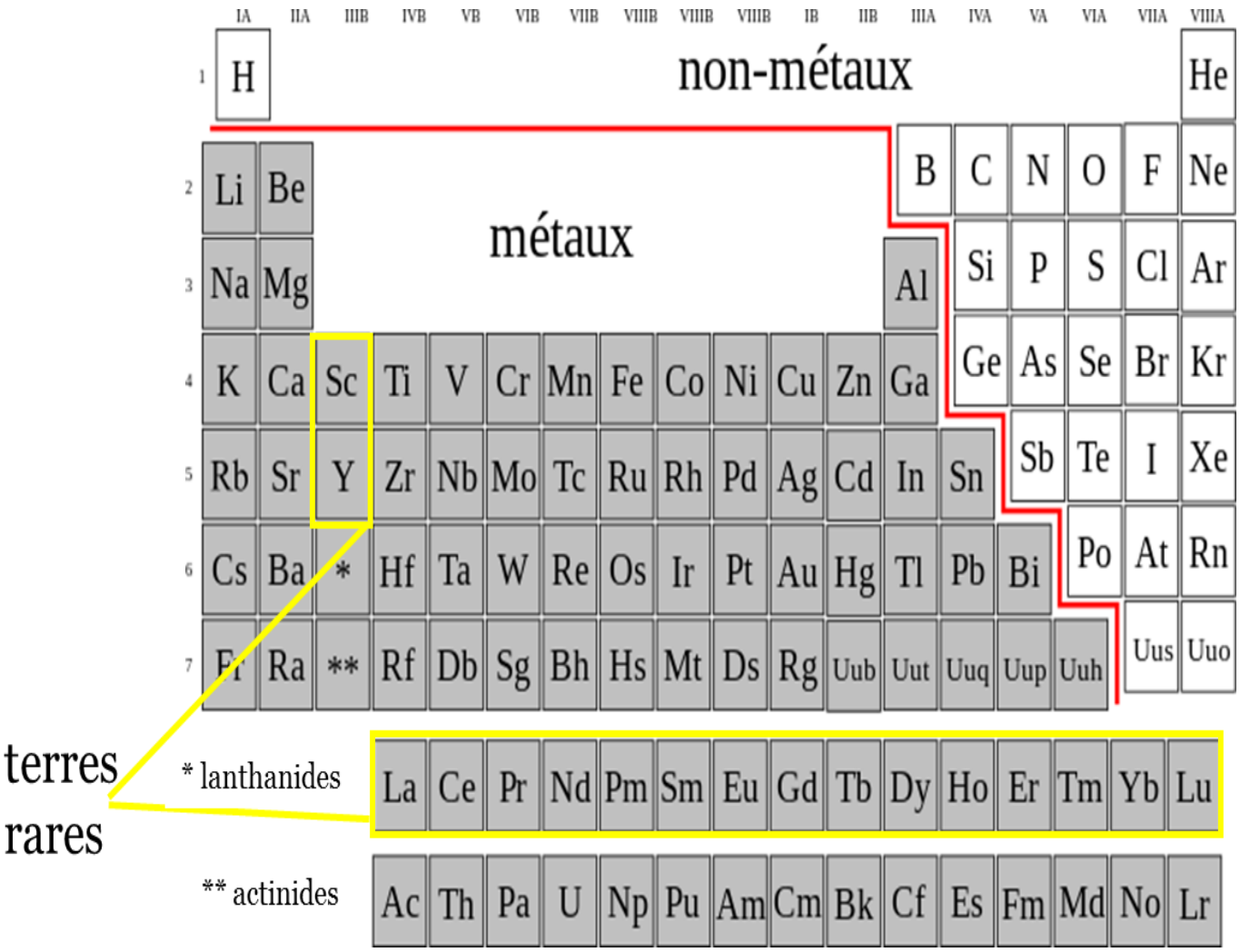


Figure 1.1. Tableau de Mendeleïev situant les Terres Rares.

Elles sont appelées terres rares parce que leur histoire remonte à la fin du XVIIème siècle où la dénomination « terres » utilisée à l'époque par les anciens chimistes servait à désigner les oxydes et « Rares » parce que leurs concentrations, sous forme de gisements, étaient particulièrement rares à l'époque et ces minéraux difficiles à séparer les uns des autres, se retrouvent à des concentrations insuffisantes pour permettre leur exploitation (Reisman et al., 2013). Contrairement à leur dénomination, les terres rares, ne sont en fait ni « terres » ni

« rares ». Ce sont des métaux présents naturellement sous forme d'oxydes, d'apparences terreuses d'où cette dénomination à l'époque de leur découverte (Massari et Ruberti, 2013). Elles sont des éléments chimiques assez répandus et dispersés de manière assez homogène un peu partout sur la surface de la terre. Au niveau de la croûte terrestre, leur concentration globale est de l'ordre de 0,016 % dans plus de 34 pays sur les 5 continents (Chen, 2011). En effet, les réserves mondiales en TR sont comparables à celles du Zn et aussi abondantes que celles de l'or ou l'argent. Cependant, elles sont moins concentrées et par conséquent plus difficiles à extraire et à raffiner que les métaux classiques (Reisman et al., 2013).

La spécificité des TR tient essentiellement à leur structure électronique particulière. Habituellement, le nombre d'électrons de valence est toujours de trois, le passage du La au Lu se traduit par le remplissage progressif des sept cases quantiques d'une couche 4f interne, écrantée par les couches saturées 5p6 et 5s2 pour une configuration électronique 4fi 5d1 6s2 ($0 \leq i \leq 14$). Cette couche 4f confère aux TR des propriétés communes et uniques qui rendent incontournable leur utilisation dans divers domaines. Elles se caractérisent par deux propriétés essentielles :

- Propriétés **optiques** : L'absorption et l'émission de lumières monochromatiques qui permettent d'obtenir des colorations particulières pour des verres et des céramiques et aussi un ajustement de la balance des couleurs dans les revêtements phosphorescents (écrans, ampoules basse consommation, diodes) ;
- Propriétés **magnétiques** : L'aimantation à saturation des TR est très supérieure à celle du fer. C'est ainsi que les « aimants néodyme » sont des aimants en ferrite dopés en Nd qui les rend très puissants. Ces aimants au néodyme sont par exemple utilisés dans les moteurs électriques et dans les alternateurs (voitures électriques et hybrides).

On trouve souvent, autant de TR ayant des propriétés optiques que de TR ayant des propriétés magnétiques. L'une d'entre elles, le néodyme, présente les deux propriétés. En raison de leur configuration électronique externe similaire, les TR ont des propriétés physico-chimiques semblables ce qui rend leur séparation difficile. Seul le changement de rayon des ions trivalents ou la variation de l'état de valence pour certains d'entre eux permettent de les séparer.

1.2.2 Principales applications des terres rares

Bien que les tonnages concernés soient relativement faibles, les TR entrent dans la composition de nombreux alliages métalliques. Ainsi, les téléphones portables renferment un

petit aimant d'alliage de néodyme qui permet à l'appareil de vibrer (Iamgold, 2012), des catalyseurs (Goonan, 2011), des poudres de polissage et dans certains types de verre (BGS, 2011 ; Côté et al., 2012). Les TR sont nécessaires à la fabrication d'aimants permanents présents dans les moteurs électriques et les technologies vertes comme les éoliennes. Selon une étude du Département de l'Energie des Etats-Unis (2011), il faut, en moyenne 600 t d'aimants permanents par GW de puissance installée d'éoliennes à génératrices synchrones. Par conséquent, il faudra en moyenne environ 186 t de néodyme et 24 t de dysprosium par GW. Les TR sont aussi utilisées dans le domaine de l'armement (lasers, radars et satellites). On utilise également les TR dans des applications médicales : le gadolinium est ainsi le contrastant le plus utilisé en imagerie par résonance magnétique pour l'étude des tumeurs. Associés au phosphore, ces métaux interviennent dans les techniques d'éclairage basse consommation, les fibres optiques et les lasers utilisées en cosmétique, en médecine dentaire et en chirurgie (Iamgold, 2012). Les TR sont utilisés aussi en géochimie et en pédologie comme traceurs naturels pour tracer différents processus géologiques (Laveuf et al., 2009 ; Heim et al., 2015). Les TR sont également utilisées dans le domaine de l'agriculture vu leurs effets bénéfiques sur la croissance et la productivité des plantes (Maheswaran et al., 2001 ; Wang et al., 2012).

La nomenclature des TR, leurs symboles chimiques, leurs types (lourde ou légère), leurs abondances dans la croûte terrestre et leurs principales applications sont synthétisés dans le Tableau 1.1.

Tableau 1.1. Abondance des terres rares dans la croûte terrestre et leurs principales utilisations (a : Rudnick and Gao, 2003 ; b : Iamgold, 2012 ; Humphries, 2013 ; c : Jordens et al., 2013).

Elément	Type	Symbole	Abondance[a] (ppm)	Principales utilisations [b]
Scandium	N/A[c]	Sc	14,00	Traceur, alliages métalliques
Yttrium	Lourde	Y	21,00	Lasers, alliages métalliques
Lanthanum	Légère	La	31,00	Piles rechargeables, fibres optiques, alliages métalliques,
Cerium	Légère	Ce	63,00	Polissage de verre, transistors, convertisseurs catalytiques
Praseodymium	Légère	Pr	7,10	Aimants de forte puissance, coloration jaune
Neodymium	Légère	ND	27,00	Aimants de forte puissance, télémétrie, raffinage du pétrole
Samarium	Moyenne	Sm	4,70	Aimants de forte puissance, guidage d'armement, rayons X
Europium	Moyenne	Eu	1,00	Ecrans plats, tubes phosphorescents
Gadolinium	Moyenne	Gd	4,00	Techniques médicales, réacteurs nucléaires
Terbium	Lourde	Tb	0,70	Tubes phosphorescents,
Dysprosium	Lourde	Dy	3,90	Aimants de forte puissance, Surveillance de radiations, moteurs hybrides
Holmium	Lourde	Ho	0,83	Aimants de forte puissance, lasers
Erbium	Lourde	Er	2,30	Coloration du verre, fibres optiques, lasers médicaux
Thulium	Lourde	Tm	0,30	Rayons X, lasers
Ytterbium	Lourde	Yb	2,00	Techniques médicales, acier inoxable
Lutétium		Lu	0,31	Télémétrie

ND : Non déterminé
N/A : Non inclus dans aucun des types

1.2.3 Réserves et productions des terres rares dans le monde

La production des TR augmente progressivement, en parallèle avec la demande, répondant au développement des technologies modernes. Bien que la consommation de TR dans les années 50 ne dépassait pas 10000 tonnes, elle était de 105000 tonnes en 2011 et devrait atteindre 200000 à 240000 tonnes en 2020 d'après les données de l'université de Curtin, (Labbé et Lefebvre, 2016) (Figure 1.2).

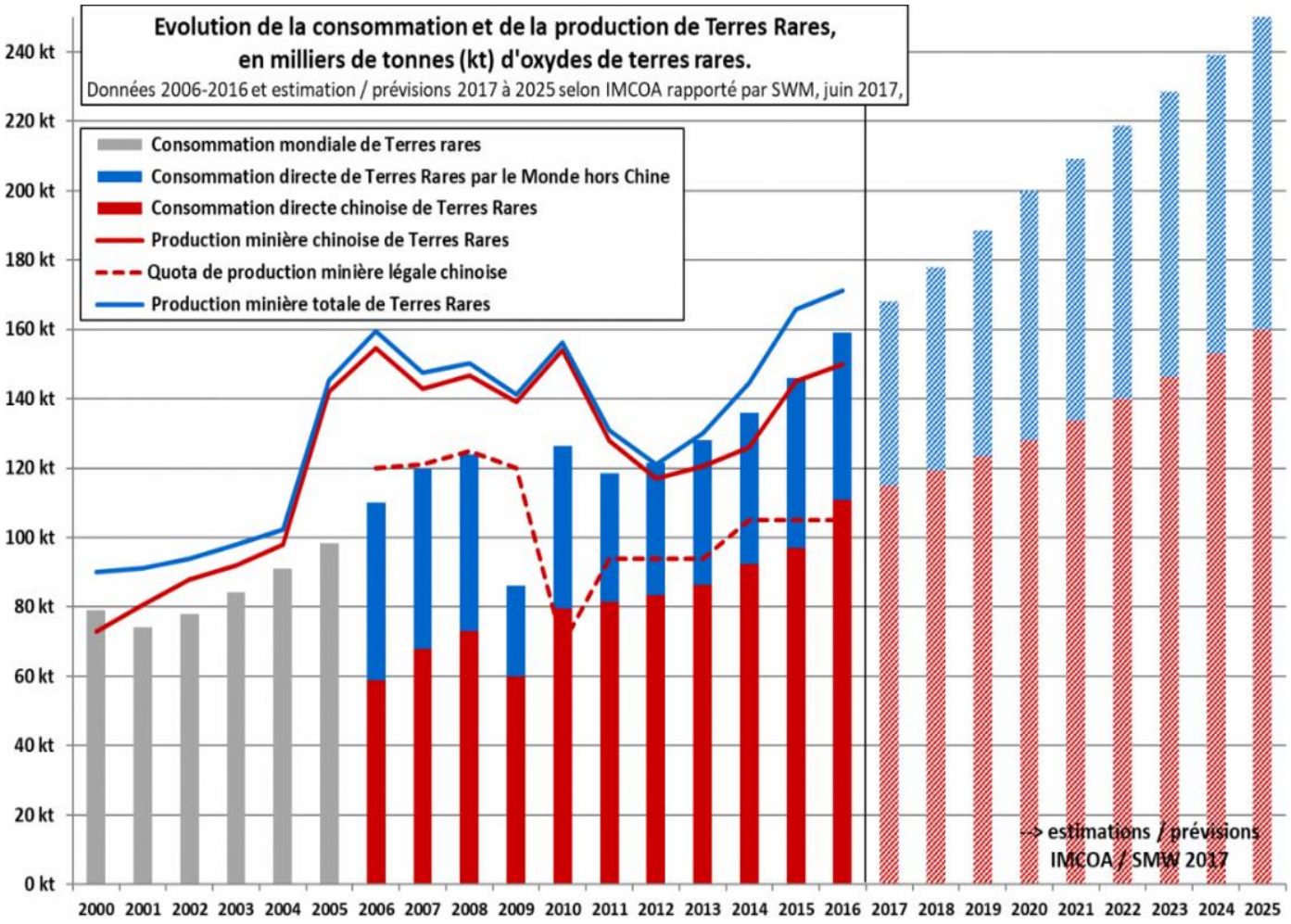


Figure 1.2. Evolution de la consommation et de la production des terres rares, en milliers de tonnes (Kt) d'oxydes de Terres rares. Données 2006-2016 et estimation/ prévision 2017 à 2025 (Labbé et Lefebvre, 2016).

Selon l'USGS (2014), 50 % (soit 110 millions de tonnes) des réserves de TR planétaires se trouvent en Chine. Les autres grands dépôts sont répartis entre les Etats-Unis (13 millions de

tonnes) et l'Inde (3,1 millions de tonnes). La Figure 1.3 illustre les réserves et les productions des terres rares par les pays les plus importants exploitant ces minerais en 2011. Les réserves minérales mondiales s'élèveraient à 3,5 milliards de tonnes dont 55000 milliers de tonnes en Chine, 13000 pour les Etats Unis, le deuxième producteur mondial, 3100 en Inde, 1600 en Australie, 48 au Brésil et 30 en Malaisie. En 2017, la production mondiale de TR s'élevait à 130000 tonnes dont 105000 sont transformées en Chine, qui se trouve ainsi en position de quasi-monopole sur le marché international (Statista, 2018).

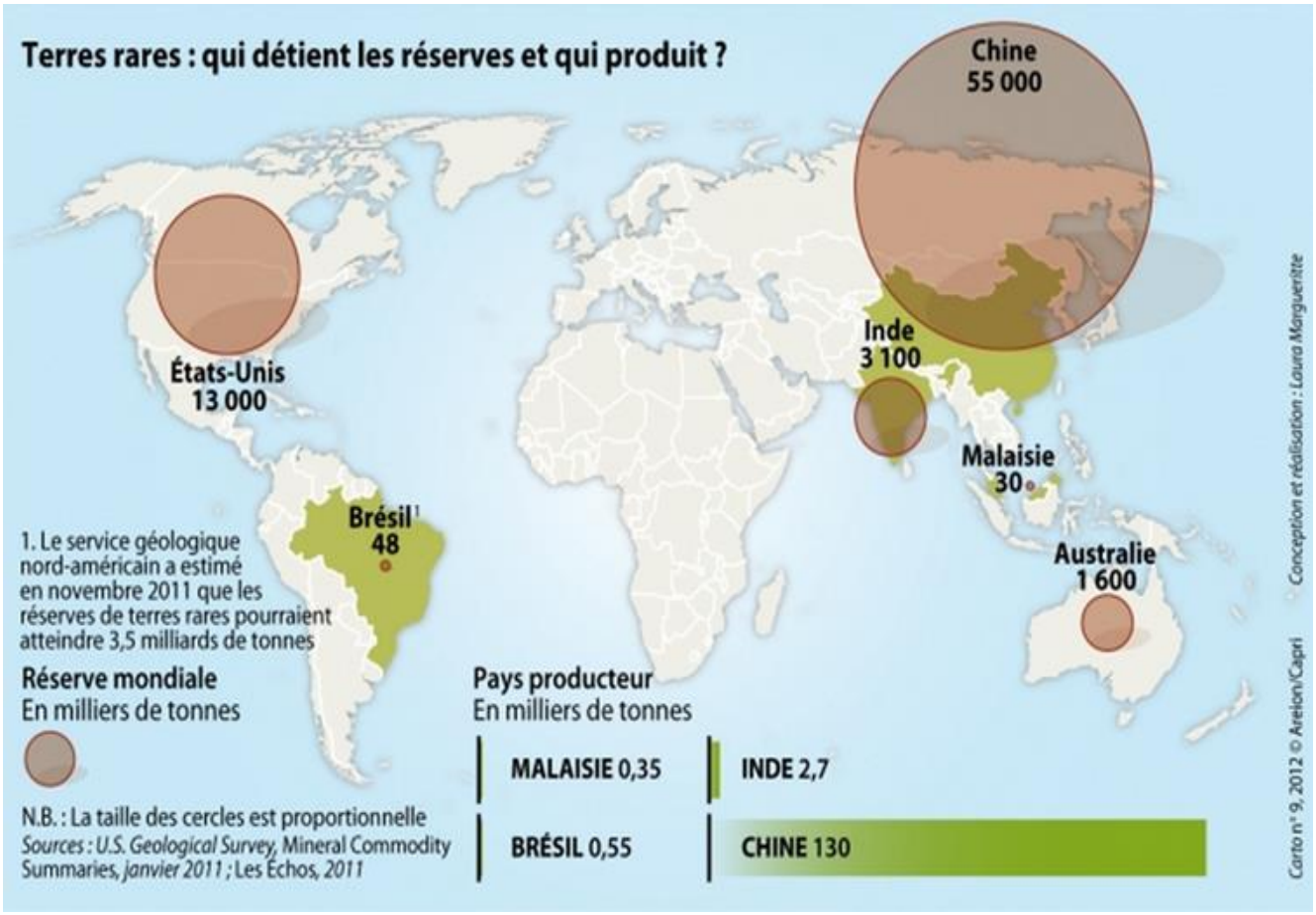


Figure 1.3. Les principales réserves et productions de terres rares des principaux pays ayant exploité ces minéraux (USGS, 2014).

1.3 Différentes origines des éléments traces dans le sol

1.3.1 Origines naturelles

Les ETM sont naturellement présents dans les fonds géochimiques à des très faibles concentrations (Baize, 1997). Ils sont généralement stockés dans le sous-sol sous forme de minerai. Selon sa nature (roches magmatiques, métamorphiques ou sédimentaires), sa composition chimique et sa porosité, la roche mère subit des altérations biogéochimiques. Les minéraux primaires sont libérés et à leur tour en s'altérant forment les minéraux secondaires appelés aussi minéraux néogènes. Ces minéraux constituent le fond pédogéochimique, défini comme la concentration naturelle d'un élément chimique dans un horizon de sol, résultant des évolutions géologique et pédologique, sans aucun apport d'origine anthropique (Baize, 1997).

Sous l'effet de l'érosion, l'altération naturelle des roches et des sols ainsi que les éruptions volcaniques, les ETM sont libérés et diffusent par la suite dans l'environnement, dans l'air, l'eau et les sols de diverses façons. Les ETM se répartissent souvent dans la phase solide du sol, dans les différentes fractions organiques et minérales, alors qu'un infime pourcentage de la concentration totale se trouve dans la solution du sol (Juste 1995).

Les **terres rares** (TR) sont généralement présentes dans des minerais de phosphates (Monazite, Xénotime ou Apatites), de carbonates (Bastnaésite) et de silicates (Allanite). La bastnaésite, la monazite (source de TR légères) et le xénotime (source de TR lourdes) sont les trois principaux minerais à partir desquels sont actuellement extraites les TR (BGS, 2011). Elles sont également présentes dans les minéraux phosphatés utilisés pour la production d'engrais phosphorés.

Le **cadmium** (Cd) n'existe pas à l'état natif. En 1808, il a été découvert dans un minerai du carbonate de zinc. Son minerai, la greenockite, est très rare et se trouve en quantité non exploitable. Par contre, il est présent dans presque tous les minerais de zinc (0,01 à 0,05 %), de plomb et de cuivre, également dans les phosphates naturels. Dans la croûte terrestre, le Cd est présent à des concentrations d'environ 1 à 2 mg/kg. Il est souvent associé au zinc (blende ZnS) mais aussi aux Pb et Cu. Dans les sols, le Cd est moins fortement adsorbé que les autres métaux divalents, et par conséquent, il est plus mobile et facilement biodisponible. La phytodisponibilité du Cd dépend essentiellement du pH du milieu et sa mobilité augmente avec l'acidité du milieu.

Le **strontium** (Sr) comporte à l'état naturel quatre isotopes stables : ^{88}Sr (82,53%), ^{86}Sr (9,87%), ^{87}Sr (7,04%) et ^{84}Sr (0,56%). Les principaux minerais de Sr sont la strontianite ($SrCO_3$)

et la célestite ($SrSO_4$). Le Sr appartient à la famille des alcalino-terreux et ses propriétés physico-chimiques sont analogues à celles du calcium (Ca) (son rayon ionique 0.113 nm est proche de celui du calcium (0,099nm)), de ce fait le Sr peut se substituer au Ca dans la structure d'un grand nombre de minéraux. En général, le Sr ne peut pas occuper de site spécifique. Ses réactions d'échange se limiteront aux sites accessibles aux éléments majeurs tels que Ca"1"1" et le magnésium Mg"1"4.

1.3.2 Origine anthropique

La dispersion des ETM est liée à des processus naturels mais également, d'une manière directe ou indirecte, des activités humaines. Au cours des activités industrielles, l'homme extrait les minerais et les exploite pour divers usages, en favorisant leur dispersion dans l'environnement (gaz d'échappement des véhicules, incinération, activités minières et agricoles (fertilisants, fumiers, déjections animales, boues d'épuration, composts urbains). La dispersion des ETM des diverses sources anthropiques perturbe le cycle naturel de ces éléments et fait augmenter d'autant leurs concentrations dans les sols, les eaux et l'air. La Figure 1.4 présente l'ensemble des sources d'apports des ETM incluant les TR dans le sol. En effet, ces éléments proviennent d'abord de phénomènes naturels (fond pédo-géochimique naturel) :1) **héritage de la roche-mère** (composition chimique de la roche - sans oublier de prendre en compte également les formations superficielles) ; 2) **cycle bio-géochimique** : des éléments sont adsorbés par les racines dans tous les horizons, assimilés par les plantes et libérés plus tard soit dans le sol (décomposition des racines) soit à la surface (débris des parties aériennes, litières forestières) ; 3) **transferts pédologiques verticaux** : migrations sous formes solubles ou associés aux particules d'argile et au fer vers les horizons profonds ou vers les nappes phréatiques ; 4) **transferts pédologiques latéraux** : lessivage latéral de particules ou redistributions suite aux cycles réduction/oxydation ; 5) **transferts latéraux de particules** par ruissellement à la surface. Apports ou pertes selon position sur les versants ; 6) **apports agricoles** gérés à la parcelle : engrais (notamment phosphatés), amendements calcaires, fumiers, lisiers, épandages divers, boues de stations d'épuration, composts urbains, produits de traitements phytosanitaires, etc. ; 7) **apports diffus aériens** d'origine lointaine : poussières et aérosols provenant des chauffages, activités industrielles, moteurs d'automobiles, etc.

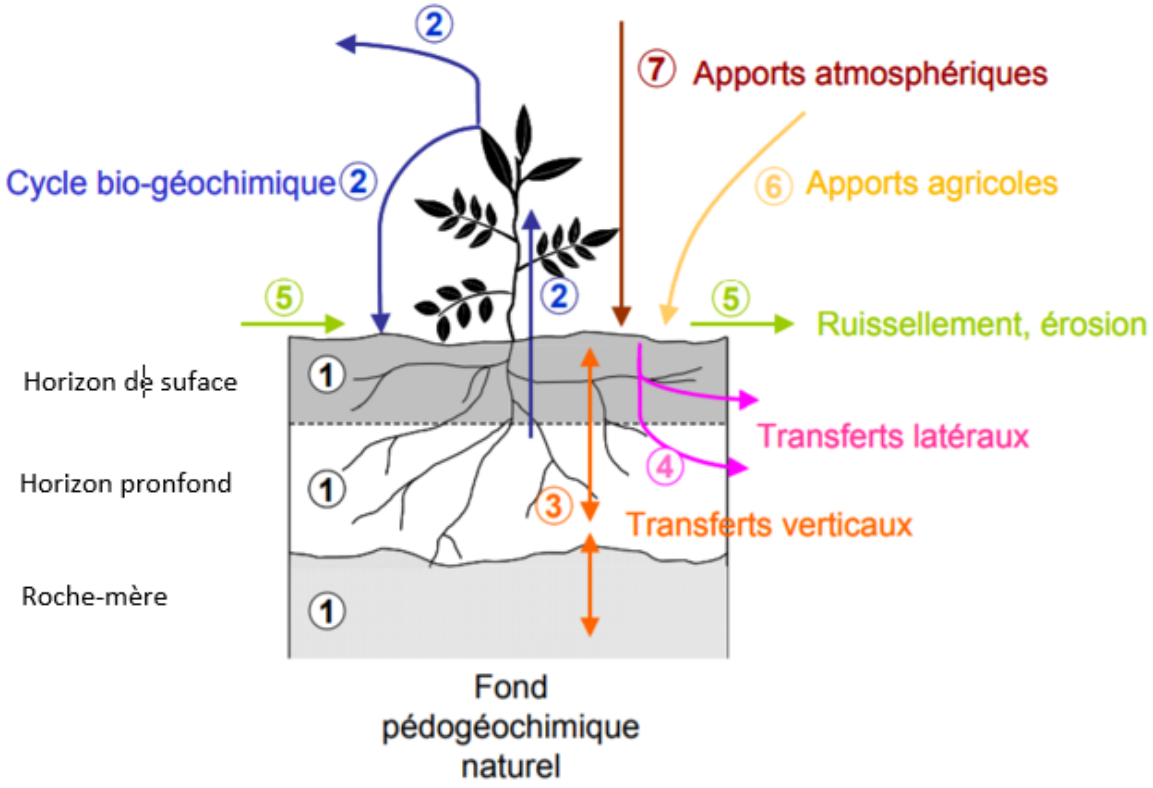


Figure 1.4. Cycle d'apport des éléments traces métalliques dans les sols (adapté par Baize, 1977).

Parmi les activités responsables de la dispersion des ETM dans l'environnement, l'agriculture qui utilise les fertilisants inorganiques, parmi lesquels les engrais phosphatés qui sont les plus riches en ETM et renferment des quantités considérables de TR légères. En effet, l'utilisation de ces engrais est à l'origine d'un apport estimé à environ 750 à 1000 g/ha de TR sur 3 millions d'hectares cultivés pendant ces 20 dernières années (Xiangsheng et al., 2006). Le Cd contaminant les engrais phosphatés peut être également accumulé dans le sol jusqu'à 3,5 g/hectare/an (Baize, 1977).

1.4 Risques écologique ou sanitaire des ETM

1.4.1 Ecotoxicité des ETM

La toxicité d'un métal dépend de sa spéciation autant que des facteurs environnementaux. Dans le sol, les ETM peuvent exister sous forme d'ions libres ou sous forme liée à des particules de sol. Cependant, un métal n'est toxique pour les organismes vivants que s'il est sous forme libre ; il est alors biodisponible.

Les TR ont souvent tendance à s'accumuler dans les sols, les plantes et les lichens proches des zones minières (Gonzalez et al., 2014).

Les TR émises par les activités humaines se présentent souvent sous une forme plus réactive et plus soluble, et par conséquent plus biodisponible que celles qui sont naturellement présentes dans l'environnement (Eawag, 2013). Contrairement aux ETM tel que le Cd, l'éco-, bio-toxicité et la capacité de bioaccumulation des TR sont très mal connues et peu documentées (Chin et al., 2012).

En général, comme les autres éléments minéraux, les TR présentent une action stimulante à faible dose et leur toxicité s'accroît avec la concentration. On ne sait pas encore si les TR sont réellement indispensables à la vie humaine, animale ou végétale. A forte concentration, elles se révèlent toxiques car elles perturbent les processus biologiques. Généralement, les problèmes environnementaux liés aux TR sont surtout la conséquence des procédés d'extraction. La plupart des minerais de TR ne se trouvent jamais à l'état pur et sont liés à des éléments radioactifs, comme l'uranium ou le thorium (Corniou, 2012), ils sont donc difficilement séparables ce qui implique des processus d'extraction, de séparation et de raffinage extrêmement longs et polluants (Degeorges, 2012). Les principaux risques environnementaux associés à toutes les étapes de l'exploitation des mines des TR sont présentés dans le Tableau 1.2.

Le nombre d'études publiées sur l'accumulation des TR dans l'environnement est nettement inférieur à celui relatif aux autres ETM (Bentlin et Pozebon, 2010). La plupart des études qui ont été menées sur les TR portent sur les teneurs et la biodisponibilité (Fiket et al., 2017 ; Laveuf et Cornu, 2009), dans l'eau et les sédiments (Ding et al., 2005) et l'absorption par les plantes. L'accumulation de ces éléments a été analysée dans des groupes d'organismes tels que les lichens, les mousses, les champignons (Fiket et al., 2017 ; Gandois et al., 2014 ; Mleczek et coll., 2016) et des plantes vasculaires. Cependant, La plupart des recherches a été menée sur des espèces de plantes cultivées ou des espèces herbacées indigènes présentes dans certains habitats (Durães et al., 2014 ; Mikolajczak et al., 2017 ; Shan et al., 2003 ; Thomas et al., 2014 ; Wiche et Heilmeier, 2016).

Tableau 1.2. Principaux aleas environnementaux associés aux mines de terres rares (Schüler et al., 2011 ; Reisman et al., 2013).

Etapes	Principaux aleas environnementaux
Extraction Concassage Broyage	Extraction d'une grande quantité de matière stériles contenant des ions sulfures causant un drainage minier acide
	Emission de poussières en provenance de la mine et des opérations minières
	Production de résidus miniers sous la forme d'un mélange d'eau, de substances chimiques et de roches broyées
	Exposition en surface de contaminants contenus dans les minéraux dont des radionucléides, des TR et des métaux lourds
	Perte de superficie de sol occupée par les résidus miniers ;
	Emission de gaz à effet de serres (GES)
Procédés de flottaison	Emission de SO_2, de HCl, de poussières et de substances radioactives

En raison de leur utilisation dans les fertilisants, les modalités d'absorption, d'accumulation et d'action des TR ont été davantage étudiées chez certains végétaux vasculaires, édaphiques et d'autres aquatiques. Certains microorganismes du sol les absorbent facilement sous leur forme ionique. En outre, il a été démontré qu'à concentration relativement importante, les TR pouvaient influencer la composition des communautés microbiennes du sol même (Wilde et al., 2002). De faibles concentrations en TR (250 mg de TR/kg de sol) stimulent la richesse des communautés microbiennes alors que des fortes concentrations (>750 mg de TR/kg de sol) la diminue (Wang et al., 2008). Il en est de même pour les végétaux ; les faibles teneurs sont promotrices de la croissance végétale, alors que de plus fortes teneurs pourraient l'inhiber et les TR semblent toxiques utilisées à des fortes teneurs (Zeng et al., 2003, Babula et al., 2008). La littérature fournit un certain nombre d'informations concernant les effets physiologiques des TR sur la germination et la croissance végétale (Tableau 1.3).

Néanmoins, Le Cd est toxique sous toutes ses formes (métal, vapeur, sels, composés organiques). Il est l'un des rares éléments n'ayant aucune fonction connue dans le corps humain ou chez l'animal. Les effets toxiques du Cd ne le sont pas seulement pour l'homme, mais aussi pour les végétaux et les animaux (Godt et al., 2006 ; Hentati et al., 2015). Contrairement au Cd, le Sr ne possède pas de toxicité chimique connue. Pour l'homme, l'exposition au Sr se fait essentiellement par les apports alimentaires.

1.4.2 Réglementation

A l'heure actuelle, il n'existe pas de règlementation relative aux teneurs en métaux dans les sols, seul l'épandage des boues des stations d'épuration (STEP) a fait l'objet de textes législatifs qui réglementent cette pratique en France (décret n°97-1133 du 8 décembre 1977 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées et l'arrêté du janvier 1998), mais cet arrêté ne concerne pas les TR. Cette réglementation fixe les seuils admissibles d'éléments métalliques et de composés organiques en traces dans les boues des stations d'épuration des eaux usées, pour que leur épandage sur un sol agricole soit autorisé. C'est la démarche de gestion du risque selon l'usage du sol qui est privilégiée en France. Elle se base sur l'interprétation de l'état des milieux (IEM), la réalisation d'un schéma conceptuel éventuellement complété par une évaluation quantitative des risques sanitaires (EQRS).

Tableau 1.3. Effets sur la croissancedes terres rares sur la germination des graines et l'élongation des racines des plantes.

Elément	Espèce	Concentration	Effet	Références
Effet sur la germination				
Nd	*Cassia obtusifolia*	1 mg/L	-↑ la germination des graines	Zhang et al., 2013
		> 5 mg/L	-↓ la germination des graines	
		3 mg/L	- Concentration optimale	
	Astragales	6 mg/L	-↑ la germination des graines	
	Angelica sinensis	10, 50, 80 et 100 mg/L	-Taux de germination est optimal (57%) à des concentrations en Nd^{3+} de l'ordre de 80 mg/L	
La	*Blé*	1,3 à 1389	-↓ la germination	D'Aquino et al.,2005
Effet sur les racines				
La + Eu	*Eriobotrya japonica*	1,0-3,0 mM	-↑ la longueur des racines -↑ la masse racinaire sèche	Zhang et al., 2013
		2,0-3,0 mM	-↑ les activités peroxydase et nitrate réductase	
La	*Huperzia serrata*	10 µM	-↑ la croissance des racines	
		50-100 µM	-↓ la croissance des racines	
Ce	*Dioscorea zingiberensis*	1-15 mg/L	-↑ la formation des tissus racinaires et l'inhibe à fortes concentrations	
Ce	*Arabidopsis thaliana*	100 µmol/L	- perturbe l'équilibre intrinsèque des éléments nutritifs : -↑ l'accumulation du Zn et Mo dans les racines -↓ l'accumulation du K, Ca et Fe dans les racines - ↓ la croissance : nécrose, chlorose	Wang et al., 2012

Elément	Espèce	Concentration	Effet	Références
Effet sur les racines				
La	*Triticum aestivum*	0,5-25 mg/L	-↓ l'élongation des racines primaires -↓ la masse sèche des racines et des feuilles - ↓ la teneur en Ca, Mg, K, Zn, Cu dans la partie aérienne	Hu et al., 2002
Ce		0,5–25 mg/L	-↓ l'élongation des racines primaires	
La + Ce			-↓ l'élongation des racines primaires - Aucune absorption sélective entre La et Ce par les plantes quand elles sont appliquées en combinaison	
Ce	*Arabidopsis thaliana*	0,5–10 mM	<u>stade 17 jours après</u> la germination : -Aucun effet <u>stade de 35 jours :</u> -↑ du nombre des feuilles - ↑ la hauteur de plante - ↑ la masse sèche	He et al., 2000
La		0,5–10 mM		
La + Ce		0,5 La + 0,5 mM Ce	-↑ l'initiation florale -↑ l'élongation des racines primaires	
	Zea mays	0,2 µM	- Aucun effet sur la croissance	Diatloff et al., 2008
La + Ce	*Vigna radia*	5,0 µM (> 0,2 µM)	-↓ la masse sèche foliaire de *Zea mays* de 32 % -↓ la masse sèche foliaire de *Vigna radiata* de75% -↓ la teneur en Ca, Na, Zn et Mn dans la solution	

Elément	Espèce	Concentration	Effet	Références
Effet sur les racines				
La	*Zea mays*	13,89mg/L 138,9 mg/L 1389 mg/L	-↓ de 28 % de la croissance racinaire -↓ de 42 % de la croissance racinaire -↓ de 55 % de la croissance racinaire	Liu et Hasenstein, 2005
La	Haricot *Zea mays*	2,7 mg/L 27 mg/L	-↓ de 28 % de la croissance racinaire - Aucun effet	Von Tucher et al., 2001
Effet sur le métabolisme				
Y	*Nymphoides peltata*	1–5 mg/L	-↓ l'activité catalase -↓ l'activité ascorbate -↑ l'activité peroxidase -↑ teneur en Mg, Ca, Fe, Mn -↓ teneur en P et K	Fu et al., 2014
Ce	*Oryza sativa*	0–500 mg/L	-↑↓peroxidation lipidique ; acide gras et teneur en lignine -fuite d'électrolytes -↑ H_2O_2 (stress oxidative)	Rico et al., 2013

2 Industrie des engrais phosphatés en Tunisie

2.1 Présentation de l'activité de transformation du phosphate en Tunisie

Le besoin d'augmenter la production alimentaire mondiale, implique la croissance à long-terme de la demande de l'exploration et l'exploitation des roches phosphatées. La Tunisie, l'un des plus grands producteurs d'engrais phosphatés dans le monde (Choura, 2008), s'est orientée vers la transformation et la valorisation des phosphates naturels extraits des gisements du Sud-Ouest du pays, en divers produits finis comme l'acide phosphorique, le triple super phosphate (TSP) et le di-ammonium de phosphate (DAP). En effet, depuis plus de 40 ans, la Compagnie des Phosphates de Gafsa (CPG) constitue le moteur principal de l'industrie des engrais chimiques en Tunisie, elle a produit une moyenne annuelle de 8 millions de tonnes de phosphate à travers l'exploitation de 10 gisements du bassin minier de Gafsa (Choura, 2008). Après une longue expérience d'exportation du phosphate brut, la Tunisie s'est orientée vers l'enrichissement et la transformation de ce minerai par l'implantation d'une industrie locale de production des dérivés du phosphate : l'acide phosphorique (acide orthophosphorique H_3PO_4), le triple super phosphate (TSP) et d'autres variétés d'engrais minéraux, et ce au sein du Groupe Chimique Tunisien (GCT) qui regroupe aujourd'hui 7 entreprises spécialisées dans la transformation des phosphates dont deux à Sfax, une à Gabès et une à M'dhilla. Actuellement, la CPG exporte annuellement environ 1,3 millions de tonnes de phosphate parmi lesquels 200 milles tonnes sont destinées à l'application directe et le reste est acheminé par train aux trois usines de M'dhilla, Sfax et Gabès, pour la fabrication des engrais commercialisés par un procédé dit « SIAPE », conçu par cette industrie et basé sur l'attaque du phosphate naturel par l'acide sulfurique H_2SO_4, qui permet d'obtenir l'acide phosphorique (Schrödter et al.,1991).

Souvent la teneur en phosphore dans la roche phosphatée et dans l'acide phosphorique est exprimée par unité pentoxyde de phosphore (P_2O_5). Le phosphate naturel contient en moyenne de 25 à 30 % de P_2O_5 ce qui s'avère insuffisant pour une commercialisation directe en tant que fertilisant minéral phosphaté. Un procédé de fabrication d'engrais phosphatés par voie humide visant à augmenter cette teneur en phosphates est par conséquent employé. Cependant, l'activité des usines du GCT, qui se base sur la transformation du phosphate brut en super phosphate normal (18 % de P_2O_5) est peu à peu remplacée par des engrais phosphatés plus concentrés : le triple superphosphate, obtenu suite à l'attaque du phosphate naturel par de l'acide phosphorique

qui contient entre 38 % et 45 % de P_2O_5 (Kongshaug et al., 1991). Cette transformation suit l'enchaînement réactionnel suivant :

- la première étape : la production de l'acide sulfurique à partir du soufre ;

- la deuxième étape : la production de l'acide phosphorique à partir de l'acide sulfurique et du phosphate. L'unité de production d'acide phosphorique est orientée vers une production journalière de 500 tonnes qui sont transformées en engrais phosphatés plus concentré, le TSP ;

- la troisième étape : la production du TSP à partir de l'acide phosphorique et du phosphate.

2.2 Production de l'acide phosphorique par voie humide

L'acide phosphorique commercialisé (52 à 54 % de P_2O_5) peut être élaboré par deux voies ou processus : le processus thermique et celui par voie humide. Celui par voie thermique, consiste à produire de l'acide phosphorique de qualité alimentaire à partir de la réduction de la roche phosphatée en présence du coke et de la silice dans un four à résistance électrique, à l'oxyder en P_2O_5 et à l'hydrater ensuite pour produire l'acide. Cet acide produit par voie thermique est extrêmement pur, mais il est également très énergétivore et par conséquent cher, produit en petites quantités, principalement pour la fabrication de phosphates industriels. Le processus par voie humide est le plus largement utilisé dans les usines d'engrais, et adopté en Tunisie. Généralement, ce processus élimine les émissions de poussières, qui renferment du fluor insoluble dans l'eau et peuvent se produire au cours des opérations de déchargement, de stockage, de manipulation et de broyage de la roche phosphatée.

La production d'acide phosphorique ou de l'anhydride phosphorique, dans les différentes usines du GCT, se fait par voie humide en faisant réagir de l'acide sulfurique sur des phosphates naturels (fluoroapatite), composés essentiellement de phosphate tricalcique et de fluorure de calcium mais également d'impuretés telles que la silice, le fluor, le titane et des métaux lourds. Il est à noter que grâce à sa réactivité, le phosphate de Gafsa est utilisé directement sans broyage. En adoptant la voie humide dans le processus de production de l'acide phosphorique, on empêche les émissions de poussières, qui renferment du fluor insoluble dans l'eau et peuvent se produire au cours des opérations de déchargement et de stockage.

La pulpe est préparée tout d'abord par un mélange du phosphate humide 10-18 % provenant des laveries de M'dhilla ou Shib, avec de l'eau. Ensuite, lors de l'opération de l'attaque, la pulpe va réagir avec l'acide sulfurique H_2SO_4. On obtient alors 2 phases : un liquide

et une solide. Il s'agit de l'acide phosphorique liquide et de la cristallisation du sulfate de calcium $CaSO_4$, $2H_2O$ solide, qui précipite et forme le phosphogypse (PG). Ce dernier est séparé de l'acide phosphorique par filtration (Fig. 1.5). Après la filtration, il se produit des gâteaux de gypse à dégager vers le milieu de stockage : il s'agit d'un espace libre (appelé Tabia) situé à 200 m de l'unité phosphorique. Le Talus peut atteindre 55 m de hauteur en raison de l'accumulation successive de ce sous-produit depuis des décennies. Au niveau du talus, la décantation de la boue gypseuse se produit et seul le gypse se dépose dans le bassin, alors que les eaux gypseuses ou filtrat sont collectées dans un puisard afin d'éviter le gaspillage d'eau, puis les eaux sont envoyées par des pompes situées à l'aval du talus, vers l'usine en vue d'une nouvelle utilisation.

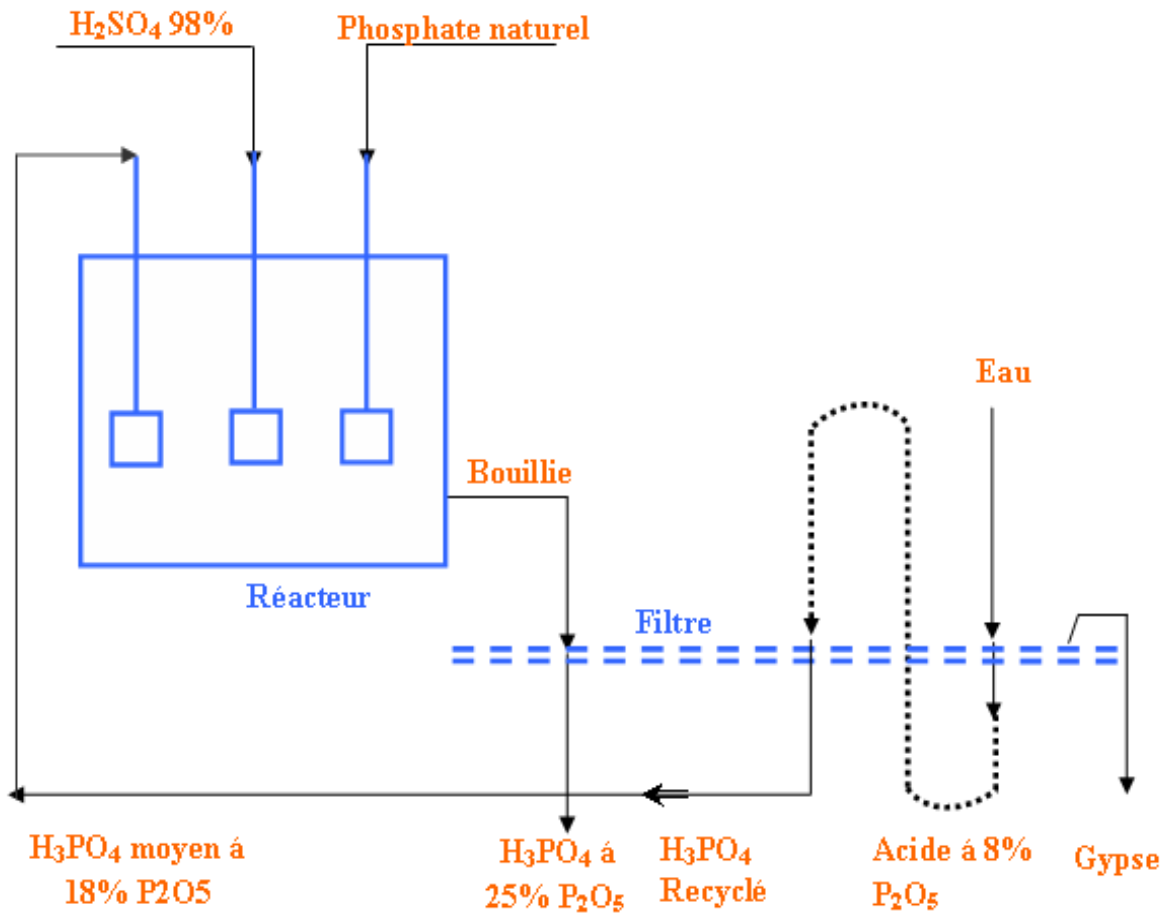


Figure 1.5. Schéma typique du procédé humide de la fabrication de l'acide phosphorique.

La surface totale à la base du terril de PG de l'usine de M'dhilla est de 36 ha. Pour des raisons d'exploitation, cette surface de mise en terril a été subdivisée pour des raisons d'exploitation en deux cellules qui sont d'une superficie totale de 126 ha à la base, d'une hauteur de 55 m et d'une superficie totale de 58 ha au sommet, pour un volume total de 47.720.000 m^3 de PG. Les deux cellules sont exploitées en alternance par cycles de 45 jours en moyenne : une cellule est en exploitation alors que le deuxième reste en phase de séchage et de préparation. Un cycle d'exploitation consiste à remplir une cellule avec le PG pendant que l'autre cellule est préparée en rehaussant ses digues en périphérie et sa prise d'eau. En l'absence de système de protection lors de l'édification des terrils de PG, l'infiltration souterraine est importante et par conséquent, un risque de contamination de la nappe phréatique par percolation se pose.

2.3 Emissions et rejets chimiques

Les émissions et les rejets chimiques de l'industrie des engrais, sont de trois types :

- des rejets gazeux de SOx, de gaz corrosifs qui résultent de la combustion du fuel lourd et de l'utilisation des procédés recourant au soufre, et des rejets des gaz fluorés ;
- des rejets liquides : il s'agit des eaux de lavage des gaz mais surtout des eaux accompagnant les phosphogypses ;
- des rejets solides : rejets de PG.

Généralement, les PG représentent le principal sous-produit de la production de l'acide phosphorique, constituant principal des engrais « modernes ». Le rejet de ce résidu forme la majeure partie du rejet global de l'usine.

En fait, la production de l'acide phosphorique n'est guère aisée en raison de la présence naturelle d'une multitude d'impuretés dans la roche phosphatée. Ainsi, il apparaît que les phosphates sous forme de roche est la principale source d'un ensemble d'impuretés dissoutes ou en suspension, qui se concentrent enfin dans les PG, déchet solide issu du procédé humide.

Sur le plan quantitatif, la production d'une tonne de P_2O_5 met en œuvre environ 3,5 à 4 t de phosphate ainsi que 0,8 à 1 t de soufre et génère 4,5 à 5,2 t de PG ; cette variation dépend naturellement de la nature du phosphate transformé.

Le développement de la production des engrais conduit à produire de plus en plus d'acide phosphorique, et par conséquent l'obligation de rejeter des quantités importantes de PG.

La production annuelle de PG par l'usine de M'dhilla est d'environ 1 million de tonnes. Elle représente 10 % de la production totale des PG en Tunisie. Celle-ci est estimée à 10 millions de tonnes pour l'ensemble des cinq usines de production d'acide phosphorique. Cette quantité augmentera probablement au cours des prochaines années.

3 Les phosphogypses (PG) : les sous-produits principaux de la transformation du phosphate

3.1 Généralités sur les phosphogypses

Les PG sont le sous-produit de la synthèse de l'acide phosphorique (H_3PO_4) ou de l'anhydride phosphorique (P_2O_5) par voie humide, en faisant réagir de l'acide sulfurique (H_2SO_4) sur des phosphates naturels. Une cristallisation du sulfate de calcium ($CaSO_4$, nH_2O) se produit d'abord qui précipite et forme le gypse appelé : phosphogypses, selon la réaction :

$$(Ca_{10}(PO_4)_6)\,F2 + 10\,H_2SO_4 + 20\,H_2O \xrightarrow{70 \text{ à } 80\ ^\circ C} 6\,H_3PO_4 + 10\,(CaSO_4 2H_2O) + HF$$

Minerai de phosphate	Acide sulfurique		Acide phosphorique	**Phosphogypses**	Acide fluorhydrique

La synthèse de l'acide phosphorique par voie humide conduit à la fabrication de 1,7 tonne de PG par tonne de phosphate naturel utilisé, soit l'équivalent de 5 tonnes de PG par tonne de phosphate P_2O_5 produites (Pérez-López et al., 2010). En général, une tonne et demi de PG est générée par tonne de roche phosphatée traitée, soit une production mondiale annuelle estimée à 258 Mt en 2018 (Saadaoui et al., 2017). En Tunisie, la production annuelle de PG est estimée actuellement à 10 Mt pour l'ensemble des cinq usines de production d'acide phosphorique (Sfar Felfoul et al., 2002).

3.2 Composition élémentaire des phosphogypses

Les PG se présentent sous la forme d'une très fine poudre humide, avec une teneur en eau de 20 à 30 % (Daligand, 2002, Jalali et al., 2016). Ils sont composés essentiellement de gypse (75 à 78 % pour le procédé au dihydrate) mélangé avec du phosphate de calcium sous différentes

formes, de la silice et d'autres impuretés de diverses natures telles que l'oxyde de fer, de magnésium et d'aluminium, des sulfures, de la matière organique, des ETM incluant des métaux lourds, des TR et des radionucléides (Sfar Felfoul et al., 2002 ; Al-Hwaiti et al., 2010 ; Bituha et al., 2013). Les ETM se retrouvent généralement dans la fraction fine (diamètre inférieur à 20 µm). Ils peuvent contaminer l'eau et les sols et posent un problème majeur découlant du stockage des PG, aggravé par la quantité considérable produite annuellement. Les teneurs minimales et maximales en éléments majoritaires composant les PG sont présentées dans le Tableau 1.4.

Tableau 1.4. Composition élémentaire des phosphogypses (Mangin, 1978 ; Simon, 1990 ; SNC-Lavalin, 1993; Singh, 2000 ; Sfar Felfoul et al.,2002).

Elément	Teneur minimale (%)	Teneur maximale (%)
SO_3	39,6	47,1
CaO	27,8	34,0
SiO_2	0,50	6,00
Na_2O	0,12	10,0
Corganique	0,10	2,50
F	0,10	1,80
P_2O_5	0,05	1,42
Al_2O_3	0,05	0,60
Cl	0,035	0,045
MgO	0,01	0,54
Fe_2O_3	0,01	0,25

La composition élémentaire des PG est variable. Elle dépend essentiellement de la nature du minerai, du type de procédé utilisé, de la durée du stockage et des contaminants éventuellement introduits lors du processus industriel. Le Tableau 1.5 présente la composition des éléments majoritaires en pourcentage de différentes sources de PG dans le monde.

Tableau 1.5. Composition élémentaire majeur en pourcentage de différentes sources de phosphogypses (Tayibi et al., 2009).

Composant	CaO	SiO_2	Al_2O_3	Fe_2O_3	MgO	SO_3	Na_2O	P_2O_5	F^-
Algérie	31,18	0,88	0,10	0,03	0,06	40,90	1, 32	0,87	1,20
Egypte	32,13	8,78	0,29	0,35	0.09	37,60	ND	1,82	0,80
Inde	31,09	0,29	0,54	1,31	43.21	0,29	0,29	0,47	0,86
Turquie	32,04	3,44	0, 88	0,32	ND	44,67	0,13	0,50	0,79
Chine	30,79	1,88	2,10	ND	0.8	42,56	ND	ND	ND
Maroc	30,5	9,5	2,8	0, 9	0.3	42,9	ND	0,5	0,15
Tunisie	31–32	ND	0,1	0,1	0.4	46	0,3	1,2	1,2
USA	25–31	3–18	0,1–0,3	0,2	ND	55–58	ND	0,5–4,0	ND

ND: non déterminé

3.3 Concentration en éléments traces métalliques dont les terres rares dans les phosphogypses

Les minerais de phosphate naturel utilisés pour la fabrication de l'acide phosphorique sont des sources potentielles d'ETM dont les TR. Lors de la production d'acide phosphorique, les lanthanides se concentrent en grande majorité dans les PG (70 % par la méthode dihydrate, quasi-totalité par la méthode hémihydrate). Les TR lourdes du Gd à Lu passent préférentiellement dans la solution d'acide phosphorique. Les TR légères précipitent avec le calcium dans le PG.

La composition en ETM dans les PG tunisiens comparés aux valeurs de fond géochimique dans les sols français (ASPITET) non définies en Tunisie, et aux valeurs seuils d'intervention qui règlementent l'usage des boues de stations d'épuration, est présentée dans le Tableau 1.6.

Tableau 1.6. Concentration en éléments traces rencontrés dans le phosphogpyspe tunisien exprimée en (mg/kg) comparé à des valeurs de fond géochimique dans les sols français (ASPITET) et à des valeurs seuils d'intervention ou qui règlementent l'usage des boues de stations d'épuration.

Elément	PG sfax (Felfoul, 2004) Min-max (mg/kg)	Sol naturel typique (Felfoul, 2004) (mg/kg)	Gamme valeurs courante sol Min-max (médiane) (mg/kg)	Seuil d'intervention ou d'investigation (mg/kg)	Norme dans le sol (NF U 44-041) (mg/Kg)
Arsenic	0,63-1,02	0.05	0,32-282 (7,03) [a]	76 [b]	ND
Baryium	13,3-18.5	580	30-1870 (375) [c]	920 [b]	ND
Cadmium	3,11-22.9	0.35	0,05-0,45 (0,16) [a]	0,70 [a]	2
Cerium	77,1-89.1	49	2,45-267 (48,2) [c]	ND	ND
Chrome	14,4-22.4	54	10-90 (66,3) [a]	100 [a]	150
Cobalt	ND	ND	2-23 (14,0) [a]	30 [a]	30
Cuivre	ND	ND	2-20 (12,8) [a]	35 [a]	100
Europium	1,94-2,46	1,9	0,05-6,99 (0,84) [c]	ND	ND
Lanthanum	50,1-59,3	37	1,10-143 (23,5) [c]	ND	ND
Lutetium	0,35-0,48	0,34	0,02-3,21 (0,3) [c]	ND	ND
Manganèse	ND	ND	408-1473 (754) [a]	ND	ND
Mercure (µg/kg)	24-29	90	0,02-0,1 [a]	4-36 [b]	1
Molybdenum	0,82-1,36	0.97	0,1-21,3 (0,62) [c]	190 [b]	ND

Neodymium	46,2-54,6	46	1,14-132 (20,8) [c]	ND	ND
Nickel	ND	ND	2-60 (31,0) [a]	70 [a]	50
Plomb	1,76-2,01	19	9-50 (34,1) [a]	60 [a]	100
Samarium	8,61-10,34	6.1	0,23-30,0 (3,96) [c]	ND	ND
Sélénium	ND	ND	0,1-0,7 [a]	100 [b*]	10
Strontium	1238-1375	240	8-3120 (89,0) [c]	ND	ND
Terbium	1,09-1,14	0,63	0,03-7,01 (0,6) [c]	ND	ND
Thorium	1,25-1,66	9,4	0,3-75,9 (7,24)[c]	ND	ND
Uranium	2,26-3,3	2,7	0,21-53,2 (2,03) [c]	10[a]	ND
Vanadium	ND	ND	2,71-537 (60,4) [c]	250 [b*]	ND
Ytterbium	2,68-3,45	2,3	0,09-25,0 (1,99) [c]	ND	ND
Yttrium	54,7-68,6	25	<3,0-267 (21.0) [c]	ND	ND
Zinc	20,7-182	60	10,00-100 (80) [a]	150 [a]	300
Zirconium	6,15-7,98	ND	5,00-1060 (231)[c]	230 [a]	ND

(a) Gamme de valeurs couramment gamme de valeurs observées dans les sols « ordinaires » de toutes granulométries, résultats généraux du programme ASPITET (Denis Baize, 2000).
http://www7.inra.fr/lecourrier/assets/C39Baize.pdf
(b) Seuil d'intervention : Dutch Target and Intervention Values, Soil Remediation Circular 2009. http://rwsenvironment.eu/subjects/soil/legislation-and/soil-remediation/.
(b*) niveau indicatif de contamination sévère : Dutch Target and Intervention Values, Soil Remediation Circular, 2009.
http://rwsenvironment.eu/subjects/soil/legislation-and/soil-remediation/
(c) valeurs de l'Atlas géochimique européen.
http://weppi.gtk.fi/publ/foregsatlas/ et http://weppi.gtk.fi/publ/foregsatlas/article.php?id=15
ND : non déterminé

3.4 Les phosphogypses et la radioactivité

Comme beaucoup de minerais, les minerais de phosphate naturel utilisés pour la fabrication de l'acide phosphorique sont naturellement radioactifs, des radioéléments se concentrent dans les PG (Tableau 1.7). Des recherches ont montré que la radioactivité est due au radium, provenant de la décomposition naturelle de l'uranium présent dans le minerai de phosphate. En général, la moitié de la dose de la radioactivité naturelle vient d'une seule source : le gaz du Radon-222 (Reguigui, 2005). En effet, l'uranium existe naturellement dans les dépôts de phosphate à des concentrations entre 50 et 150 mg/kg. Durant le procédé de production d'acide phosphorique, l'uranium et le thorium passent dans l'acide, alors que la majorité du radium se concentre dans les PG (Rutherford et al., 1995). Pendant la précipitation du $CaSO_4$, le radium est précipité avec le gypse sous forme de $RaSO_4$ insoluble, alors que l'uranium contenu dans le phosphate se trouve dans l'acide phosphorique.

Tableau 1.7. Activité radioactive des radioéléments dans les minerais de phosphate et dans le phosphogypse (Felfoul et al., 2004).

Radioélément	**Concentration dans le minerai de phosphate (Bq/kg)**	**Concentration dans le PG (Bq/kg)**
Actinium-227	46	14
Plomb-210	240 à 1835	250 à 1833
Polonium-210	238 à 1835	355 à 1765
Protactinium-231	46	14
Radium-226	40 à 5022	52 à 3219
Radium-228	30	24
Thorium-228	30	9
Thorium-230	867 à 1957	90 à 513
Thorium-232	11 à 622	2 à 39
Uranium-234	985 à 2183	68 à 470
Uranium-235	46	7
Uranium-238	90 à 4800	23 à 468

Le PG tunisien contient des teneurs plus faibles en radium 226 (215 Bq/kg en moyenne) et en uranium 238 comparé aux PG d'autres pays dans le monde. Les concentrations de l'uranium

(17,1 Bq/kg) et du thorium (9,5 Bq/kg) sont inférieures à la moyenne de ces radioéléments trouvés dans les sols en Tunisie (Reguigui et al., 2005).

3.5 Gestion des phosphogypses

Il existe essentiellement 3 méthodes de gestion des PG dont : 1) le stockage en terril ou rejet en mer ou en rivière ; 2) l'utilisation comme matière primaire dans l'industrie chimique ou comme matériau de construction (Ajam et al., 2009, Saadaoui et al., 2017) ; 3) l'utilisation en agriculture (Papastefanou et al., 2006 ; Tayibi et al., 2009). Ces études et essais, qui avaient pour objectif initial l'utilisation du PG à l'état brut et en proportions importantes dans les mélanges, n'ont pas permis à ce jour d'obtenir des matériaux aux performances comparables à celles des matériaux traditionnels. L'utilisation du PG en technique routière, considérée comme une voie potentielle pour mobiliser de grandes quantités de ce matériau (Felfoul et al., 2002), pourrait poser des problèmes environnementaux, du fait de la solubilité des constituants toxiques voire radioactifs contenus dans le PG. Ces impuretés peuvent être drainées par les eaux d'infiltration et causer la pollution du sol, de la nappe phréatique ou des zones humides (Tayibi et al., 2009). Contrairement aux composés organiques, les ETM ne sont pas biodégradables par les microorganismes. Ils sont toxiques à de très faibles concentrations et ont tendance à s'accumuler dans les systèmes vivants (bioaccumulation) (Hentati et al, 2005).

4 Mobilité des éléments traces métalliques (ETM)

4.1 Notion de la mobilité

La **mobilité** est l'aptitude d'un élément à se déplacer successivement dans les compartiments du sol, d'un compartiment où il est retenu avec une certaine énergie vers un autre, où il est retenu avec une moindre énergie (Juste 1988 ; Baize, 1997 ; McLaughlin et al., 2000). Dans le sol, les ETM peuvent se trouver i) soit dans la solution du sol, dissous ou complexés avec les espèces organiques ou inorganiques en solution, ii) soit en interaction avec la phase solide organique ou minérale ou encore piégés dans les réseaux cristallins.

Calvet (2003) a proposé une échelle de la mobilité en fonction de sa localisation dans le sol (Figure 1.6). Il distingue ainsi :

- Les ions en solution libres ou complexés, très mobiles ;
- Les ions adsorbés sous forme de complexes de sphère externe (désigne les ions qui conservent leur entourage de molécules d'eau (sphère d'hydratation)) ; ces ions sont moins fortement liés que les complexes de sphère interne (désigne les ions qui ne

conservent pas leur sphère d'hydratation lors de l'adsorption), et par conséquent plus mobiles. Ils nécessitent un échange ionique pour passer en solution ;

- Les ions adsorbés sous forme de complexes de sphère interne ; ils sont plus difficilement échangeables et moins mobiles ;
- Les ions précipités dont la mobilité dépend étroitement du pH du milieu ; ils sont très mobiles dans un milieu à pH acide et au contraire ils le sont beaucoup moins mobiles si le pH ne varie pas ;
- Les ions piégés dans des réseaux cristallins lors de coprécipitations ; ils ne sont pas mobiles ; il faut une altération de ces réseaux pour les libérer.

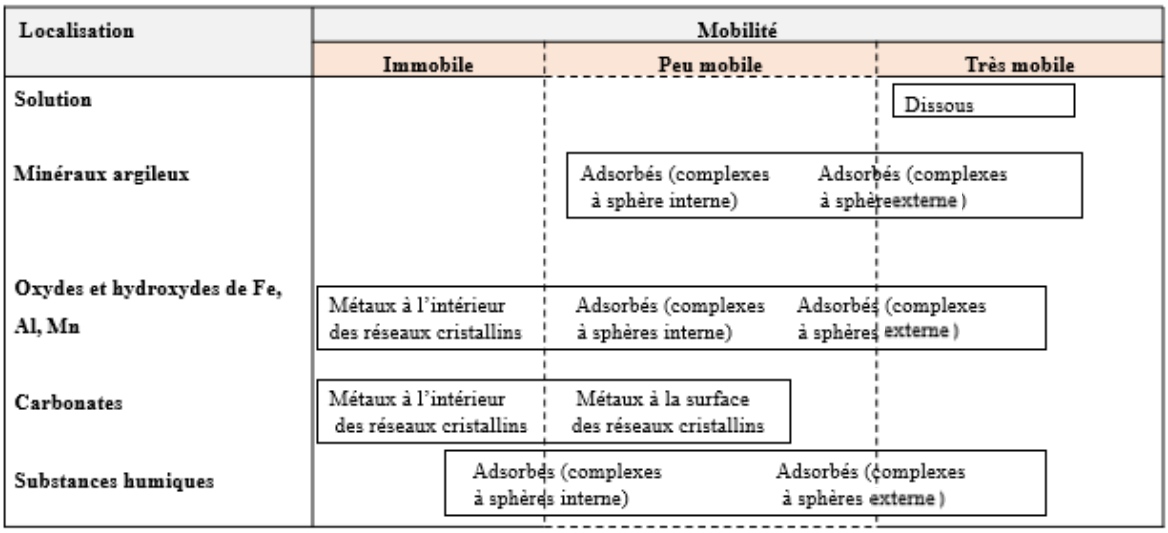


Figure 1.6. Localisation et mobilité des métaux dans le sol (Calvet, 2003).

4.1.1 Interaction entre les phases minérales et les éléments traces métalliques

En plus des constituants des sols susceptibles de fixer les ETM qui sont les argiles, les carbonates, la silice, les (hydro) oxydes de métaux principalement ceux du fer ou du manganèse et la matière organique, les processus physico-chimiques de rétention (adsorption, complexation, précipitation) peuvent intervenir simultanément avec une plus ou moins grande intensité sur l'interaction totale entre les contaminants et les constituants du sol. Selon les conditions physico-chimiques du milieu, un processus peut être prédominant par rapport aux autres, mais il n'est jamais seul et il est souvent difficile pour les milieux complexes tels que les sols de déterminer quels sont les mécanismes sont à l'origine de la fixation des ETM dans

le sol. Cette fixation se fait par sorption et peut se définir comme le passage d'un ion de la phase liquide à la phase solide. La sorption des ETM sur le sol peut avoir lieu par plusieurs mécanismes chimiques et biologiques (Figure 1.7).

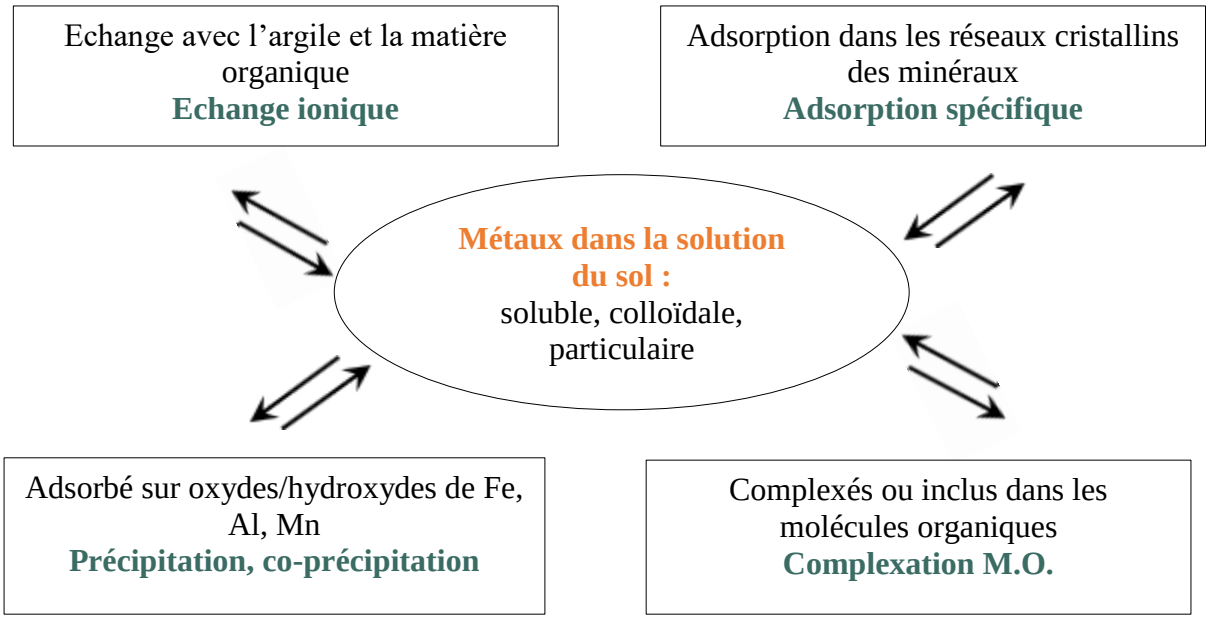


Figure 1.7. Différentes formes et mécanismes de fixation des ETM dans le sol (Baize, 1997).

Les processus mentionnés comprennent :

- l'adsorption non spécifique ou physiosorption ou échange ionique (liaison électrostatique) : les cations et les anions sont adsorbés sur les particules du sol au moyen des forces électrostatiques ;
- l'adsorption spécifique ou chimiosorption (liaison covalente). Ce type d'interaction est indépendant du pH. Les oxyhydroxydes de Fe et d'Al sont des composants du sol qui permettent aux anions de s'adsorber spécifiquement ;
- la complexation (liaison covalente coordinative). Les ions métalliques peuvent être complexés avec la matière organique du sol par association entre les cations métalliques et les groupes fonctionnels des substances humiques formant des complexes chélatés. L'augmentation du pH détermine la stabilité des complexes en raison de l'ionisation des groupes fonctionnels. Les groupes de surface de ces substances se comportement comme des ligands organiques complexant (Evans, 1989) ;
- la précipitation. Elle correspond au passage d'une espèce de l'état dissous à l'état solide. Ce mécanisme peut avoir lieu à la surface des phases solides du sol ou dans la

phase aqueuse interstitielle du milieu et est contrôlé par le pH. Sur les phases solides, un accroissement de la surface du solide est obtenu, ou un nouveau solide à l'interface solide/liquide se forme selon un arrangement tridimensionnel. La précipitation a lieu quand le produit de solubilité est dépassé (Bride, 1989) : la teneur en métal soluble dans la solution est suffisamment élevée pour qu'une nouvelle phase solide apparaisse.

4.1.2 Comportement géochimique de certains éléments traces métalliques

4.1.2.1 Le cadmium et le strontium

Le comportement et le devenir des ETM dans le sol (phase solide) et dans la solution du sol dépendent des fractions auxquelles ils sont associés et des interactions développées. Alors que certains restent fixés dans les constituants de sol (argiles, oxydes de fer et de manganèse, carbonates, matière organique et sulfures) réduisant la possibilité de transfert entre les compartiments du sol vers les organismes vivants et les nappes phréatiques, d'autres, simplement adsorbés, peuvent être mobilisés entre les différents compartiments.

- Le cas du Cd : Dans l'environnement, le cadmium n'est presque jamais trouvé à l'état métallique, mais dans son état d'oxydation unique, c'est-à-dire 2+ (Adriano, 2001). Les principaux composés du cadmium sont l'oxyde de cadmium (CdO), le chlorure de cadmium ($CdCl_2$), le sulfure de cadmium ($CdSO_4$). Ils se combinent très facilement avec le soufre minéral et organique. Le cadmium a tendance à s'accumuler dans les horizons supérieurs du sol, riches en matière organique, bien qu'il soit assez mobile dans les sols. Cette mobilité est essentiellement fonction du pH du sol, son adsorption par la phase solide du sol pouvant être multipliée par un facteur de 3 lorsque le pH augmente d'une unité dans la plage 4-8 (Adriano, 2001). Dans le sol, il existe sous forme soluble dans la solution du sol : $CdCl_2$, $CdSO_4$ ou sous forme de complexes insolubles inorganiques ou organiques avec les constituants du sol. Dans l'air, le cadmium et ses composés ne sont pas ou sont très peu volatils. Il est présent sous forme particulaire, la principale forme étant l'oxyde de cadmium (les autres formes étant des sels de cadmium) (INERIS, 2005).
- Le cas du Sr : Dans le sol, le Sr s'adsorbe rapidement souvent sous sa forme cationique Sr^{2+} par échange ionique avec le Ca ou avec les autres cations échangeables. Contrairement à son adsorption, la désorption du Sr dans le sol est beaucoup plus lente. De ce fait, le Sr est moyennement mobile dans le sol. Son adsorption augmente légèrement avec le pH et diminue avec l'augmentation de la force ionique. Han et al., (2016) ont étudié la distribution verticale du Sr dans le sol de l'île de Jeju en Corée du Sud suite à l'accident Fukushima-Daiichi. Ils ont

montré que la majeure partie de Sr reste dans les 10 premiers cm. Le Sr est retenu plus efficacement par les sols organiques que par les sols à faibles teneurs en matière organique. Le Sr n'est pas un élément essentiel pour les plantes, son transfert dans les végétaux dépend de la présence des cations Ca^{2+} et Mg^{2+} échangeables dans le sol (Camps et al., 2004).

4.1.2.2 Les terres rares

Les TR, ont des propriétés chimiques très voisines. Dans les conditions naturelles, la totalité de ces éléments se trouve sous forme stable trivalente dans l'environnement. Cependant deux exceptions existent : i) en conditions réductrices, l'Eu^{3+} peut acquérir l'état d'oxydation 2^+ et, ii) en conditions oxydantes, le Ce^{3+} peut acquérir l'état d'oxydation 4^+. Ce comportement particulier induit des anomalies dans la distribution de ces deux éléments dans différents milieux naturels. Les concentrations et la forme des spectres de TR dans les sols varient selon la roche mère, la pédogenèse et le type de sol (Laveuf et Cornu, 2009). Les horizons profonds présentent généralement des teneurs en TR légèrement plus importantes que les horizons de surface (Harlavan et al., 2009). Il a été montré que certains sols présentent une anomalie négative en cérium quel que soit le type de sol (Figure 1.8).

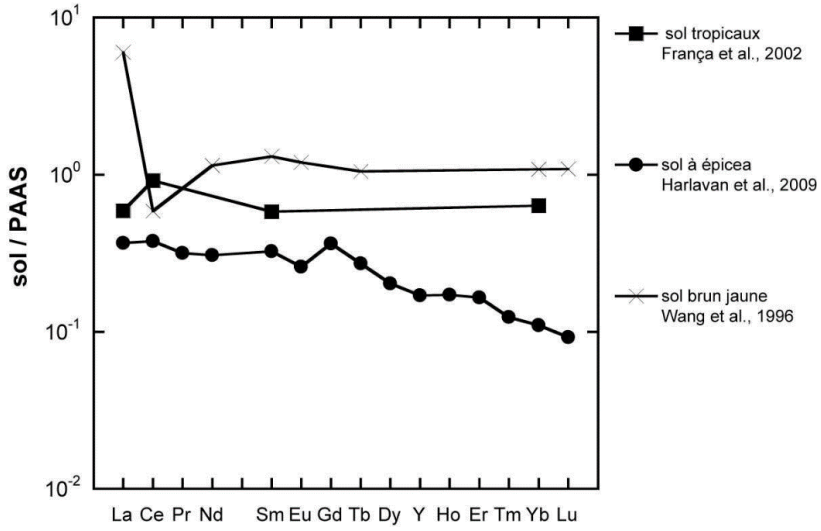


Figure. 1.8. Spectres des TR ; normalisation par rapport au Post Archean Australian Shales (PAAS) (concentrations en TR de la croûte continentale permettant de normaliser la variation naturelle d'abondance des TR, normalisation des spectres) pour les sols de trois études différentes, França et al. 2002 ; Wang et al. 2003 ; Harlavan et al. 2009).

Les données de la littérature sur le comportement géochimique des TR en milieu continental démontrent l'itinéraire complexe de ces éléments dans les sols. De façon générale les TR sont mobiles lors de la pédogénèse, cependant elles ne migrent pas en solution sur de

grandes distances et sont le plus souvent redistribuées dans les profils de sol (França et al., 2002 ; Harlavan et al., 2009).

4.2 Biodisponibilité des éléments traces métalliques

4.2.1 Notion de la biodisponibilité

La **biodisponibilité** est l'aptitude d'un élément à être transféré d'un compartiment du sol vers un organisme vivant (bactérie, animal, homme ou plante) (Baize, 1997). Lorsqu'il s'agit des plantes, le terme approprié est plus particulièrement : **phytodisponibilité**.

La biodisponibilité dépend de paramètres physico-chimiques et biologiques et résulte de l'enchaînement de deux étapes : la mobilisation et le transport de l'élément vers un organisme du sol (Baize, 1997 ; Calvet et al., 2003). La **fraction biodisponible** représente la fraction soluble des ETM qui peut traverser la membrane des organismes vivants du sol (Semple et al. 2004). Quand cette définition implique une notion de laps de temps, on parle alors de la bioaccessibilité qui correspondrait à une sorte de « maximum potentiellement biodisponible ». La **fraction bioaccessible** représente alors la totalité de la fraction des ETM qui peut être mobilisée par un organisme, il s'agit de la fraction échangeable extrait du sol par des méthodes physiques ou chimiques (Semple et al., 2004).

4.2.2 Facteurs influençant la biodisponibilité

4.2.2.1 Facteurs abiotiques

La mobilité d'un élément métallique dans le sol est contrôlée, par sa forme chimique ainsi que par les réactions abiotiques régissant sa spéciation. Ces réactions peuvent, elles même, être influencées par les propriétés du sol : le pH, potentiel d'oxydoréduction, présence et la nature des ligands et des colloïdes organiques et minéraux (Tableau 1.8).

- Le pH : Il s'agit d'un paramètre crucial pour la mobilité et la biodisponiblité des ions métalliques. Les protons proviennent en majeure partie de la respiration des végétaux et des microorganismes, ainsi que de l'oxydation des sulfures et des ions ammonium. Par contre, ils sont « consommés » par l'hydrolyse des minéraux d'altération. Ainsi, lorsque le pH augmente, les cations sont moins solubles et les anions sont plus solubles (Berthelin et Leyval 2000). De plus, cette augmentation de pH peut induire la formation d'espèces précipitées qui peuvent limiter la solubilité et la biodisponibilité de toutes les espèces ioniques (Deneux-Mustin et al., 2003). Cependant, elle entraîne aussi la dissolution de la matière organique et la formation consécutive de complexes organométalliques plus solubles. De ce fait, la variation

du pH a des conséquences complexes sur la mobilité des métaux lourds, en particulier en présence de ligands organiques et inorganiques.

Tableau 1.8. Influence des propriétés du sol sur la mobilité des métaux (Berthelin et Leyval, 2000).

Propriétés du sol	Effets fondamentaux	Effet sur la mobilité
pH faible	Diminution de l'absorption des cations Augmentation de l'adsorption des anions sur les oxydes métalliques	↑ ↓
pH élevé	Augmentation précipitation des cations sous forme de carbonates et hydroxydes Augmentation de l'adsorption des cations sur les oxydes métalliques Augmentation de l'adsorption des cations sur les composés humiques	↓
	Augmentation de la complexation des cations sur des ligands solubles Diminution de l'adsorption des anions	↑
Eh	Eh faible : Précipitation sous forme de sulfures, si présence de sulfates Augmentation de la solubilité des oxydes divalents par rapport aux trivalents	↓↑
Présence de ligands (organiques et minéraux) en solution	Augmentation de la solubilité des métaux	↑
Teneurs élevées en argiles	Augmentation de l'adsorption des cations en traces	↓

- Le potentiel redox (Eh) : Il permet la caractérisation des échanges d'électrons entre les espèces chimiques. Ainsi, les formes oxydées prédominent pour un potentiel redox élevé, alors que les faibles valeurs favorisent l'apparition d'espèces réduites. Dans le sol, les valeurs les plus courantes du potentiel redox naturel sont comprises entre -200 mV et 400 mV, domaine de potentiel qui recouvre des degrés d'oxydation variés de nombreuses espèces en solution, influant ainsi directement ou indirectement sur la mobilité des métaux qui constituent ces espèces minérales. Le Cr^{3+} peut ainsi subir une oxydation directe en Cr^{6+}, plus mobile et plus toxique. La modification du degré d'oxydation des ligands ou des éléments se liant avec le métal influence en effet indirectement la solubilité des ETM. En conditions réductrices, les sulfates sont réduits en sulfures qui piègent volontiers les éléments chalcophiles tels que Fe, Zn, Pb, Cd (Deneux-Mustin et al., 2003 ; Berthelin et Leyval 2000). La dissolution des (hydr)oxydes est favorisée entraînant de manière opposée la solubilisation des métaux associés. Bien que l'influence des conditions oxydoréductrices du sol semble très importante pour la mobilité des éléments métalliques, il n'en demeure pas moins que ce facteur apparaît souvent comme secondaire par rapport au pH. Par ailleurs pour un sol donné, l'Eh varie en fonction inverse du pH, il augmente quand le pH diminue (Deneux-Mustin et al., 2003). Enfin, il est relativement difficile d'interpréter les valeurs obtenues. En raison du nombre important de couples redox et de la cinétique des réactions.

- La capacité d'échange cationique (CEC) : Elle caractérise la capacité d'un sol à stocker et à restituer les éléments minéraux : les particules fines d'argile, à forte CEC, sont chargées négativement et adsorbent donc les particules de charges opposées. De ce fait, les cations métalliques peuvent se fixer à la surface des particules d'argile par échange de protons H^+, entraînant une baisse de leur disponibilité.

4.2.2.2 Facteur biotique : l'activité biologique (les micro-organismes et les plantes)

La compréhension globale des phénomènes biologiques intervenant dans la solubilité des ETM dans les sols est rendue difficile par la multiplicité des actions et interactions à tous les niveaux. Parmi les microorganismes, on retrouve de nombreuses populations bactériennes et fongiques dont les activités métaboliques influencent la mobilité des ETM. Cette mobilité découle aussi de l'activité des plantes. Les principaux mécanismes agissant sur la mobilité des ETM sont présentés dans le Tableau 1.9 (Gadd, 2004).

Tableau 1.9. Mécanismes de mobilisation et immobilisation des éléments traces métalliques par les microorganismes du sol.

		Effets principaux
Mécanisme	**Mobilisation des métaux** (Gadd, 2004)	
Lixiviation	*Microorganismes Hétérotrophes*	- Acidification par les micro-organismes chimioorganotrophes de l'environnement par efflux de protons ou par accumulation de CO_2respiratoire - Production de sidérophores ou d'acides organiques
	Microorganismes Autotrophes	- Bactéries chimiolithotrophes acidophiles - Oxydation de Fe II et composés soufrés→ Acidification du milieu
Biométhylation		- Possible pour Ag, Hg, Pb, Se, Sn, Te - Composés méthylés plus mobiles
Réactions d'oxydoréduction		- Réduction des oxyhydroxydes métalliques - Oxydation des sulfures
Immobilisation des métaux		
Biosorption		- Réactivité aux métaux des parois bactériennes (groupements carboxyliques du peptidoglycane et groupements phosphates de l'acide téichoïque et téichuronique) et fongiques (mélanine, chitine et chitosan ; mêmes groupements ; (Volesky et Holan, 1995) - Réactivité des biofilms bactériens grâce aux exopolysaccharides (EPS)
Bioaccumulation		- Piégeage des métaux intracellulaires par des métallothionéines (Howe et al.,1997) ou phytochélatines (Rauser, 1995)
Précipitation		- Réduction des sulfates en sulfures par des bactéries sulfato-réductrices (BSR) - Sécrétion d'oxalate, phosphates et carbonates (Gadd,2004)
Réactions d'oxydoréduction		- Réduction des sulfates ensulfures - Oxydation de Fe et Mn sous forme d'oxyhydroxydes (Fe, Mn)

Comme les bactéries, les plantes sont également capables de mobiliser ou d'immobiliser les ETM en modifiant les caractéristiques du sol au niveau de la rhizosphère (Hinsinger, 2001) (Figure 1.9). Cela se produit grâce à des phénomènes d'acidification/alcalinisation, par modification du potentiel redox et l'exsudation de chélateurs métalliques et de ligands organiques (Zeng et al., 2008 ; Huang et al., 2014) :

i) Modification du pH :

Pour maintenir l'électroneutralité dans la cellule lors de l'absorption d'ions, la plante prélève par les racines des protons lorsqu'elles absorbent plus d'anions que de cations et cèdent des protons dans le cas inverse (Hinsinger et al., 2003). Dans ce deuxième cas, la modification du pH dans la rhizosphère, il baisse généralement de 1 à 2 unités par rapport à celui du sol non rhizosphérique (Tremel-Schaub et Feix, 2005).

ii) La production d'exsudats racinaires :

Les **exsudats racinaires** sont par définition l'ensemble des substances ou composés excrétées par les racines dans le sol. Ces composés sont nombreux et variés, parmi lesquells des acides organiques de faibles poids moléculaires (acide acétique, acide oxalique, acide citrique, malate, succinate), des acides aminés, des phénols et des phytosidérophores. Ces composés, par leurs propriétés complexantes, peuvent complexer les ETM et les rendent solubles, ce qui modifie le pH et l'équilibre ionique de la rhizosphère et par conséquent peut favoriser la mobilité et la biodisponibilité des ETM (Huang et al., 2014) incluant les TR (Ryan et al., 2001).

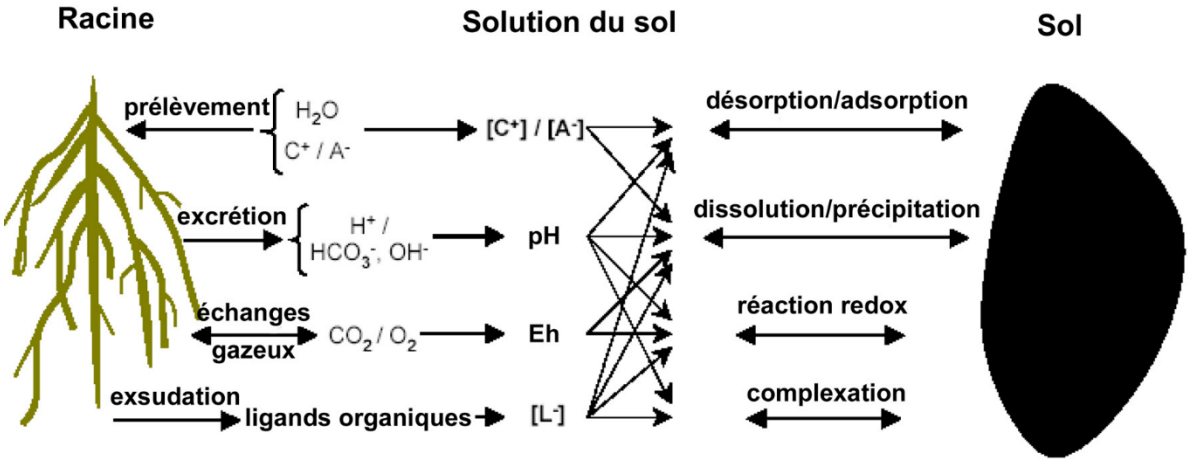


Figure 1.9. Interactions sol-plante dans la rhizosphère [CO : carbone organique (réducteur, chélatant, ligand) ; C^+ : cation ; A^- : anion ; L^- : ligand ; Eh : potentiel redox] (Hinsinger, 2001).

4.3 Phytodisponibilité des ETM

4.3.1 Notion de la phytodisponibilité

La **phytodisponibilité** est la quantité d'élément qui peut être prélevée du sol et transférée dans la plante durant son développement (Bourrelier et al., 1998) : c'est le transfert de l'élément de la phase solide du sol à la solution du sol puis aux tissus de la plante. Elle résulte de la succession des processus suivants : l'offre du sol (Morel, 1997), le transport vers les racines et le prélèvement par les racines (Tremel-Schaub et Feix, 2005). On peut distinguer deux types de phytodisponibilités, une **phytodisponibilité immédiate :** correspondant à la fraction immédiatement absorbable par la plante, soit la fraction en solution et celle échangeable en contact avec les racines, et une **phytodisponibilité potentielle :** correspondant à l'offre du sol (Morel, 1997). Il s'agit de la fraction qui a la capacité de passer en solution en un cycle de culture et que la plante peut prélever au cours de sa croissance (les fractions solubles, adsorbées (échangeables) et une partie de la fraction fortement liée aux phases solides). Elle permet de prendre en compte la cinétique de recharge potentielle de la fraction immédiatement phytodisponible par les autres constituants solides du sol ou les microorganismes.

4.3.2 Mécanismes de prélèvement des ETM incluant les terres rares par les plantes

Le prélèvement des ETM peut se faire soit par voie atmosphérique (retombées et poussières), soit directement à partir du sol, plus précisément de la solution du sol dans laquelle baignent les racines.

4.3.2.1 Prélèvement *via* la voie atmosphérique : absorption par les feuilles

Le prélèvement des ETM par les parties aériennes est l'un des mécanismes qui permet de fixer les ETM. Dans les zones à activité industrielle importante, les plantes subissent une contamination qui peut provenir des retombées atmosphériques (aérosols et poussières, fumées des industries et particules déplacées par le vent). Les analyses quantitatives des ETM prélevés par cette voie permettraient de quantifier les éléments prélevés. Néanmoins, pour le cadmium, les transferts *via* la voie atmosphérique peuvent être négligés dans les contextes agricoles éloignés des sources de contamination (Denaix, 2007).

4.3.2.2 Prélèvement racinaire : Absorption par les racines et translocation vers les parties aériennes

Plusieurs ETM se trouvent dans le sol sous une forme insoluble alors que le végétal ne pourrait prélever que des espèces chimiques solvatées. Par conséquent, il est nécessaire que l'élément passe en solution pour être absorbé par la racine. Pour désorber les ETM de la matrice du sol, les plantes utilisent principalement deux méthodes : l'acidification de la rhizosphère par l'action de pompes protéiques de la membrane plasmique ou par la sécrétion de ligands capables de chélater les ETM.

Les ETM, incluant les TR ainsi solubilisés, peuvent entrer dans le symplaste racinaire à travers la membrane plasmique des cellules endodermiques racinaires comme ils peuvent entrer dans l'apoplaste racinaire à travers l'espace intercellulaire (Figure 1.10). Quand il est possible aux solutés de circuler dans la plante par le flux apoplastique, la voie la plus efficace serait le xylème. Pour entrer dans le xylème, les solutés doivent traverser la bande de Caspary, une couche cireuse et imperméable, à moins qu'ils passent à travers l'endoderme au moyen d'une pompe membranaire ou de canaux destinés à transporter les nutriments essentiels pour la plante. Une fois chargés dans le xylème, les métaux doivent être transportés vers les feuilles, où ils seront chargés dans les cellules foliaires en traversant de nouveau une membrane plasmique. Les types cellulaires où les ETM seront déposés varient entre les espèces accumulatrices.

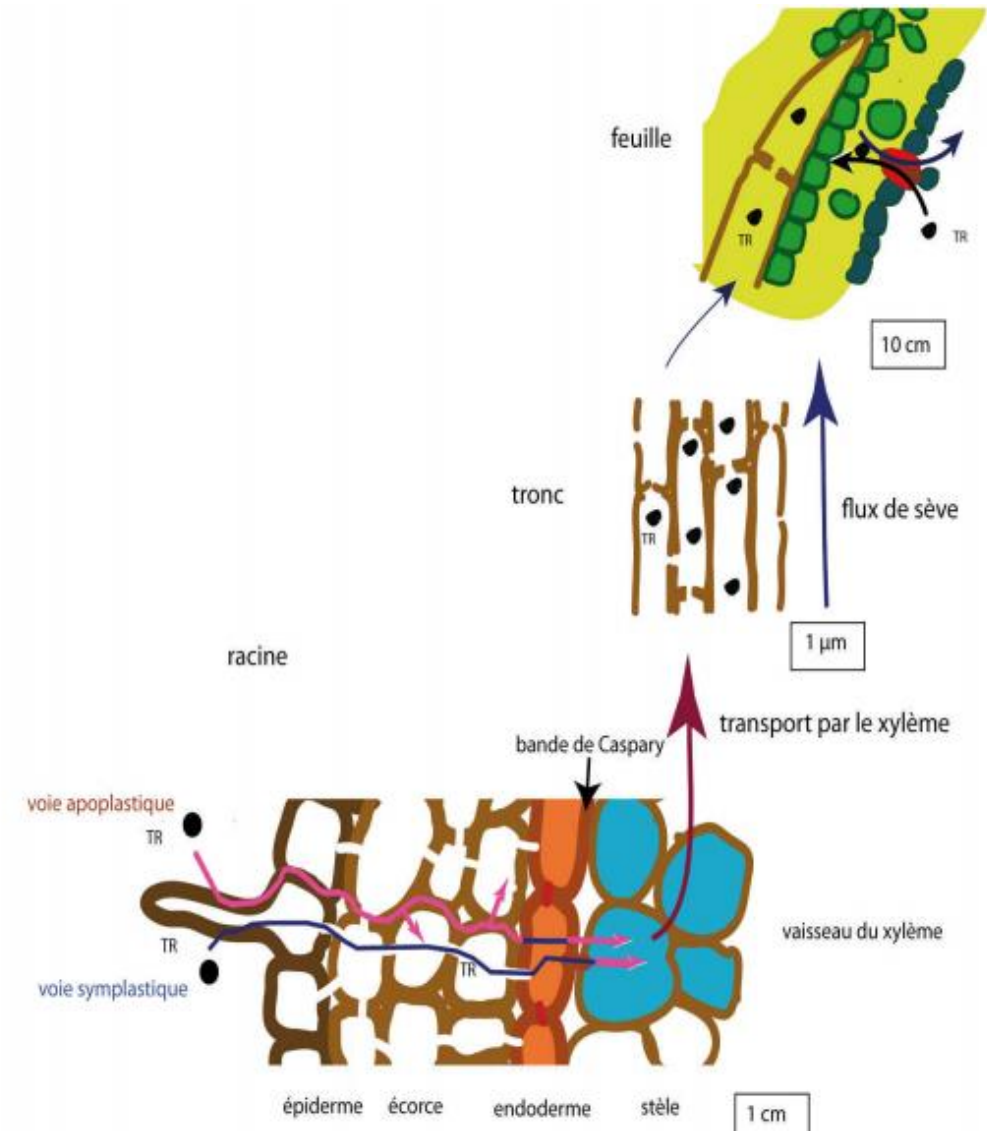


Figure 1.10. Schéma de synthèse du transfert des éléments traces métalliques dont les terres rares (TR) à l'intérieur de la plante, des racines *via* les deux voies de transfert (apoplastique et symplastique), puis *via* le xylème et enfin dans les feuilles (Shan et al., 2003 ; Campbell et Reece, 2005).

4.3.3 Variation de la réponse des plantes vis-à-vis de la présence des polluants (toxicité et tolérance)

Le prélèvement des ETM du sol par une plante peut être décrit par le rapport entre les teneurs en ETM dans le sol et celles dans les parties aériennes des plantes ou facteur de bioconcentration (FBC). Trois catégories de plantes peuvent pousser sur des sols métallifères (Figure 1.11) (Baker, 1981) :

- Les plantes **exclusives** : Ces plantes empêchent efficacement le métal de passer dans les parties aériennes quel que soit la concentration en cet élément dans le sol (jusqu'à une teneur seuil au-delà de laquelle la plante ne peut plus réguler l'entrée du métal dans la racine, entrainant sa mort et l'entrée massive d'ETM. Cependant, elles peuvent contenir de grandes quantités d'ETM dans leurs racines ;
- Les plantes **indicatrices** : Ces plantes accumulent le métal dans leurs parties aériennes avec des concentrations proportionnelles à celles dans le sol ;
- Les plantes **accumulatrices** et **hyper accumulatrices**. Ces plantes accumulent les ETM dans leurs parties aériennes pour atteindre des concentrations plus que proportionnelles comparées à celles du sol, sans pour autant montrer de signes de toxicité.

La plante estdésignée comme un accumulateur, comme une plante « indifférente » (appelée aussi plante bioindicatrice) ou exclusive lorsque les FBC sontrespectivement > 1, = 1 ou <1(Baker, 1981)

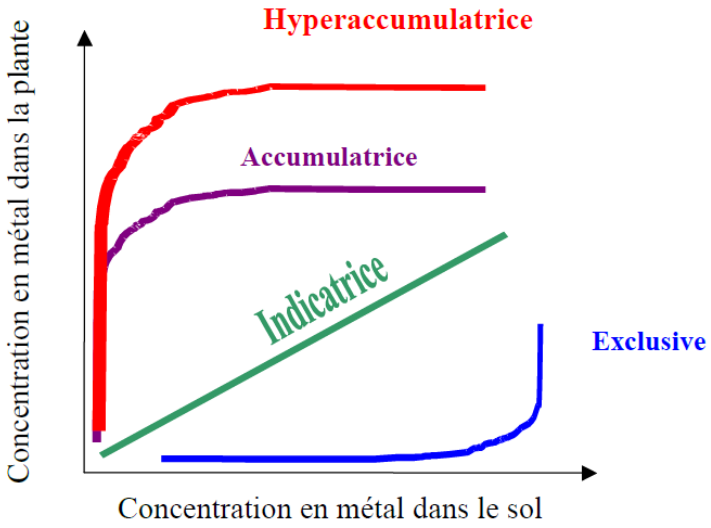


Figure 1.11. Catégories de plantes poussant sur des sols métallifères (D'après Baker, 1981).

Une plante est considérée comme **hyperaccumulatrice** lorsque les teneurs en métaux lourds dans ses parties aériennes dépassent les valeurs seuils suivantes (Baker et Walker, 1989) :

- 100 mg/kg MS pour le Cd ;
- 1000 mg/kg MS pour le Ni, le Cu, le Co et le Pb ;

- 10 000 mg/kg MS pour le Zn et le Mn.

Pour classer les plantes hyperaccumulatrices, les concentrations trouvées dans les plantes doivent être 10-500 fois plus élevées que celles qui grandissent dans des environnements non pollués (Yanqun et al., 2005).

Il existe au moins 400 espèces végétales réparties en 45 familles botaniques considérées hyper accumulatrices des ETM dont 300 accumulent préférentiellement le Ni (Miransari, 2011) et seulement une prélève le Cd. Les familles botaniques les plus utilisées en phytorextraction sont les Astéracées, Brassicacées, Caryophyllacées, Cypéracées, Cunoniacées, Euphobiacées, Fabacées, Flacourtiacées, Lamiacées, Poacées, et Violacées (Barceló et Poschenrieder, 2003).

Pour les TR, certaines plantes, principalement les fougères, comme *Pronephrium simplex* peuvent extraire des TR à des concentrations supérieures à 0,1 % de la biomasse sèche (1,2mg/g de la masse sèche foliaire) (Wang et al., 2003 ; Wei et al. 2006). Certaines plantes sont connues hyperaccumulatrice des TR : Carya tomentosa (1350 mg/kg ; Thomas, 2011), Dicranopteris dicthotoma (3358 mg/kg ; Wang et al. 2003), Blechnum orientale (1022 mg/kg Xiao et al. 2003), Pronephrium simplex (1234 mg/kg ; Lai et al. 2005), Pronephrium triphyllum (1027 mg/kg ; Xue 2009) et Carya spp (890 mg/kg ; Wood et Grauke, 2011).

4.4 Evaluations de la spéciation, la mobilité et la biodisponibilité des ETM

Comme la concentration totale en ETM ne suffit pas pour comprendre leurs comportements dans le sol et leurs devenirs dans l'environnement, il est indispensable d'évaluer également les principaux facteurs qui expliquent la toxicité des ETM dans l'environnement et qui sont la spéciation, la mobilité et la biodisponibilité. La mobilité des éléments traces, ainsi que leur biodisponibilité, sont étroitement liées à leurs **spéciations chimiques** dans les sols (McBride, 1989).

En générale, les méthodes d'analyses, de la spéciation chimique, de la mobilité et de la biodisponibilité des ETM dans les sols sont classées en deux groupes, des méthodes physiques, permettant la caractérisation directe de l'échantillon solide et des méthodes chimiques utilisant des réactifs chimiques de force croissante.

4.4.1 Méthodes physiques

L'avantage de ces méthodes physiques est la possibilité d'analyse spatiale (en surface et en profondeur) en plus de l'analyse élémentaire du solide. Plusieurs techniques sont employées parmi lesquelles : la spectrométrie du solide (Spectrométrie de masse à décharge luminescente (GDMS), la spectrométrie de masse à ionisation secondaire (SIMS), la

spectroscopie électronique (Spectrométrie photo électronique (ESCA), spectroscopie Auger) et la fluorescence X (XRF). Il existe également des techniques d'analyse solide permettant de caractériser la forme chimique de l'élément tels que l'Extended X-ray Absorption Fine Structures (ESCA) et le X-Ray Absorption Near Edge Structure (Xanes) (Cornu et Clozel, 2000). Bien que ces méthodes soient puissantes et prometteuses, elles sont lourdes à mettre en œuvre et coûteuses.

4.4.2 Méthodes chimiques

4.4.2.1 Extractions chimiques simples

La méthode d'extraction chimique simple est employée pour estimer les fractions biodisponibles et bioaccessibles facilement échangeables des ETM (Motaghian et Hosseinpur,2013). Cette méthode utilise différents solvants chimiques. Quatre types de solutions d'extraction sont principalement utilisées : l'eau déionisée, les solutions salines ($CaCl_2$, Ca $(NO_3)_2$, NH_4NO_3), les acides dilués (HCl ou HNO_3) et les complexants organiques (L'EDTA ou acide éthylène diamine tétra acétique et le DTPA ou acide di éthylène triamine penta acétique) (Tableau **1.10**).

Tableau 1.10. Exemples de solutions d'extraction utilisées pour estimer la biodiponibilité des métaux dans le sol (Harmsen, 2007).

Type d'extraction	Simple	Exemple
Eau	La concentration de l'eau interstitielle du sol	Rhizon échantillonneur, Centrifugation
Sel neutre	La concentration de l'eau interstitielle du sol	0,01 M $CaCl_2$ 1 M NH_4NO_3 0,1 M $NaNO_3$
Acide	Potentiellement soluble dans l'eau	Acide fort dilué : 0,43 M HNO_3 Acide faible : 0,43 M acide acétique
Agent complexant	Potentiellement soluble dans l'eau	EDTA, DTPA

L'utilisation d'EDTA a été choisie selon la norme destinée à estimer la quantité des ETM biodisponibles dans le sol. Cependant, les quantités extraites se révèlent souvent élevées et peu corrélées aux teneurs réellement biodisponibles.

4.4.2.2 Extractions séquentielles

Bien que la méthode d'extraction chimique simple soit une méthode plus rapide et moins coûteuse que l'extraction séquentielle, elle ne renseigne pas sur les associations entre les métaux et les différentes fractions du sol. Les extractions séquentielles permettent par contre de mettre en évidence la distribution des ETM dans les différentes fractions du sol. La spéciation des ETM est généralement déterminée par cette méthode.

Les extractions séquentielles sont basées sur l'utilisation des réactifs chimiques de force croissante. Tessier et al. (1979) étaient parmi les premiers à utiliser un schéma d'extraction séquentielle. Leur schéma comprend cinq étapes ciblant cinq fractions : la fraction **échangeable** ; la fraction **liée aux carbonates** ; la fraction **liée aux oxydes** ; la fraction **liée à la matière organique** et la fraction **résiduelle**. De nombreux protocoles d'extractions ont été employés par la suite en modifiant le nombre d'étapes ou les réactifs utilisés (Shuman, 1985 ; Clevenger, 1990, Ure et al., 1995). Dans le but de normaliser les différents protocoles d'extractions séquentielles, le Bureau Communautaire de Référence européen (BCR) (Quevauviller, 1997, Wang et al., 2003) a proposé un protocole unique en quatre étapes : permettant de séparer la fraction **hydrosoluble** qui correspond à la fraction échangeable et liée aux carbonates, la fraction **réductible** (liée aux oxydes), la fraction **oxydable** (liée à la matière organique) et la fraction **résiduelle** (Figure 1.12). Contrairement aux ETM habituels où les schémas d'extraction séquentielle les plus utilisés sont ceux du BCR, cette méthode se révèle être peu efficace pour les TR. Mittermuler et al (2016) ont développé une nouvelle méthode d'extraction séquentielle plus particulièrement adapté aux TR. Elle comprend 3 étapes pour déterminer les concentrations en TR liées aux fractions **échangeables** et facilement solubles, celles **liées aux carbonates** et mobilisées par complexation, celles **réductibles** liées aux oxydes de fer et de manganèse et enfin celles **solubles dans l'acide** (Figure 1.13).

La méthode BCR, comme toutes les autres méthodes d'extractions séquentielles, ne permet pas la séparation des phosphates des TR solubles qui sont très abondants dans les résidus miniers. Ceux-ci sont inclus dans la fraction résiduelle après digestion à l'eau régale. Le protocole nouvellement développé est plus efficace pour distinguer ces phosphates solubles dans la fraction soluble à l'acide. Comparé à la méthode BCR largement utilisée, le

nouveau schéma de fractionnement fournit des informations plus détaillées sur la manière dont les terres rares sont liées dans un matériau particulaire (sol ou déchet).

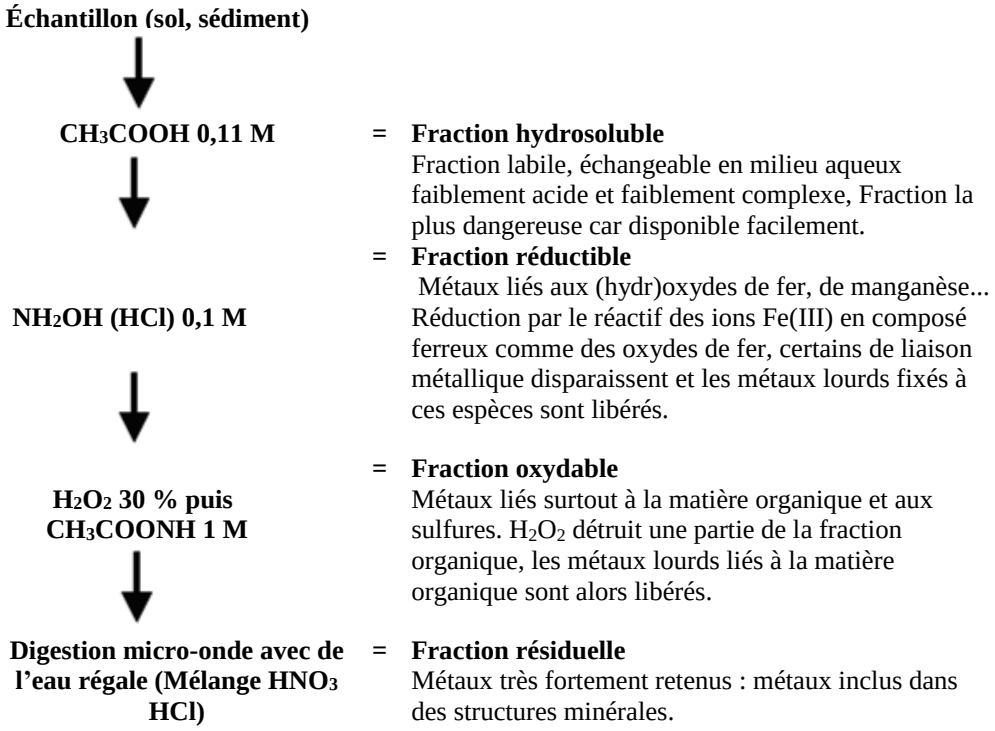


Figure 1.12. Méthode d'extraction séquentielle du Bureau Communautaire de Référence (BCR) (Quevauviller, 1997).

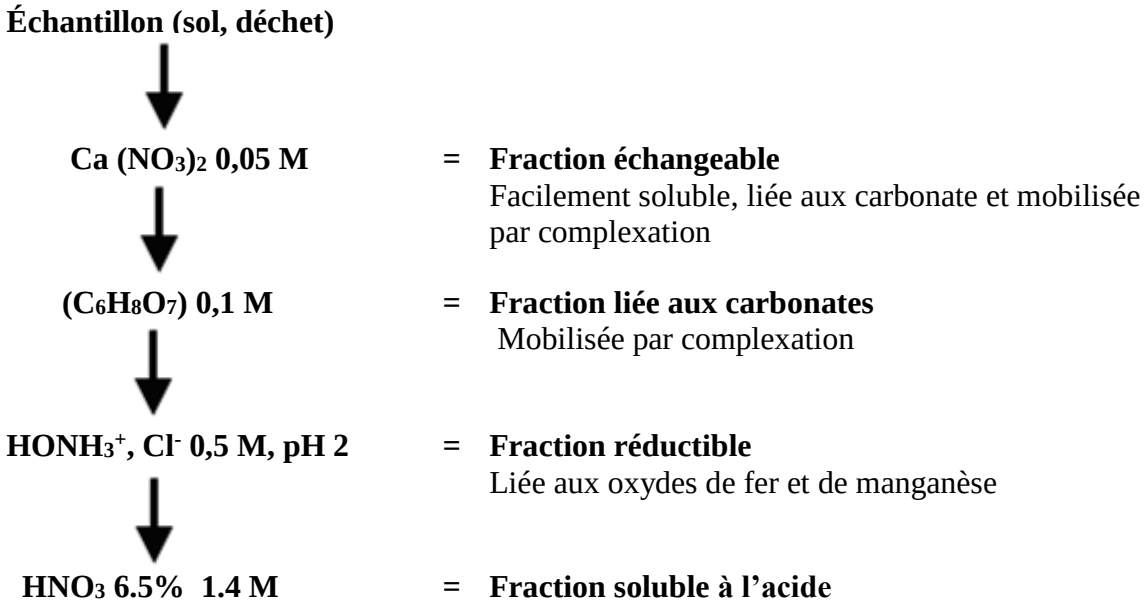


Figure 1.13. Méthode d'extraction séquentielle adaptée aux terres rares (Mittermuler et al., 2016).

Les méthodes d'extractions séquentielles sont largement utilisées, ils sont toutefois pour inconvénient l'absence de procédure de référence et de contrôle de la qualité, la non sélectivité des solutions d'extraction vis-à-vis des différentes formes des éléments traces et la sous-estimation des fractions. En effet, l'attaque chimique d'une phase n'entraine pas toujours la mise en solution totale des éléments contenus dans cette fraction et peut avoir des conséquences sur la solubilisation des éléments présents dans d'autres fractions de l'échantillon (Hass et Fine 2010). En plus, un risque de redistribution des ETM existe et ce cours des différentes étapes d'extraction (Cornu et Clozel, 2000 ; Wang et al., 2003). Malgré ces inconvénients, l'extraction séquentielle reste à ce jour la seule méthode chimique relativement simple d'évaluation des différentes formes d'un élément trace dans le sol.

4.4.3 Méthodes biologiques

Bien que les méthodes chimiques et physiques puissent donner une bonne estimation de la fraction biodisponible, elles ne renseignent pas sur la biodisponibilité réelle pour les organismes.Dans une parcelle donnée, la biodisponibilité d'un élément peut être évaluée par la mesure de sa concentration dans les plantes (Baize, 1997) qui représentent effectivement le réactif d'extraction traduisant le mieux la biodisponibilité réelle, car elle intègre tous les facteurs liés aux sols et à l'élément (Juste, 1988).Les méthodes biologiques comprennent alors l'analyse directe des teneurs en ETM retrouvées dans les organismes, la mesure de l'impact de la contamination des sols sur des indicateurs biologiques des sols, comme l'abondance et la biodiversité des espèces. Cependant, ces méthodes sont moins efficaces dans le cas d'un sol pluri-contaminé (Citeau et al, 2008).

5 Technique de dépollution des déchets industriels

5.1 Méthodes physico-chimiques

Jusqu'à présent, la majorité des sites contaminés par les ETM sont traités par plusieurs approches physico-chimiques telles que la stabilisation et le confinement *in situ* ou l'excavation et le stockage, ou encore le lessivage du sol. Contrairement aux méthodes biologiques, ces différentes méthodes altèrent significativement la qualité agronomique des sols (Lear et al., 2007) (Tableau 1.11). Bien que les coûts de dépollution varient selon les traitements réalisés (*in situ*, excavation et transport…), les méthodes physico-chimiques restent onéreuses.

Tableau 1.11. Méthodes de dépollution des sols contaminés par les éléments traces métalliques et ordres de grandeur des coûts associés (Laperche et al., 2004).

	Description	Coût
Physiques	**-Excavation** + **Traitement** (le traitement dépend de l'élément)	70-220 €/t
	-Excavation + **Enfouissement**	Non déterminé
	-Méthodes de « Lavage physique» : consiste à éliminer la phase de taille (granulométrie) et/ou de densité dans laquelle sont concentrés les ETM (phase de concentration, en général la fraction la plus fine), par diverses techniques (tamisage, filtration...) + traitement éventuel.	70-220 €/t
	- « Mise en tombeau » ou confinement par encapsulation : enfermement du matériel pollué dans un dispositif avec parois, couverture et/ou fond étanches.	30-150 €/m^2
	-Stabilisation par injection de ciment (ou matériau analogue) et d'eau pour piéger le polluant dans un milieu non lessivable et stable dans le temps.	30-200 €/t
	-Inertage par mélange à de la chaux ou à de la cendre.	30-200 €/t
Chimiques	**-Mobilisation et extraction :** injection *in situ* d'une solution de lessivage (acide pour les métaux lourds, HCl, HNO_3 ou H_2SO_4) avec pompage et recyclage de la solution, ou traitement sur site après excavation éventuellement combinée à une séparation granulométrique.	30-150 €/m^3 *in situ* (sinon 140-270 €/t)
	-Réaction de réduction visant à changer la spéciation (Cr VI→CrIII notamment, par exemple par mise en place dans une nappe phréatique d'une barrière perméable contenant de la grenaille de fer en solution acide. Le fer est oxydé en Fe^{2+} par l'acide, puis réduit les ions Cr^{6+} en Cr^{3+} et Fe^{3+}). Également utilisée pour faire précipiter les métaux et limiter ainsi leur mobilité.	20-100 €/m^3
	-Électro-réhabilitation (très employée pour les métaux lourds) : application d'un courant continu intense dans le sol provoquant la migration des cations métalliques vers une cathode insérée dans une cavité semi-perméable dans la quelle circule une solution acide permettant d'extraire les éléments.	Non déterminé
Thermiqu	**-Incinération :** utile pour les métaux volatilisables comme Cd, Pb ou Zn, récupérés avec les gaz puis recyclés.	300-1000 €/t

	-Inertage par vitrification *in situ* en appliquant un courant intense dans le sol, avec récupération et traitement des gaz d'échappement.	230-500 €/t
Biologiques	**-Biolixiviation** par des bactéries spécifiques, résistantes aux ETM et oxydant le fer et les sulfures, ce qui libère les cations métalliques. Peut être réalisée dans un contenant (bioréacteur) après excavation.	20-150 €/t
	-Phytoremédiation : bien adaptée aux métaux lourds. Épuration du milieu par des végétaux supérieurs spécifiques qui concentrent les ETM soit dans les racines (rhizofiltration), soit dans les parties aériennes (phytoextraction), ou qui les piègent dans leur réseau racinaire (phytostabilisation). Les plantes stockent soit des métaux spécifiques, soit sont « multi-ETM ». Elles sont régulièrement arrachées puis replantées.	≈ 200 €/t pour la phytoextraction *ex situ* (coût plus faible *in situ*)
	Lagunage : consiste à faire passer des effluents à travers des zones humides dont la végétation (plantes, algues, bactéries...) immobilise les ETM, notamment par précipitation sous forme sulfurée (bactéries sulfato-réductrices).	Non déterminé

5.2 Méthodes biologiques

5.2.1 Bioremédiation

La bioremédiation (appliquée aux ETM) est un processus naturel qui repose sur les microorganismes du sol capables de modifier la biodisponibilité des ETM. Ces ETM ne peuvent être biodégradés, mais leur spéciation et leur mobilité peuvent être radicalement modifiées par l'action des organismes vivants. La bioremédiation peut être améliorée par l'ajout d'amendements organiques aux sols, dans le but d'améliorer la croissance microbienne, qui peut être limitée en présence de sols pollués (sols parfois peu fertiles, en plus de la toxicité des ETM). Pour autant, il existe des microorganismes capables de survivre dans des milieux naturels contaminés par les ETM, même à forte exposition. L'une des bactéries les plus tolérantes aux ETM est *Cupriavidus metallidurans* (Diels et al., 2009). Certaines bactéries utilisent les ETM dans leur cycle et de ce fait, influencent leur spéciation dans le sol. D'après la littérature, les microorganismes ont développé plusieurs mécanismes (Figure 1.14) conduisant à l'immobilisation, la mobilisation ou la transformation des ETM par des processus actifs d'efflux (Bruins et al., 2000), à la séquestration intracellulaire (Haferburg et Kothe, 2007), à la réduction de la sensibilité des cibles cellulaires des ETM, ou encore à la production de sidérophores. Braud et al., (2010) ont montré qu'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* produisant la pyoverdine et la pyochéline apparaît plus tolérante aux ETM qu'une

souche n'en synthétisant pas. Malgré ces recherches, les interactions entre ETM et communautés microbiennes sont encore mal connues.

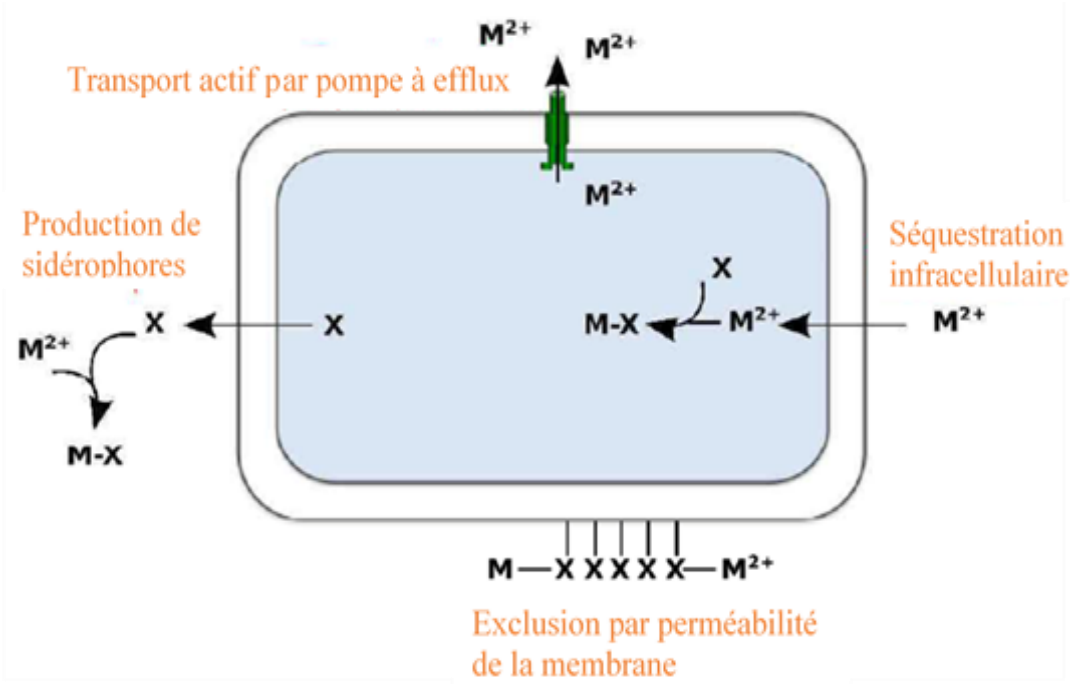


Figure 1.14. Exemples de quelques mécanismes bactériens de résistance aux métaux (Heferburg, 2007). X correspond aux constituants cellulaires interagissant avec les cations métalliques et M représente les cations métalliques.

5.2.1.1 La bioaugmentation

Elle consiste en l'ajout de microorganismes d'intérêt dans le sol, afin de stimuler la dégradation des polluants organiques et d'agir sur la spéciation des polluants inorganiques (Agnello et al., 2016). Les microorganismes employés peuvent être issus de sélections réalisées à partir d'échantillons environnementaux (sols, sédiments, boues). Ils sont ensuite cultivés en masse et inoculés dans leurs environnements d'origines ou dans un autre environnement (Lebeau, 2008). Des microorganismes génétiquement modifiés peuvent être utilisés à ce titre mais leur introduction dans l'environnement doit faire l'objet de contrôles poussés.

5.2.1.2 La biostimulation

La biostimulation consiste à stimuler l'activité de la microflore indigène, essentiellement en termes de croissance et de dégradation, par apport de nutriments (carbonés comme source d'énergie, minéraux) et/ou d'accepteurs finaux d'électrons (oxygène, nitrate, sulfate) pour remédier à la carence du sol en nutriments indispensables aux microorganismes.

5.2.2 Phytoremédiation

Selon Pilon-Smits (2005), la phytoremédiation est l'utilisation de plantes et les micro-organismes associées pour éliminer ou rendre sans danger les polluants tels que les éléments en traces (dont les ETM), les composés organiques ou radioactifs des sols. Elle englobe diverses stratégies telles que la phytoextraction, la phytostabilisation et la phytodégradation (Figure 1.15). La phytoextraction et la phytostabilisation sont les approches les plus adaptées dans le cas de sols pollués par les ETM (Bharti et al. 2014 ; Sikdar et Kundu, 2018). Les espèces végétales utilisées en phytoextraction doivent présenter idéalement des caractéristiques spécifiques telles que 1) une croissance facile et rapide dans les sols contaminés tout en accumulant l'ETM cible, 2) une tolérance aux concentrations élevées en ETM au niveau de leurs racines, 3) une production importante de biomasse facilement récoltable, 4) une tolérance aux concentrations en métaux accumulés d'une façon préférentielle dans les parties aériennes et donc avoir un facteur de translocation (FT) – concentration en ETM dans les parties ariennes rapportée à celle des racines – le plus élevé possible, et 5) un système racinaire ramifié hautement étendu (Barcélo et Poschenrieder, 2003 ; Eapen et D'Souza, 2005). Idéalement, ces espèces doivent présenter un facteur de bioconcentration (BCF) élevé, défini comme étant le rapport entre la concentration en ETM dans la plante et celui du sol (Ghosh et Singh, 2004).

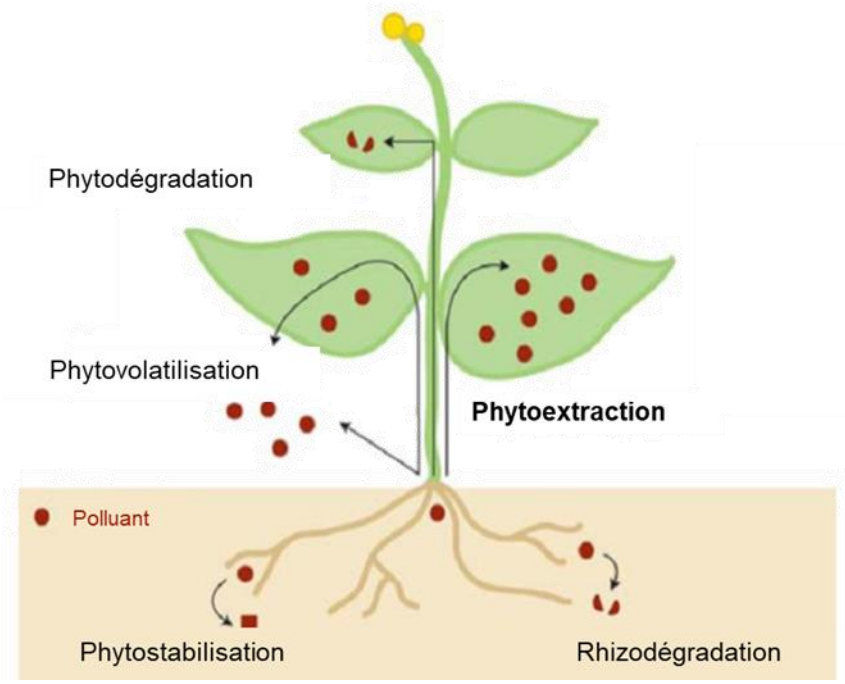


Figure 1.15. Les différentes stratégies de phytoremédiation (Pilon-Smits, 2005).

5.2.2.1 La phytostabilisation

L'érosion et la filtration peuvent mobiliser les contaminants du sol, ce qui entraîne une dispersion de la pollution par les ETM. Dans le cas de la phytostabilisation, les racines des plantes accumulent des ETM et les exsudats racinaires les précipitent dans le sol, favorisant ainsi leur immobilisation et la réduction de leur disponibilité dans le sol. En effet, la capacité de certaines plantes à croître sur des sites pollués permet de stabiliser les sols et favorise l'établissement d'un couvert végétal réduisant ainsi l'érosion éolienne et hydrique en atténuant la migration des contaminants toxiques dans le profil du sol. Afin d'assurer l'efficacité de la phytostabilisation, deux paramètres importants doivent être pris en considération : la biodisponibilité des ETM et le choix de l'espèce végétale utilisée. Parmi les plantes utilisables en phytostabilisation, on peut citer celles avec un faible taux de transpiration, telles que les plantes grasses, les plantes fourragères et les roseaux. Ces plantes servent à la fois phytostabiliser et à diminuer les quantités d'eau souterraines qui migrent loin des sites contaminés. Par ailleurs, la combinaison de ces plantes avec des arbres robustes, pérennes et ayant des racines denses ou profondes est susceptible d'améliorer d'avantage l'efficacité de la phytostabilisation (Pulford et Watson, 2003).

5.2.2.2 La rhizofiltration

La rhizofiltration consiste à détoxifier les surfaces ennoyées contaminées et les déchets liquides grâce à l'absorption des ETM par les racines des plantes. Ces plantes doivent être non seulement résistantes aux métaux, mais posséder aussi une surface d'adsorption importante et une capacité à tolérer l'hypoxie (Barceló et Poschenrieder, 2003).

5.2.2.3 La phytovolatilisation

Les plantes peuvent aussi extraire les substances toxiques des sols par phytovolatilisation. Dans ce processus, les contaminants solubles sont absorbés avec l'eau du flux d'évapotranspiration, transportés vers les feuilles, et volatilisés dans l'atmosphère *via* les stomates (Buchanan et al., 2002).

5.2.2.4 La phytodégradation

Dans le cas de la phytodégradation, les polluants organiques sont convertis par des enzymes intracellulaires ou transformés en des composés plus simples à toxicité réduite.

5.2.2.5 La phytoextraction

La technique de phytoextraction est basée sur la capacité de certains végétaux à accumuler de fortes quantités de polluants inorganiques dans leurs parties aériennes. Elle est la seule technique d'extraction *in situ* des polluants inorganiques. Les ETM sont absorbés par

les racines et transférés (phénomène de translocation) et concentrés vers les parties aériennes des plantes (Rafati et al. 2011).

A la fin du cycle, une fois les polluants accumulés par la plante, les parties aériennes sont récoltées. La biomasse produite contaminée doit être traitée comme un déchet dangereux. Le stockage dans un centre d'enfouissement technique (CET), l'incinération, le compactage et le compostage sont les options disponibles pour le recyclage de la biomasse récoltée (Tableau 1.12). Des études ont montré que le compostage pouvait réduire significativement le volume de biomasse récoltée. Toutefois, des composés organiques solubles peuvent être formés augmentant la solubilité des ETM.

Tableau 1.12. Options de traitement des déchets issus de la phytoextraction (Sas-Nowosielka et al., 2004)

	Technique	Couts du procédé (€/t)	Avantages	Inconvénients
Pré-traitement des déchets	Compostage	10 – 25	Réduction du volume et du contenu en eau	Durée du traitement (2 à 3 mois) Nécessité d'un équipement spécial Produit final encore dangereux
	Compaction	non disponible	Réduction du volume Récupération des lixiviats contenant les métaux	Nécessité d'un équipement spécial Produit final encore dangereux (biomasse et lixiviats)
	Pyrolyse	20 – 30	Diminution significative du volume Utilisation du produit final (pyrogaz)	Produit final encore dangereux
Traitement des déchets	Incinération (fonderie)	180 – 220	Possibilité de récupérer les métaux Diminution significative de la biomasse	Aucun
	Stockage	135 – 1 136	Temps relativement court	Coûteux Limitation par l'espace Incinération nécessaire Réduction lente de la biomasse contaminée
	Incinération	non disponible	Possibilité de récupérer les métaux Diminution significative de la biomasse	Pas de technologie applicable

La phytoextraction s'avère une option prometteuse puisque la biomasse peut être valorisée et les métaux lours concentrés revendus, tels que le nickel ou l'or ; c'est l'exemple de la **phytomine** ou **phytomining**, (Brooks et al., 1998 ; Barbaroux et al. 2012 ; Van der et al., 2015) (Figure 1.16). A défaut de cette valorisation, la matière végétale contenant les polluants pourrait être incinérée et les cendres stockées en conditions contrôlées.

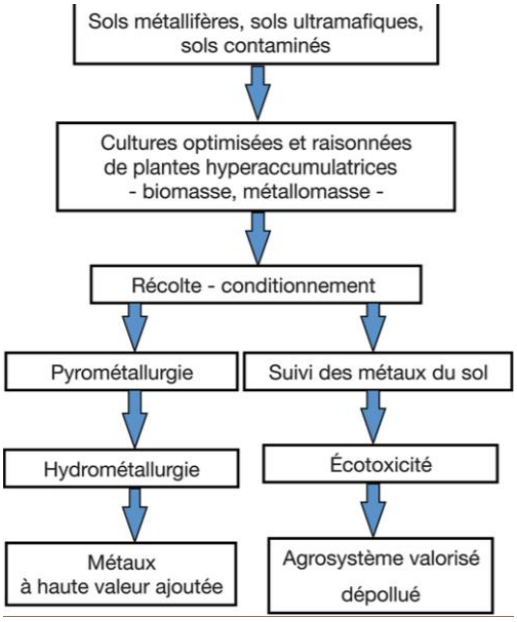


Figure 1.16. Principe de la phytomine.

Les plantes utilisées en phytoextraction doivent idéalement combiner un forte capacité d'accumulation des métaux lourds et une forte production de biomasse (Barceló et Poschenrieder, 2003) et doivent présenter un BCF élevé (Ghosh et Singh, 2004). Deux catégories de plantes sont employées en phytoextraction. La première, est représentée par les plantes hyperaccumulatrices (par exemple *Noccaea caerulescens*), qui sont généralement de petites tailles, avec une concentration foliaire élevée en métal, mais avec une croissance lente qui ne fournit pas une forte biomasse annuelle. La deuxième catégorie inclut les plantes à biomasse élevée, telle que *Brassica juncea* qui ont une production importante de biomasse mais avec des concentrations de métaux plus modestes. Globalement, les inconvénients majeurs de l'utilisation de ces plantes en phytoextraction sont une faible production de biomasse et une croissance trop lente (McGrath et al., 2002).

5.2.2.6 Les avantages et les limites de la phytoextraction

La technique de phytoremédiation présente de nombreux avantages comparés aux autres techniques de dépollution des sols (Tableau 1.13). En plus d'être peu coûteuse, elle permet de garder le sol en place contrairement aux autres techniques qui nécessitent de

l'excaver pour le traiter et permet aussi de préserver les propriétés agronomiques des sols. Enfin, elle représente la seule technique disponible permettant une dépollution *in situ* des sols contaminés en ETM. Une étude a estimé à plus de 400 000 $ le coût pour une dépollution sur 50 cm de profondeur d'un demi-hectare par excavation et stockage, tandis que 60 000 à 100 000 $ seraient suffisants pour la phytoextraction, soit environ le un quart du coût.

Tableau 1.13. Avantages et limites de la phytoextraction (Braud, 2007).

Avantages
- Applicable à une grande diversité de polluants inorganiques - La seule technique biologique d'extraction des métaux - Application *in situ/ex situ* - Diminution des perturbations pour le sol par rapport aux techniques conventionnelles - Réduction de la quantité de déchets à stocker jusqu'à 95% - Méthode peu coûteuse - Facilité de mise en œuvre - Ecologique et esthétique - Réduit l'effet négatif sur la fertilité et la biodiversité des sols
Limites
- Durée de remédiation longue - Profondeur d'application restreinte à celle des racines de la plante utilisée - Efficacité dépendante de la production de la biomasse, des conditions climatiques et des propriétés du sol - Restriction aux sites modérément contaminés (phytotoxicité) - Risque de modification de la biodiversité native - Risque de contamination du réseau trophique - Peu adaptée aux contaminations multiples

Les trois limites majeures qui freinent l'utilisation de la phytoextraction sont d'abord la durée des traitements, ensuite la disponibilité de plantes hyper accumulatrices seulement pour certains ETM, sans compter que les plantes ne sont hyperaccumulatrices que lorsqu'elles

poussent sur des sols très enrichis en ETM et enfin la gestion du déchet. Pour surmonter les limitations dues aux caractéristiques des plantes, différentes stratégies ont été suggérées pour améliorer le processus de la phytoextraction.

6 Amélioration du procédé de traitement par phytoextraction

6.1 La domestication et le croisement

Cette approche permet d'améliorer les performances d'accumulation des espèces hyper accumulatrices. Elle nécessite plusieurs étapes : la sélection des plantes hyper accumulatrices, la collection des semences de plusieurs plantes sauvages et l'évaluation de leur utilité en phytoremédiation, le croisement pour créer des cultivars, le développement de différentes techniques culturales et le choix d'un sol et d'un climat adéquats pour ces plantes. Cependant, la rareté des espèces hyper accumulatrices ne permet pas d'offrir des procédures de dépollution économiquement viables (Barceló et Poschenrieder, 2003).

6.2 Amélioration génétique classique et utilisation du génie génétique

Cette approche se base sur l'utilisation du génie génétique qui permet non seulement de transférer un gène d'intérêt d'une plante à une autre, mais aussi de transférer et de surexprimer des gènes provenant de bactéries, de levures et d'animaux chez les végétaux. Cependant, une propagation incontrôlée de telles plantes transgéniques peut engendrer des risques (Chrian et Oliveira, 2005).

6.3 Action sur la complexation des métaux

6.3.1 Phytoextraction assistée par des chélateurs chimiques de métaux

Plusieurs études ont montré l'amélioration du procédé de phytoextraction en utilisant des chélateurs synthétiques des métaux comme l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) (Chen et al., 2004 ; Bouquet et al., 2017). Bien que la phytoextraction assistée par des chélateurs chimiques comme l'EDTA permette de faciliter le transport des métaux dans les végétaux et de réduire la durée de traitement, ces composés sont difficilement dégradables (toxicité de l'EDTA par exemple), et peuvent engendrer des phénomènes de lixiviation et des effets néfastes sur les microorganismes du sol (Nowack et al., 2006) Par ailleurs, certains chélatants ne sont pas suffisamment efficaces (cas de l'acide citrique ; Bouquet et al., 2017). De nouvelles techniques biologiques sont requises pour améliorer l'efficacité de la phytoextraction, notamment celles qui associent la phytoextraction à la bioaugmentation pour mobiliser les métaux du sol et augmenter ainsi leur transfert vers les plantes (Glick, 2003, Lebeau et al., 2008, Sessitch et al., 2013).

6.3.2 Phytoextraction couplée à la bioaugmentation

La technique de dépollution des sols par couplage bioaugmentation-phytoextraction a pour but d'améliorer le rendement de la phytoextraxtion en agissant sur la spéciation des métaux. Elle est caractérisée par l'ajout de microorganismes d'intérêt dans le sol afin d'accélérer la dépollution des sols par les plantes en augmentant la biomasse végétale et/ou en augmentant la mobilité des métaux du sol. Les microorganismes employés peuvent être issus de sélections réalisées à partir d'échantillons environnementaux (Bois et al., 2011 ; Abhilash et al., 2012 ; Braud et al.,2015). Ils sont ensuite cultivés et inoculés dans leur environnement d'origine ou dans un autre environnement. Les résultats obtenus sont plus ou moins intéressants selon le métal, la plante et le microorganisme étudié. Lebeau et al. (2008) ont montré dans leur revue que la quantité de métaux extraits par la plante augmentait d'un facteur 2 à 5 en présence des bactéries. (Figure 1.17).

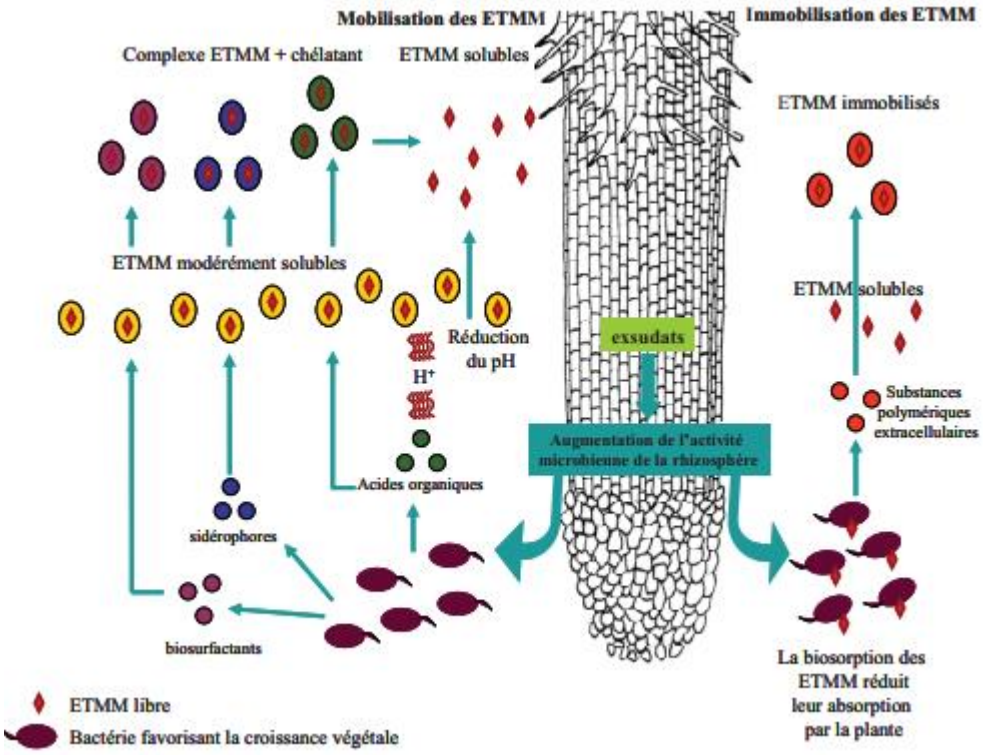


Figure 1.17. Schéma récapitulatif des actions des bactéries favorisant la croissance des plantes, sur la mobilité des éléments traces métalliques (ETM) dans la rhizosphère (Rajkumar et al., 2012).

Les microorganismes les plus intéressants utilisés dans la littérature sont les bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPB) également appelées rhizobactéries (Ma et al,

2011 ; Sessitch et al., 2013 ; Adediran et al., 2015). Ces bactéries jouent un rôle important dans la stimulation de la croissance des plantes et de leur tolérance aux stress abiotiques (Dimkpa et al., 2009, Ma et al., 2011 ; Ahemad et al., 2014).

Les souches bactériennes, préférentiellement natives, et donc métal-tolérantes, peuvent augmenter la tolérance des plantes aux stress abiotiques, améliorer la nutrition malgré la présence des ETM, et de ce fait favoriser la croissance racinaire des plantes (De-Bashan et al., 2012).

Les PGPB peuvent augmenter la quantité des métaux extraits en stimulant la croissance et le développement de la plante par :

1) **La solubilisation du phosphate** :

Le phosphore est un élément majeur, essentiel pour la croissance et le développement de la plante. De plus, les teneurs élevées en ETM dans les sols peuvent interférer avec son prélèvement, provoquant alors des retards dans la croissance (Zaidi et al., 2006). En présence de PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), le phosphore insoluble peut être rendu biodisponible à travers des réactions d'acidification, de chélation ou la libération d'acides organiques (Chung et al., 2005) ou encore en le minéralisant par l'action de phosphatases (Gyaneshwar et al., 2002). Une augmentation de la disponibilité du phosphore pour la plante se traduisant par une augmentation de la biomasse grâce à l'inoculation de bactéries a été décrit.

2) **Production de phytohormones telles que l'acide indole acétique (AIA)** :

Les PGPR produisent des composées agissantes en tant que phytohormones tel que l'acide indole acétique (AIA) par des bactéries associées aux plantes. L'AIA est une auxine permettant l'élongation des racines des plantes. Cette hormone peut être produite par les bactéries de la rhizosphère à partir du tryptophane *via* la voie de biosynthèse de l'acide indole pyruvate (Patten and Glick, 2002). Certaines bactéries de la rhizosphère synthétisent d'autres molécules agissant comme des hormones telles que les cytokinines et les gibbérellines qui peuvent stimuler la germination et la croissance des plantes tout en protégeant la plante des stress à la fois biotique et abiotique (Taghavi et al., 2009).

3) **Dégradation de 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase**

L'éthylène est une phytohormone qui joue un rôle important dans la modulation de la croissance et du métabolisme cellulaire chez les végétaux (Ping et Boland, 2004). Chez de nombreuses plantes, un pic d'éthylène est nécessaire pour lever la dormance des graines, mais après germination, un taux élevé en éthylène peut inhiber l'élongation des racines. De nombreuses PGPR contiennent dans le cytoplasme de leurs cellules l'enzyme 1-

aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase, qui peut cliver l'ACC produit par les plantes, précurseur de l'éthylène et, ce faisant, permet de réduire la teneur en éthylène chez les plantes en développement ou soumises à un stress. En moyenne le taux d'ACC et d'éthylène est divisé par un facteur 2 à 4 grâce aux PGPR (Glick, 2005).

4) **Production de sidérophores**

Les sidérophores sont de petites molécules de poids moléculaires compris entre 150 et 2000 Da, ayant une très forte affinité pour le fer qu'elles complexent. Elles sont produites par divers microorganismes lors de carence en fer qui est un élément indispensable à tout organisme mais peu biodisponible dans le sol. Les microorganismes secrètent alors les sidérophores dans le but de solubiliser et d'acquérir le fer. Ces métabolites modifient la spéciation des métaux du sol, réduisent la toxicité des métaux dans la bactérie et facilitent en parallèle l'incorporation du fer par la plante. Les racines peuvent alors incorporer le fer des complexes sidérophores bactériens-fer par des mécanismes de dégradation du chélateur s'accompagnant de la libération du fer ou d'incorporation directe de ces complexes (Rajkumar et al., 2010 ; Khan et al.,2017). Plusieurs exemples d'augmentation du prélèvement en fer par la plante avec une stimulation simultanée de la croissance ont été montrés comme l'action directe de l'inoculation par des bactéries PGPR (Barzantiet al., 2007 ; Sheng et al., 2008) ont montré que l'ajout de bactéries endophytes, *Pseudomonas fluorescens* G10 et *Microbacterium* sp. G16 productrices des sidérophores, d'AIA et d'ACC désaminase permettait l'augmentation de la biomasse et du prélèvement du plomb par *Brassica napus*. De même, l'addition de bactéries PGPR productrices de sidérophores, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Pseudomonas fluorescens*, augmentait l'extraction de chrome par du maïs (Braud et al., 2009). Pour que l'extraction des métaux par les plantes soit améliorée significativement, le choix de l'association plante – microorganisme doit être pertinent (survie de l'inoculum, plante adaptée et capable d'extraire le métal considéré) (Lebeau et al., 2008).

Matériel & Méthodes

MATERIEL ET METHODES

1 Présentation générale des sites d'étude

La zone d'étude se situe dans la partie méridionale de la Tunisie, au alentour des sites de rejets des PG par les usines de transformation de phosphate du Groupe Chimique Tunisien (GCT), dans la zone industrielle de Sfax–Sud, M'dhilla (Gafsa) et Gabès. Les PG générés par le GCT à Sfax et Mdhilla (Gafsa) sont stockés à l'air libre dans des terrils (Tabias), situés juste à côté des usines de transformation de phosphate, tandis qu'à Gabès les PG sont déversés dans la mer au sud du port de commerce de Ghannouch.

1.1 Le site de l'usine de Sfax

Le terril de PG le plus ancien de Sfax est celui de la SIAPE, daté de 1952. Les PG sont apportés humides par des pipelines. Le terril est situé dans la zone industrielle à proximité de la zone urbaine sud de Sfax et à peu près à un kilomètre de la zone côtière (figure 2.1). Le terril est établi sur un sol naturel sans aucun soubassement étanche pour la protection des eaux souterraines. La base du terril occupe une superficie de 48 ha pour une hauteur de 50 m environ. La quantité de PG sec accumulé jusqu'à aujourd'hui peut être estimée aux alentours de 30 millions de tonnes.



Figure 2.1. Configuration plane du terril de phosphogypse de l'usine de Sfax et localisation des points d'échantillonnages de sols (SS1-SS6 ; SSP1-SSP4) et de plantes (PS1-PS4) (source Google Earth, 2017).

1.2 Le site de l'usine de M'dhilla

Le site de l'usine de M'dhilla à Gafsa se situe à 10 km au sud de la cuvette de Gafsa (figure 2.2). Le terril de M'dhilla occupe une superficie de 36 ha pour une hauteur de 45 m. Comme pour Sfax, aucun soubassement étanche n'a été mis en place. Les possibilités de contamination des eaux souterraines sont minimes puisque la nappe souterraine est située à une très grande profondeur. Par contre, la contamination des eaux de surface est avérée en raison de l'infiltration à travers le terril et le ruissellement des eaux pluviales principalement vers le cours d'eau adjacent (Oued El Maleh). Le terril est là aussi alimenté par des PG humides acheminés par pipeline. Le terril de M'dhilla contient plus de 20 millions de tonnes de PG sec accumulées sur une période de 25 ans.

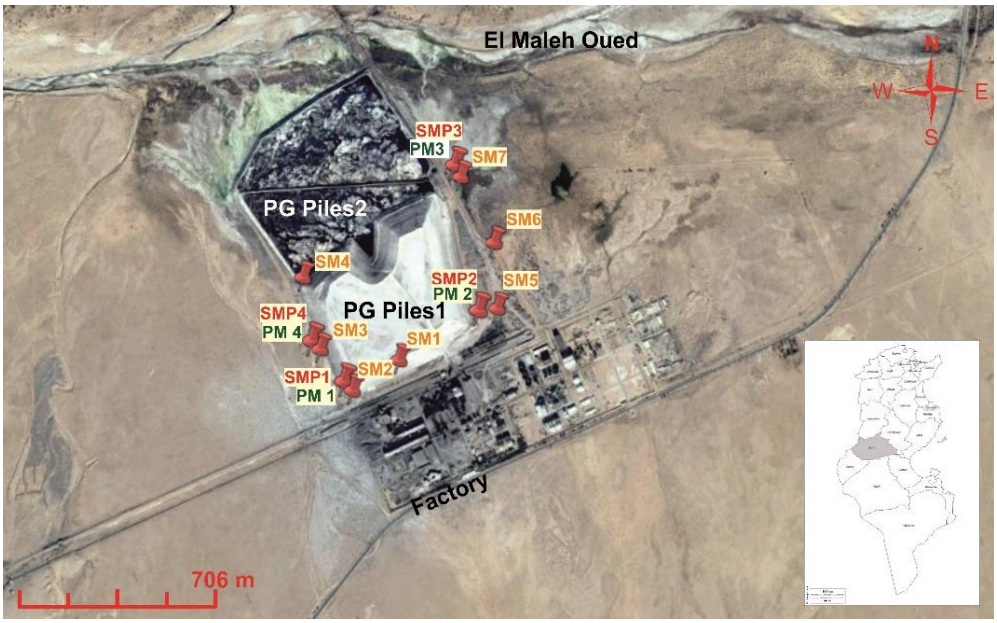


Figure 2.2. Configuration plane du terril des phosphogypses de l'usine de M'dhilla et localisation des points d'échantillonnages de sols (SM1-SM7 ; SMP1-SMP4) et de plantes (PG1-PG4) (source Google Earth, 2017).

1.3 Le site de l'usine de Gabès

Le troisième lieu de rejet de PG est celui de l'usine de transformation des phosphates à Ghannouche, située à 3 km au nord de Gabès (figure 2.3). Cette usine déverse la totalité des PG dans le golfe de Gabès par l'intermédiaire d'un canal à ciel ouvert. Les PG humides déchargés des filtres sont mélangés avec de l'eau de mer pour former de la boue gypseuse qui est rejetée par la suite à la mer. Cette boue gypseuse est composée de 30% de PG et de 70% d'eau de mer. Actuellement, près de 55% des PG produits par le GCT sont rejetés dans le

Golfe de Gabès, qui reçoit en moyenne quotidiennement 42.000 m^3 de boues gypseuses (équivalant à 12.500 tonnes de PG sec). L'estimation des rejets en 30 ans sur les côtes du Golfe de Gabès est de 135 millions de tonnes de PG secs.

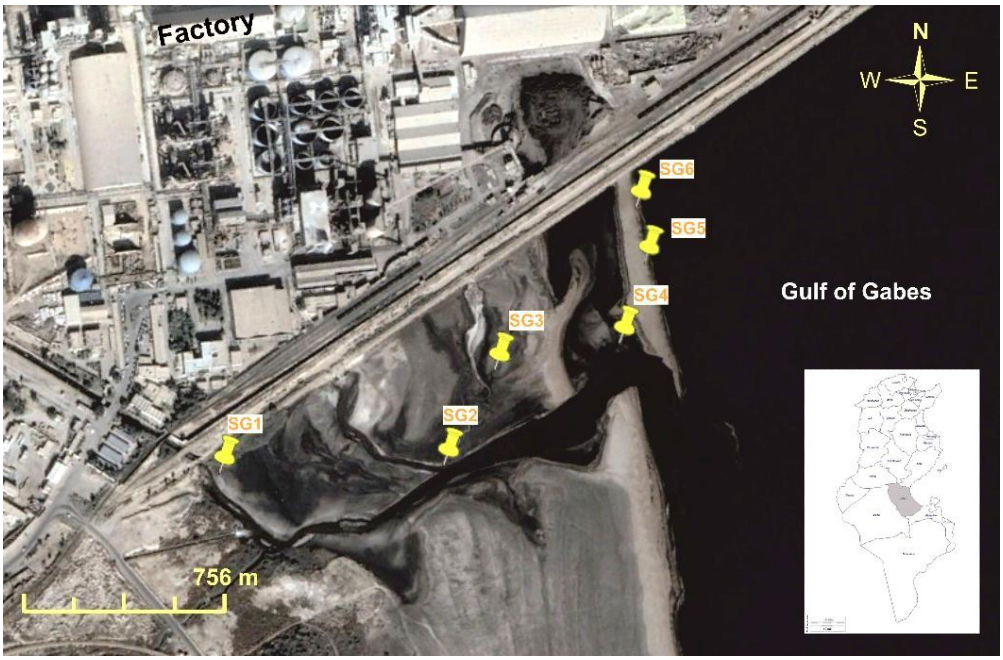


Figure 2.3. Configuration plane du port de Gannouche, lieu de déversement des phosphogpyses à Gabès et localisation des points d'échantillonnages de sédiments marins (SG1-SG6) (source Google Earth, 2017).

2 Echantillonnages

2.1 Sol et sédiment

Deux campagnes de prélèvements de sols ont été réalisées.

-Une première compagne d'échantillonnage a été effectué en 2014 à différentes distances des sites d'évacuation des PG dans les régions de Sfax, Md'hilla (Gafsa) et Ghannouch (Gabès) : Six à sept échantillons de sols ont été choisis dans chaque site d'étude aux alentours des terrils de PG à Sfax (SS1-SS6), Md'hilla (SM1-SM7) et six échantillons de sédiment marin à Gabès (SG1-SG6) collectés sur la plage au sud du port de commerce de Ghannouche, lieu de déversement des PG. Des prélèvements ont été réalisés sur une profondeur de 30 cm, à au moins trois endroits relativement proches les uns des autres, et mélangés pour obtenir un échantillon composite.

-Une deuxième campagne d'échantillonnage a été effectuée en 2015 afin de déterminer la répartition spatiale et verticale en ETM dans les PG et le sol sous-jacent, ainsi que l'enracinement des plantes spontanées dans la zone d'étude. Huit profils de sol ont été

réalisés aux alentours des terrils de PG de la zone industrielle de Sfax (SSP1-SSP4) (figure1) et Md'hilla (SMP1-SMP4) (figure 2). Deux échantillons de PG, différents par leur âge de stockage, ont été également pélevés : PGb, le plus âgé (environ 30 ans) prélevés au pied du terril PGt est un PG de fraîche production prélevés au sommeil du terril.

Un échantillon de PG a été également prélevé au pied du terril du PG à Gafsa (PGp). Trois échantillons de sols ou de sédiment de référence de Md'hilla, Sfax et Gabès ont également été collectés à environ 12 km de chaque site dans une région non urbaine (non affectée par les PG et toute autre source d'ETM).

Les échantillons ont été séchés à l'air libre, homogénéisés et tamisé à 2 mm, puis ils ont été stockés dans des sachets en plastiques pour les analyses physico-chimiques. Les échantillons qui feront l'objet d'analyses microbiologiques ont été conservés directement dans des sacs en plastiques stériles dans une glaciaire et ont été stockés dès le retour au laboratoire au congélateur à -20 °C.

2.2 La végétation

Afin d'étudier le type de végétation qui pousse au voisinage des terrils de PG des sites de Sfax et de M'dhilla à Gafsa, des échantillonnages de plantes entières (parties aérienne et racinaires) ainsi que leurs substratums (sols sous-jacents) ont été effectués pour déterminer leur facteur de bioconcentration (FBC) et leur facteur de translocation (FT). Pour cette étude, les espèces les plus abondantes qui poussent spontanément dans la zone d'étude ont été prises en considération. Il s'agit de 8 plantes spontanées, réparties sur les deux sites d'étude (figure 2.4) :

(1) pour le site de Sfax **:** *Kochia indica* (PS1), *Suaeda mollis* (PS2), *Chenopodium murale* (PS3) et *Conyza canadensis,* (PS4) ;

(2) pour le Site de Gafsa : *Arthrocnemum indicum* (PM1), *Atriplex halimus* (PM2) *Zygophyllum album* (PM3), *Bassia muricata* (PM4).

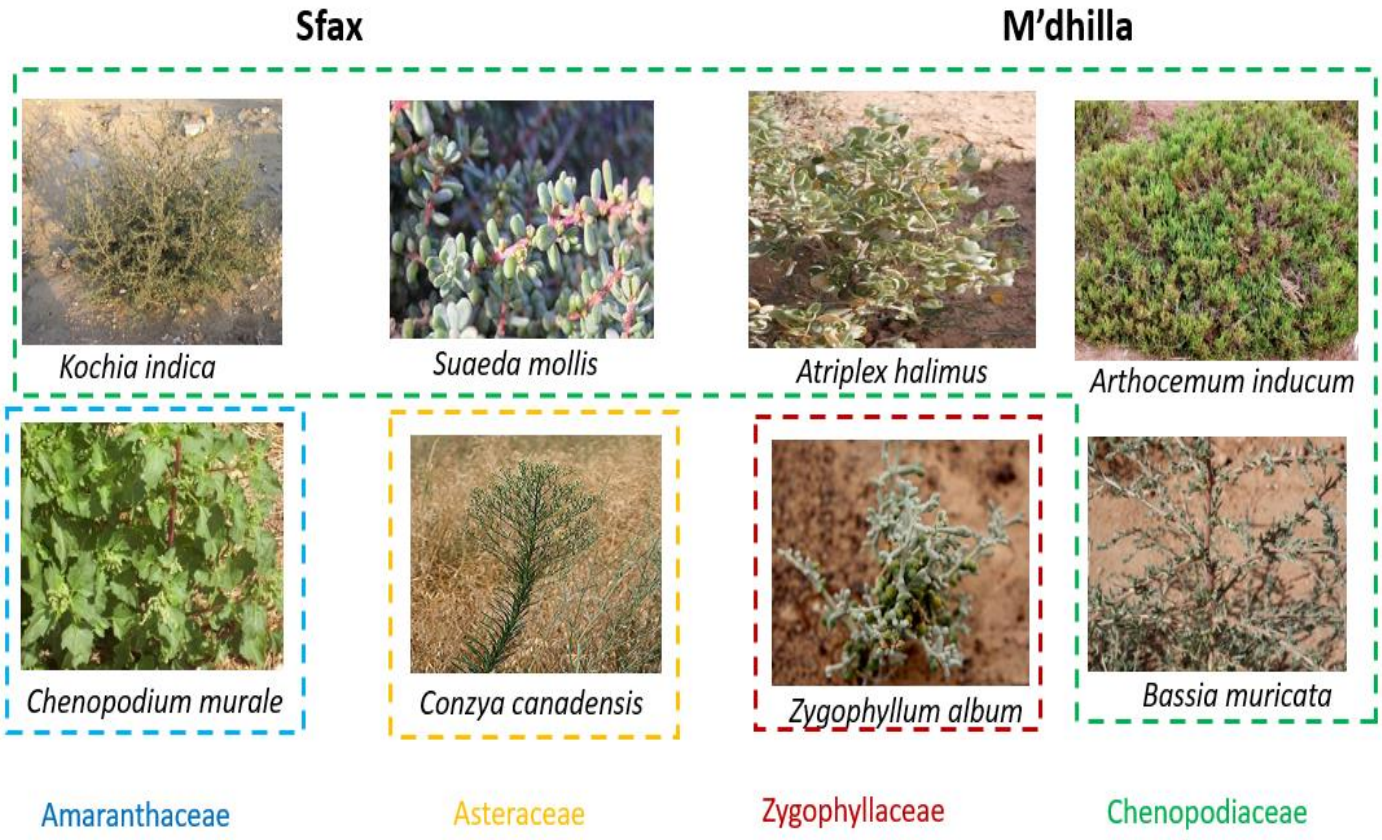


Figure 2.4. Espèces végétales collectées à proximité des terrils de Sfax et de M'Dhilla.

Les références des échantillons des profils de sols, des sédiments et des végétaux sont mentionnées dans les cartes des figures 2.1, 2.2 et 2.3.

3 Caractérisation et analyses des échantillons

3.1 Caractérisation physico-chimique des échantillons de sols et de sédiments communs à l'ensemble des expériences

Une caractérisation physico-chimique des échantillons de sols et de sédiment est réalisée (Figure 2.4). Toutes les analyses pour un prélèvement sont réalisées en triplicats.

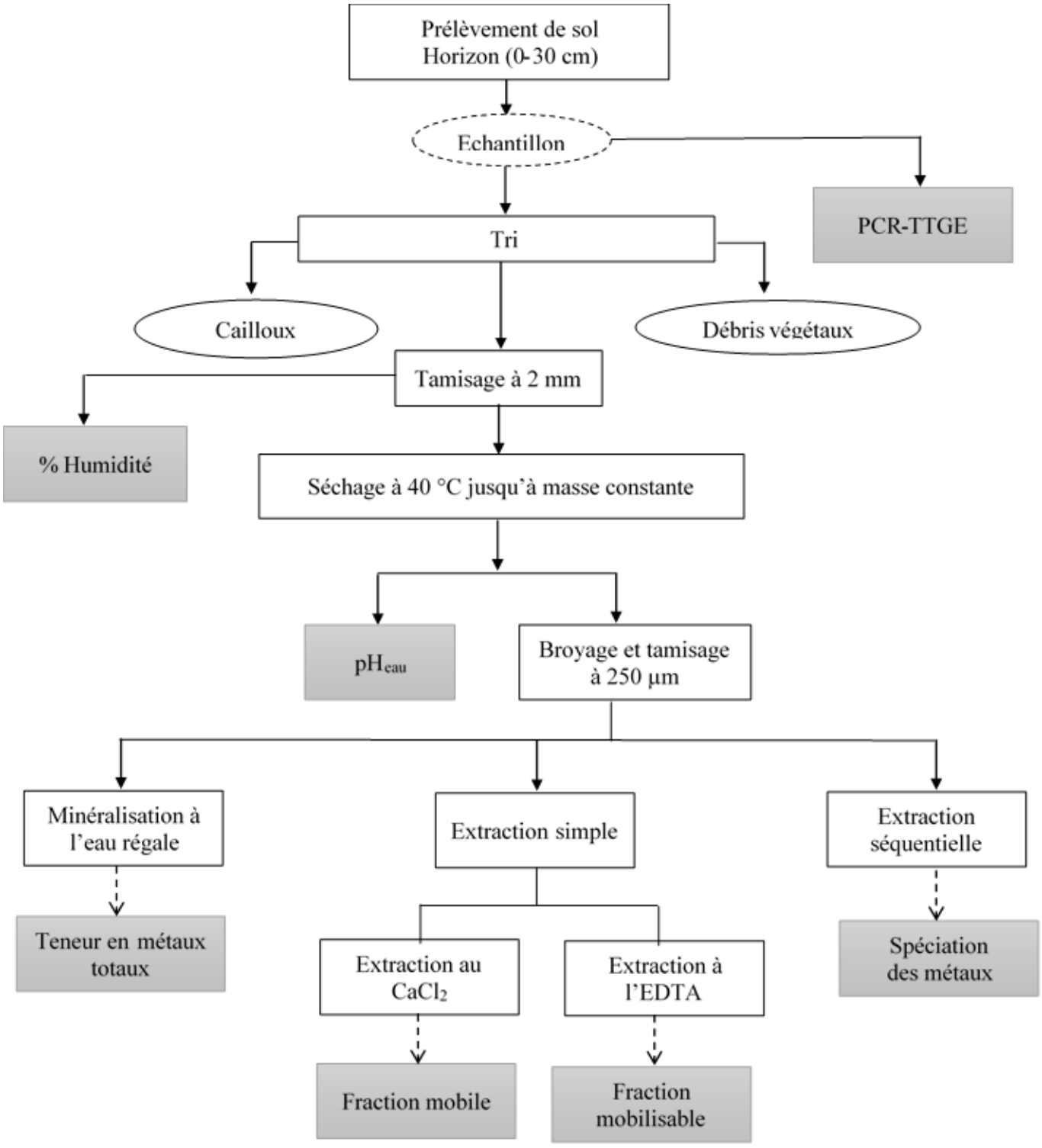


Figure 2.5. Représentation schématique du protocole de traitement et d'analyses des échantillons de sols et de sédiments. PCR-TTGE : Electrophorèse temporelle sur gel à gradient thermique.

3.1.1 Détermination de l'humidité relative (HR)

La masse sèche du sol est déterminée selon la norme NF ISO 11465 (AFNOR 1994a). Une coupelle en aluminium est séchée à 105°C pendant au moins 45 min, placée ensuite dans un dessiccateur jusqu'à refroidissement puis pesée (m1). Une prise d'essai de 10 à 15 g du sol/sédiment/mélange PG-Terreau humide est placée dans la coupelle et pesée (m2). Après séchage à 105°C pendant au moins 24 h, la coupelle est déposée dans un dessiccateur jusqu'à refroidissement puis est à nouveau pesée (m3). Cette analyse est effectuée en triplicat pour chaque échantillon de substrat.

Le pourcentage d'humidité résiduelle (%HR) est calculé avec la formule suivante :

$$\text{HR}\ (\%) = \frac{(\text{m2} - \text{m1}) - (\text{m3} - \text{m1})}{(\text{m2} - \text{m1})} \times 100$$

(avec m1, m2, m3 en g).

3.1.2 Détermination du potentiel d'hydrogène (pH_{eau})

Le pH_{eau} est déterminé selon la norme NF ISO 10390 (AFNOR 1994b). Après séchage, 5 g de sol sont pesés dans un tube de type Falcon de 50 mL auxquels est ajouté 5 fois son volume en eau distillée. Les tubes sont agités énergiquement à 200 rpm pendant 15 min sur une table d'agitation à température ambiante. La suspension est ensuite mise à reposer au moins 2 h. Puis le mélange est agité énergiquement à la main pour le remettre en suspension avant la mesure du pH à l'aide d'un pH-mètre (Mettler Toledo FE20/EL20).

3.1.3 Détermination de la capacité de rétention (CR)

La Capacité de Rétention (CR) est déterminée selon la norme ISO DIS 11269-2 (2006). Le fond de 3 tubes en polypropylène de 125 mL (Nalgene®) est percé d'un trou de 0,5 cm de diamètre, chacun est ensuite recouvert d'une grille, pour laisser passer l'eau par capillarité, elle-même recouverte par un disque épais pour maintenir le sol dans le tube. L'ensemble est pesé (m1), puis le pot est rempli avec du sol tamisé à 2 mm, préalablement séché au moins 48h à température ambiante. L'ensemble est légèrement tassé puis pesé (m2). Le tout est placé suspendu dans un récipient contenant de l'eau distillée. Le niveau de l'eau est ajusté à 1 cm au-dessus de la base percée du tube. Au bout de 24h, la quantité d'eau retenue par le sol est mesurée : le pot est sorti du récipient et -après une période de repos de 10 min- pesé (m3). Chaque mesure est effectuée en triple pour un sol considéré.

La capacité de rétention (CR) est déterminée selon la formule suivante :

$$CR\ (\%) = \frac{(m3\ -\ m2)\ +\ [(m2\ -\ m1) \times \frac{HR}{100}]}{(m2\ -\ m1) \times \frac{(100-HR)}{100}}\ \times 100$$

(avec HR en (%) ; m1, m2, m3 en g).

3.1.4 Analyse des éléments trace métalliques dans les sols / sédiment

3.1.4.1 Eléments trace métalliques totaux

La teneur totale en ETM est déterminée selon la norme ISO 11464 (AFNOR 2006). Après séchage et broyage à 250 µm à l'aide d'un boyeur à battoir (A 11 basic et battoir A 11.1 de IKA, Staufen, Germany), une prise d'essai de 0.50 ± 0,01 g d'échantillon de substrat sec est introduite dans un réacteur (en PFA) de 55 mL (CEM µWave, Orsay, France) dans lequel sont ajoutés 3 mL de HCl 37 % (v/v) et 9 mL de HNO_3 65 % (v/v). La mise en solution par attaque acide est réalisée dans un four à micro-ondes CEM MARS 6 (Microwave Accelerated Reaction System de CEM µWave, Orsay, France) (Tableau 2.1 et Figure 2.5).

Tableau 2.1. Programmes de minéralisation des sols et des végétaux utilisés avec la micro-onde CEM MARS 6.

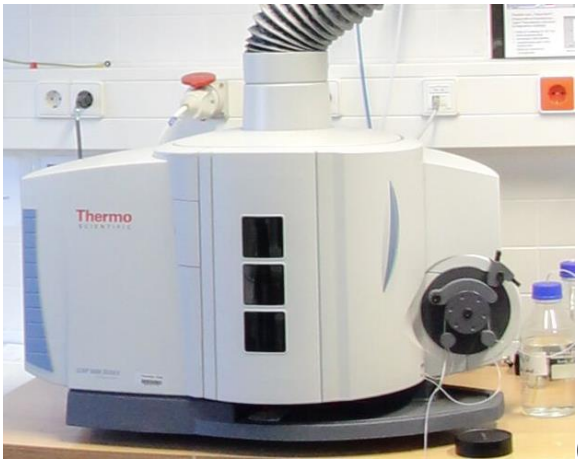
N° phase	Température (° C)	Durée de phase (min)	Puissance maximale utilisée (W)
Sols			
1	0-165	2	1200
2	165-175	3	1200
3	175	5	1200
4	Refroidissement	20	
Végétaux			
1	0 -175	15	1200
2	175	15	1200
3	Refroidissement	20	

Une fois l'échantillon refroidi, le minéralisat est repris dans une fiole jaugée avec de l'eau ultra pure (EUP) dont le volume est ajusté à 25 mL. Le liquide est ensuite filtré sur du papier filtre Whatman N° 40 ou Durieux N°111, puis récupéré et conservé dans des tubes en polypropylène (PP) résistants à l'acide (DigiTUBEs de SCP Science, Courtaboeuf, France).
Les analyses des ETM sont réalisées par ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy) avec un ICAP 6300 DUO Radial associé à un passeur automatique CETAC ASX-520 de Thermo-Fischer SCIENTIFIC (Illkirch, France) (Figure 2.5).


(a)



(b)



(c)


(d)

Figure 2.6. : Minéralisation des échantillons par voie acide : (a) Réacteur en PFA de 55 mL (b) Four à micro-ondes CEM MARS 6 de CEM µWave. Analyses élémentaires par ICP-AES : (c) ICAP 6300 DUO Radial et (d) passeur automatique CETAC ASX-520 de Thermo-Fischer SCIENTIFIC.

Six ETM sont analysés : **Cadmium** (Cd) **et Strontium** (Sr) et quatre terres rares **Cérium** (Ce), **Lanthanum** (La), **Neodymium** (Nd) et **Yttrium** (Y).

Les gammes étalons multiéléments sont préparées dans la même matrice que les échantillons. Les longueurs d'ondes (en nm) auxquelles sont analysés les éléments étudiés sont les suivantes : Cd (226,5), Ce (404,0), La (379,4), Nd (378,4), Sr (346,4) et Y (242,2).

3.1.4.2 Extraction simple des fractions phytodisponibles en éléments traces métalliques

3.1.4.2.1 *Fraction mobile*

L'extraction de la fraction dite mobile du Cd, du Sr et des terres rares (Ce, Y, La, Ne) des sols collectés est réalisée selon la norme NEN 5704 des Pays Bas, qui utilise une solution de chlorure de calcium $CaCl_2$ (0,01 M) capable d'extraire les métaux présents dans la solution du sol et les formes facilement échangeables.

Une prise d'essai de 1 g (± 0,01 g) de sol sec broyé et tamisé à 250 µm est introduite dans un tube type Falcon de 15 mL auquel est ajouté un volume de 10 mL de $CaCl_2$ (0,01 M) (ratio : 1/10 (m/v)). Les tubes sont ensuite agités pendant 24h à température ambiante. Après agitation, les tubes sont centrifugés pendant 8 min à 9000 rpm (7690 g) puis le surnageant de chaque fraction est récupéré à l'aide d'une seringue de 10 mL, filtré sur membrane acétate de cellulose à 0,22 µm de seuil de rétention, et acidifié avec une goutte (<10µL) de HNO_3 concentré (65%). Chaque extrait est conservé à 4 °C avant analyse. Tous les réactifs utilisés sont de qualité analytique et les solutions sont préparées dans de l'eau ultra pure (EUP). Des blancs constitués de la solution d'extraction sont réalisés dans les mêmes conditions, et analysés par ICP-AES pour correction des échantillons. Pour un sol considéré, les analyses sont réalisées en triplicats.

3.1.4.2.2 *Fraction mobilisable*

L'extractant utilisé est le sel dissodique de l'acide Ethylène Diamino Tétra Acétique (Na_2EDTA) associé à l'acétate d'ammonium (NH_4^+, CH_3COO^-). L'extraction se fait selon la norme NF X 31-120 (1992) qui utilise une solution à 1 M d'acétate d'ammonium (CH_3COONH_4) et 0.01 M de Na_2EDTA (pH= 7) à laquelle est ajouté 1 g du sol sec broyé et tamisé à 250 µm (ratio : 1/10 (m/v)). L'extraction est réalisée de la même façon que pour celle au $CaCl_2$. Des blancs constitués de la solution d'extraction sont également réalisés, et sont analysés par ICP-AES avec tous les extraits, effectués en triplicat pour un échantillon de substrat considéré.

3.1.4.2.3 *Extraction séquentielle des fractions des éléments traces métalliques*

L'extraction séquentielle des métaux du sol est réalisée selon la méthode de Mittermüller et al., (2016), particulièrement adaptée aux terres rares. Le protocole en 4 étapes consiste en l'utilisation successive de solutions d'extractants chimiques de plus en plus forts, pour déterminer les concentrations en ETM : associées aux **fractions échangeables et facilement solubles** (F1), liées aux **carbonates** et **mobilisées par complexation** (F2), celles **réductibles** liées aux **oxydes de fer et de manganèse** (F3) et enfin celles **solubles par un acide fort** (F4).

Une prise d'essai de 250 mg de sol sec, broyé et tamisé, est introduite dans un tube en polypropylène (PP) de 50 mL. L'extraction est réalisée en triplicats pour chaque sol.

- Etape 1 : Extraction avec 50 mL d'une solution de nitrate de calcium $Ca(NO_3)_2$ à 0,05 M ; pendant 6h sous agitation et à température ambiante. Le surnageant est récupéré après centrifugation à 7690 g pendant 10 minutes et filtré sur une membrane à 0,22 µm. Le sol est ensuite rincé avec de l'EUP puis centrifugé à nouveau. Le surnageant de rinçage est éliminé, et le culot est traité avec l'extractant suivant ;
- Etape 2 : Après une remise en suspension manuelle du culot, extraction avec 50 mL d'une solution d'acide citrique ($C_6H_8O_7$) à 0,1 M et pH 2 (ajusté avec de l'HNO_3) pendant 24h sous agitation. Le procédé est ensuite le même que celui décrit ci-dessus jusqu'au rinçage ;
- Etape 3 : Extraction avec 50 mL d'une solution de chlorhydrate d'hydroxylamine (chlorure d'hydroxylammonium, $HONH_3^+$, Cl^-) à 0,5 M et pH 2 (ajusté avec de l'acide nitrique HNO_3) pendant 24h sous agitation ;
- Etape 4 : Extraction avec 50 mL de HNO_3 6.5% (1.4 M, 24h d'agitation).

Entre chaque extraction, le surnageant de chaque fraction est récupéré, filtré sur filtre-membrane de 0,22 µm de seuil de coupure, et conservé à 4°C pour analyse en ICP-AES, tandis que le culot est rincé avec 30 mL d'EUP et reconcentré par centrifugation.

3.2 Caractérisation des échantillons végétaux

3.2.1 Préparation des échantillons végétaux

Les échantillons de végétaux sont récoltés en séparant les parties aériennes (PA) des parties racinaires (PR). Ils sont alors soumis à un lavage-séchage-broyage avant analyse. Le lavage consiste en un nettoyage répété à l'eau du réseau, puis à l'eau désionisée (ED), et enfin à l'EUP pour éliminer toutes les traces de sol ou de poussières attachées aux parties aériennes

des plantes. Les PA et PR lavées et essuyées sont ensuite déposées puis pésées dans des barquettes en papier d'aluminium préalablement tarées à vide. Le séchage est effectué dans une étuve à 40°C pendant plusieurs jours jusqu'à une masse constante. Leur masse sèche est déterminée par une nouvelle pesée. Le broyage est ensuite réalisé à l'aide d'un broyeur à lames (A 11 basic et couteau A 11.2 de IKA, Staufen, Germany). La Figure 2.7. présente le protocole de traitement et les analyses réalisées sur les échantillons végétaux récoltés après culture en hydroponie ou en pot de mélange PG-Terreau.

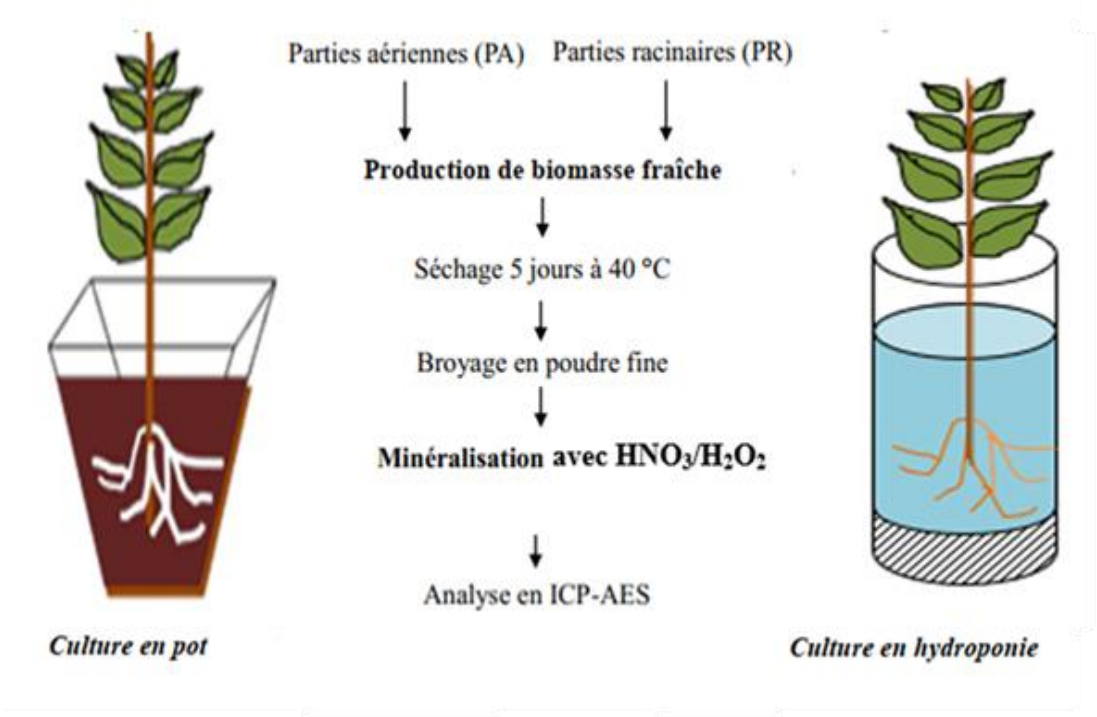


Figure 2.7. Représentation schématique du protocole de traitement et d'analyse des échantillons végétaux récoltés après culture en hydroponie ou en pot.

3.2.2 Analyse des éléments traces métalliques dans les végétaux

Après séchage et broyage, une prise d'essai de 0.50 ± 0,01 g d'échantillon végétal sec est introduite dans un réacteur en téflon PFA de 55 mL (CEM µWave, Orsay, France) dans lequel sont ajoutés 8 mL d'acide nitrique (HNO_3) à 65 % et 2 mL d'eau oxygénée (H_2O_2) à 30 %. Comme pour le sol, les échantillons végétaux sont minéralisés dans un four à micro-ondes MARS 6 (CEM µWave, Orsay, France) dont le programme est décrit dans le § 3.1.4.1. Le minéralisat refroidi est ensuite transféré dans une fiole jaugée où le volume est ajusté à 25 mL avec de l'EUP. Le liquide est filtré sur du papier filtre Whatman n° 40, puis récupéré dans des tubes en polypropylène (PP) résistant à l'acide (DigiTUBEs de SCP Science, Courtaboeuf, France). Les tubes sont stockés à 4°C avant analyse. La teneur en ETM dans les minéralisats

végétaux est ensuite analysée par ICP-AES (ICAP 6300 associé à un passeur automatique CETAC ASX-520 de Thermo-Fischer SCIENTIFIC, Illkirch, France). Des blancs de minéralisation et un échantillon végétal standard (INCT-MPH-2) sont traités et analysés comme les échantillons pour validation et si besoin correction des mesures.

3.2.3 Indices d'accumulation des éléments traces métalliques dans les végétaux

Plusieurs indices ont été définis pour étudier la capacité des plantes à absorber les ETM et à les transférer dans leurs différents organes. Parmi ces indices, on peut définir le facteur de bioconcentration calculé sur la base de l'accumulation des ETM dans la plante (FBC), le facteur de Translocation (FT) des ETM des parties racinaires vers les parties aériennes et le pourcentage de dépollution (% dépollution) par la plante par rapport aux teneurs initiales du substrat. Puisque seuls les ETM des parties récoltables (PA) peuvent être valorisés, le facteur de bioconcentration calculé sur la base de l'accumulation des ETM dans les parties aériennes (FBC PA) a été également déterminé. Ils sont calculés en utilisant les formules suivantes (Brooks, 1998) :

$$\mathrm{FBC} = \frac{\frac{[\mathrm{M}]\ \mathrm{PA} * \mathrm{m\ PA} + [\mathrm{M}]\ \mathrm{PR} * \mathrm{m\ PR}}{\mathrm{m\ PA} + \mathrm{m\ PR}}}{[\mathrm{M}]\ \text{initiale (dans le sol ou la solution de culture)}}$$

$$\mathrm{FBC\ PA} = \frac{[\mathrm{M}]\ \mathrm{PA}}{[\mathrm{M}]\ \text{initiale (dans le sol ou la solution de culture)}}$$

$$\mathrm{FT} = \frac{[\mathrm{M}]\ \mathrm{PA}}{[\mathrm{M}]\ \mathrm{PR}}$$

$$\%\ \text{de dépollution} = \frac{\text{Quantité M dans parties aériennes}}{\text{Quantité M initiale (dans le sol ou la solution de culture)}} \times 100$$

(avec M : métal ; [M] : concentration en métal (en mg/kg de Masse Sèche) ; m : masse de métal (en mg) ; PA : parties aériennes ; PR parties racinaires).

3.3 Caractérisation de la composante bactérienne des échantillons de sols

La structure de la communauté bactérienne des sols collectés est déterminée par PCR TTGE. Les échantillons analysés proviennent des 3 sites de Sfax, M'dhilla et Gabès. Pour réduire le nombre d'analyses, seulement 4 prélèvements et un témoin par site sont étudiés : Site de M'dhilla-Gafsa (M1, M6, M3, SGP3 et un témoin Tg) ; site de Sfax (S1, S3, S5, SSP1 et un témoin TS) et site de Gabès (G1, G5, G3 et un témoin Tgb). Un échantillon de PG pur est également étudié (PGp).

3.3.1 Enrichissement de la biomasse des échantillons de sol

En raison de la faible densité de micro-organismes dans les échantillons, une étape d'enrichissement a été réalisée avant extraction de l'ADN. Les cultures sont réalisées en erlen-meyers stériles de 25mL contenant 10 mL de milieu CDM (milieu chimiquement défini) stérile (Muller et al., 2003) dans lequel est ajoutée une prise d'essai de 0.5 g d'échantillon de sol, incubées à 23°C pendant 48 h, sous agitation à 130 rpm. La durée d'incubation choisie permet d'augmenter la teneur d'ADN mais est suffisamment courte pour éviter de modifier la structure de la communauté microbienne.

3.3.2 Extraction d'ADN

L'ADN total est extrait à partir de 5,2 mL de culture après centrifugation pendant 1 min à 8000 rpm avec le Kit NucleoSpin® Soil (Macherey-Nagel, GmbH & Co, Germany). La première étape du protocole d'extraction est réalisée avec le broyeur à billes MM400 (Retsch, Germany) pendant 1 min à 30 mvt/sec. L'élution finale est faite dans un volume de 50 µL.

3.3.3 Dosage ADN

La quantité d'ADN extraite est dosée par fluorimétrie en utilisant le kit Qubit® 3.0 Fluorometer (Life Technologies®) et Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Life Technologies®), puis les échantillons sont stockés à -20 °C.

3.3.4 PCR et TTGE

A partir des ADN génomiques extraits, les PCR sont réalisées avec le kit HOT FIREPol® DNA Polymerase (Solis BioDyne). La composition du mix réactionnel est la suivante pour un volume final de 100 µL : 10 µL Buffer 2 10X, 6 µL $MgCl_2$ (50 mM), 2 µL dNTPs (10 mM chaque), 2 µL Primer Forward (10 µM), 2 µL primer reverse (10 µM), 1 µL BSA (10 mg/mL), 2.5 unités de TaqDNApol, 30 ng d'ADN. Les amplifications sont réalisées sur le gène ARNr 16S bactérien. Le couple d'amorces (primers) utilisé est 1401F/968R-GC (Fleske et al., 1998). Les amplifications sont réalisées dans un thermocycleur CFX96 (Bio-Rad) selon les conditions décrites par Cebron et al., (2005). Les produits de la PCR sont dosés par fluorométrie, Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Life Technologies®) et le Qubit® 3.0 Fluorometer (Life Technologies®). Une masse de 250 ng de produit PCR est ensuite déposée dans un gel d'électrophorèse en gradient temporel de température (TTGE) en utilisant le DCode systeme (Bio-Rad). La composition des gels ainsi que les conditions d'électrophorèse sont décrites par Cebron et al., (2005). Les gels sont colorés au GelRed™ (Biotium, United

States) puis révélés sous UV (Molecular Imager® Gel Doc™ XR System, Bio-Rad and Image Lab™ Software).

Les analyses des profils TTGE ont été réalisées avec le logiciel FPQuest™ Software (Bio-Rad, United States). L'analyse de la structure de la communauté bactérienne est réalisée à partir des empreintes génétiques. Un test de Pearson est utilisé pour comparer les profils de TTGE et Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) est utilisé pour créer un dendrogramme à partir des coefficients de similitude (Ibekwe et al., 2010).

3.3.5 Indice de diversité spécifique de Shannon-Weaver (H')

Pour caractériser la structure de la communauté bactérienne, l'indice de diversité spécifique de Shannon est calculé (Shannon et Weaver, 1949). Il exprime l'importance relative du nombre des espèces présentes dans un milieu donné. Ainsi, plus la proportion des espèces rares est forte et celle des espèces abondantes réduite, plus l'indice de diversité est grand.

L'indice de Shannon est calculé en utilisant la formule suivante :

$$H' = -\sum_{i=1}^{s} pi \ln pi$$

Avec : H' : indice de biodiversité de Shannon

s : nombre total d'espèces ou richesse spécifique du milieu

i : espèce du milieu étudié

pi : Proportion d'une espèce *i* par rapport au nombre total d'espèces (s) dans le milieu d'étude, qui se calcule de la façon suivante :

$$p(i) = ni / N$$

Avec : *ni*, le nombre d'individus pour l'espèce *i*, et N l'effectif total (les individus de toutes les espèces).

H' est minimal (=0) si tous les individus du peuplement appartiennent à une seule et même espèce. H' est également minimal si, dans un peuplement, chaque espèce est représentée par un seul individu, exceptée une espèce qui est représentée par tous les autres individus du peuplement. L'indice est maximal (H'max) quand tous les individus sont répartis d'une façon égale sur toutes les espèces.

Tableau 2.2. Synthèse des valeurs pour l'indice de diversité spécifique de Shannon Weaver (H')

	Très faible	Pauvre	Moyen	Elevé	Très elevé
H'	H' < 1	1 < H' < 2	2 < H' < 3	3 < H' < 4	H' > 4

4 Culture des plantes

4.1 Espèces végétales étudiées

4.1.1 Le trèfle violet

Pour chacun des modes de culture (en hydroponie ou en pot de sol), les graines de trèfle violet (*Trifolium pratense* L.) sont stérilisées à température ambiante par traitement avec une solution à base d'eau de javel à 9.6 % (v : v) (dilution au 1/3 d'une solution mère d'hypochlorite de sodium à 15° de chlore actif, à laquelle sont ajoutées une à deux gouttes de tween 80 pour 100 ml de solution) pendant 10 min sous agitation. Elles sont ensuite rincées 10 fois avec de l'EUP stérilisée par autoclavage. Puis elles sont mises à germer en conditions stériles dans une boite de Pétri en verre tapissée d'un papier filtre imbibé d'EUP stérile. Dans la boite de Pétri, les graines sont déposées sur une ligne au centre du filtre puis recouvertes par un demi-papier filtre humidifié et stérile qui va maintenir les graines humides et en place au milieu de la boite. La boite est ensuite incubée en position verticale inclinée dans une étuve à l'obscurité et à 25°C pendant une nuit, puis placée pendant 2-4 jours dans une enceinte thermorégulée sous un éclairement de 125 µmol photons/m².s avec une photopériode de 16 h de jour et 8 h de nuit.

4.1.2 Le tournesol

Les graines d'*Helianthus annus* variété Kapplan ont été fournies par le centre de l'INRA Bordeaux Aquitaine (UMR 1391 ISPA, 33882 Villenave d'Ornon). Sous PSM, dans un tube type Falcon de 50 ml, 70 graines sélectionnées pour leurs poids similaires sont d'abord lavées 3 fois avec de l'Eau Ultra Pure (EUP) stérile, puis laissées sous agitation pendant 1h pour éliminer les substances fongicides dont les graines ont été enduites par les agronomes de l'INRA. Elles sont ensuite rincées 3 fois avec l'EUP stérile, puis mises à germer à l'étuve à 25 °C, à l'obscurité, pendant 5 jours dans un bocal en verre stérilisé par autoclavage et tapissé d'un fond de vermiculite humidifiée.

4.2 Mode de cultures

4.2.1 Cultures en hydroponie

Après germination en conditions stériles, les germes les plus droits et homogènes en taille sont transférés dans des supports individuels d'un système de culture hydroponique Araponics® remplis de gel « mushy » constitué d'agar (à 8 g/L pour le trèfle et à 15 g/L pour le tournesol) coulé, gélifié puis déstructuré et déposé dans le support.

Les supports contenant les germes sont ensuite transférés sur les plaques de culture des bacs Araponics® (un plant par puit, 35 plants par plaque pour le trèfle, 18 puis 9 par plaque pour le tournesol) contenant chacun 1,7 L de milieu de Hoagland stérile (composition en annexe 1) à pH 6, oxygéné par bullage à l'aide d'une pompe à air (filtré à 0,22 µm pour stérilisation). Les bacs sont placés dans une chambre de culture phytotronique (Phytotron FITOCLIMA D1200, Rio de Mouro, Portugal) en conditions contrôlées (16h de jour à 21°C et 8h de nuit à 17°C) avec une humidité relative de 70 % et un éclairage moyen de 138 µmol de photons/m².s pendant 60 jours pour le trèfle et 28 jours pour le tournesol. Le milieu de Hoagland (solution nutritive) est intégralement renouvelé tous les 7 jours, puis tous les 4 jours lorsque les plants atteignent le stade 4-6 feuilles. Le système de culture hydroponique est présenté dans la figure 2.7.

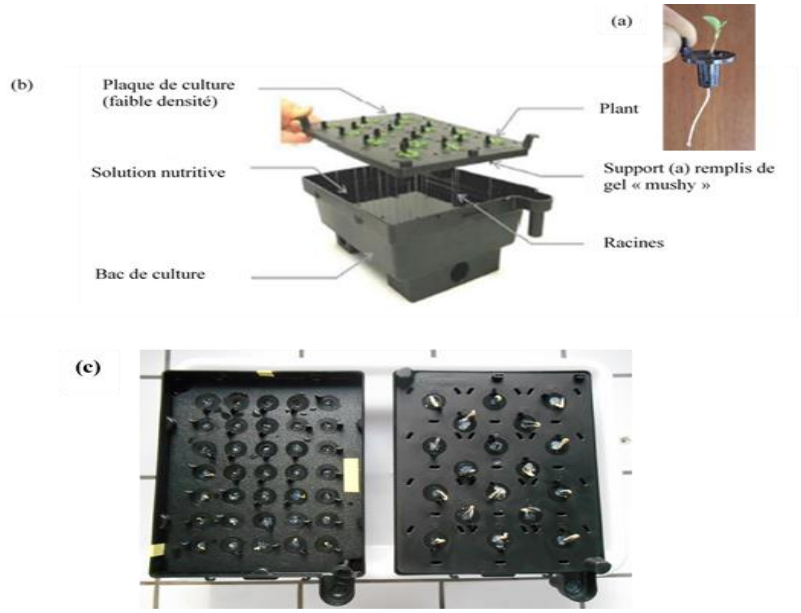


Figure 2.8. Présentation du système de culture en hydroponie pour *Helianthus annus* et *Trifolium pratense*, (a) : support où sont déposées les graines germées,
(b) : système de culture hydroponique « Araponics® system » (bac, plaque, supports)
(c) : Cultures à J0 de germes : à gauche de trèfle sur plaque haute densité (35 plants)
à droite de tournesol sur plaque faible densité (18 plants).

4.2.2 Cultures en pot

Après la pré-culture en hydroponie dans le milieu de Hoagland (cf.§ 3.2.1) jusqu'au stade 4 paires de feuilles, soit environ 21 jours pour le tournesol et 45 jours pour le trèfle, les plants les plus développés sont sélectionnés et un plant est repiqué par pot dans un mélange PG-Terreau (cf.§ 6.2.2.2.1). Les pots sont placés dans le Phytotron (FITOCLIMA D1200, Rio de Mouro, Portugal) programmé sur un cycle jour/nuit de 16/8 h, de 28/18 °C ± 3 °C en température, et sous une humidité réglée à 70 % et un éclairage moyen de 138 µmol de photons/m².s. La masse des pots est contrôlée tous les 3 jours à l'aide d'une balance et le niveau d'eau réajusté avec de l'EUP de façon à maintenir le sol à 65% de sa capacité au champ. Après chaque pesée, les pots sont remis aléatoirement dans la chambre de culture afin de tenir compte de l'hétérogénéité relative des conditions de culture (température, éclairement, humidité) au sein de la chambre de culture phytotronique.

5 Cultures des bactéries

5.1 Isolement des bactéries cultivables des sols collectés

La technique adoptée pour l'isolement au cours de ce travail est la méthode classique de dilution décimale. Un échantillon de 25 g de chaque sol prélevé aux alentours des sites de stockages des PG de la région de Sfax et M'dhilla, est ajouté à 225 mL d'eau peptonée stérile à 10 g/L. Le mélange est mis en agitation pendant 30 min à 30 °C et à 250 rpm. A partir de cette solution mère ainsi obtenue, une série de dilution décimale est réalisée (10^{-1} à 10^{-6}) dans l'eau peptonée, puis 1 mL de chaque dilution est étalé sur des milieux PCA (Plat Counting Agar) pour l'isolement des bactéries. Les boites sont ensemencées en masse de façon à permettre un développement bactérien en surface et en profondeur. Elles sont incubées à 28 °C pendant 48 heures. Ensuite, les colonies morphologiquement différentes sont isolées et purifiées par la méthode de repiquage par épuisement en stries (plusieurs repiquages successifs) (Figure 2.9).

Les souches pures isolées sont cultivées sur un milieu TSB (Tryptone Soy Broth) dilué au demi (TSB 1/2, composition en annexe) et incubées 24h à 28°C et sous agitation à 200 rpm en inclinant les tubes pour augmenter la surface oxygène/liquide. Après 24 heures, les suspensions sont stockées dans des cryotubes a -80 °C dans 20% (v/v) de glycérol. Les souches bactériennes ainsi stockées peuvent se conserver plusieurs années.

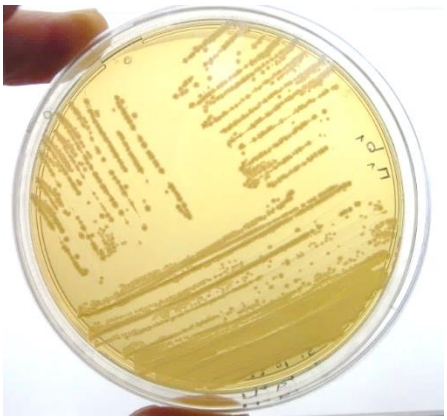


Figure 2.9. Purification des souches bactériennes isolées des phosphogypses tunisiens par repiquage par épuisement en stries sur milieu solide.

5.2 Milieux de cultures bactériennes

Différents milieux de culture bactérienne appropriés à chaque test sont utilisés (composition en annexe) :

- Milieu à l'extrait de PG à chaud ;
- Milieu sans fer : milieu CAA (casamino acids) utilisé pour le test de production de sidérophores totaux et de de pyoverdine ;
- Milieu DF (Dworkin Foster) avec fer et glucose, utilisé pour le test de production d'acide indole acétique (AIA) ;
- Milieu minimum DF sans source d'azote, utilisé pour le test de biodégradation du 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC).

Tous les milieux sont préparés avec de l'EUP et stérilisés par autoclavage à 120 °C pendant 20 min sous une pression de 1 bar.

6 Mises au point des tests pour la sélection du couple plantes/bactéries

6.1 Phytoextraction des éléments traces métalliques par *Trifolium pratense* et *Helianthus annuus*

Afin d'évaluer le potentiel de phytoextraction des éléments Cd, Ce, La, Nd, Sr et Y par *Trifolium pratense* (trèfle violet) et *Helianthus annuus* (tournesol), un test a été mené en hydroponie dans un milieu LPP (Low phosphate, low pH : Fischer et al. 2014, composition en annexe) sélectionné pour s'assurer que les ETM soient solubles et ne précipitent avec les formes ioniques du phosphate. Une modélisation par PHREEC a validé l'absence de précipités aux concentrations étudiées.

Après germination des graines, les plantes sont pré-cultivées dans du milieu de culture de Hoagland (60 jours de culture pour le trèfle et 28 jours pour le tournesol) (cf.§4.2.1). Les plantes ayant les meilleures croissances sont triées et exposées au milieu LPP additionné des 6

ETM (Cd, Ce, La, Nd, Sr, Y) apportés tous sous forme de sels de nitrate. Deux modalités sont testées : une concentration (A) correspondant à celle de l'extrait au $CaCl_2$ des PG, l'autre (B) correspondant à celle de l'extrait à l'EDTA des PG, plus un témoin sans ETM (Tableau 2.3).

Tableau 2.3. Concentrations des éléments traces métalliques (ETM) testés :
A : concentrations correspondant à celles de l'extrait au $CaCl_2$ des phosphogypses
et B : concentrations correspondant à celles de l'extrait à l'EDTA.

ETM	Concentrations (mg/L)	
	A	**B**
$Cd(NO_3)_2$	0,50	2
$Sr(NO_3)_2$	20	80
$Ce(NO_3)_3$	0,50	5
$La(NO_3)_3$	0,25	1
$Nd(NO_3)_3$	0,20	2
$Tb(NO_3)_3$	0,25	0,5
$Y(NO_3)_3$	0,25	2,5

Chaque modalité est testée en 4 réplicats (Figure 2.10). Pour chaque réplicat, un plant de tournesol est transféré dans un pot en polyéthylène haute densité (HDPE) d'un litre (lavé à l'acide nitrique 2%), rempli avec 1 L de milieu LPP. Pour le trèfle, trois plants transférés dans 1 pot avec 250 mL de milieu LPP constituent un réplicat. Les extérieurs des pots sont recouverts avec du papier aluminium pour les opacifier et éviter le développement de cyanobactéries.

Au cours de l'exposition, le niveau du milieu de culture est ajusté par pesée tous les 2 à 3 jours avec du milieu LPP, et le pH est ajusté à 5. Après 14 jours d'exposition (Figure 2.11), les parties aériennes et racinaires sont récoltées séparément et des prélèvements des milieux de culture de chaque pot sont récupérés dans des tubes de 15 mL. Les masses fraiches des plantes sont relevées puis elles sont mises à sécher. Après séchage, tous les échantillons végétaux récoltés sont broyés puis minéralisés comme décrit au paragraphe § 3.1.4.1. Les milieux de culture et les échantillons obtenus après minéralisation des racines et des parties aériennes sont analysés par ICP-AES. La teneur totale en ETM dans les parties aériennes et racinaires ainsi que les différents indices d'évaluation de la phytoextraction sont alors calculés (FBC, FT et % de dépollution, cf. §3.2.3).

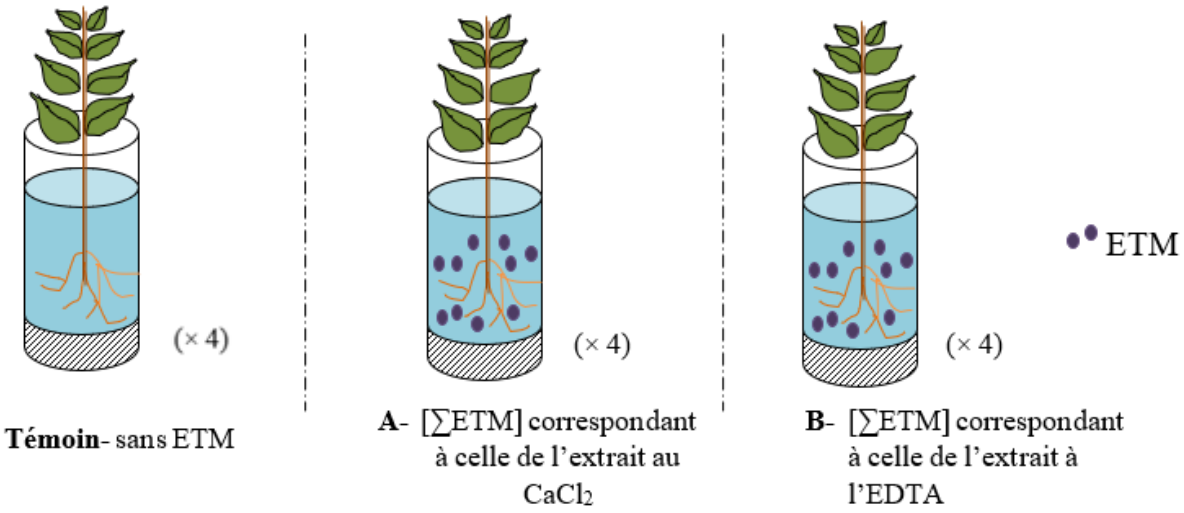
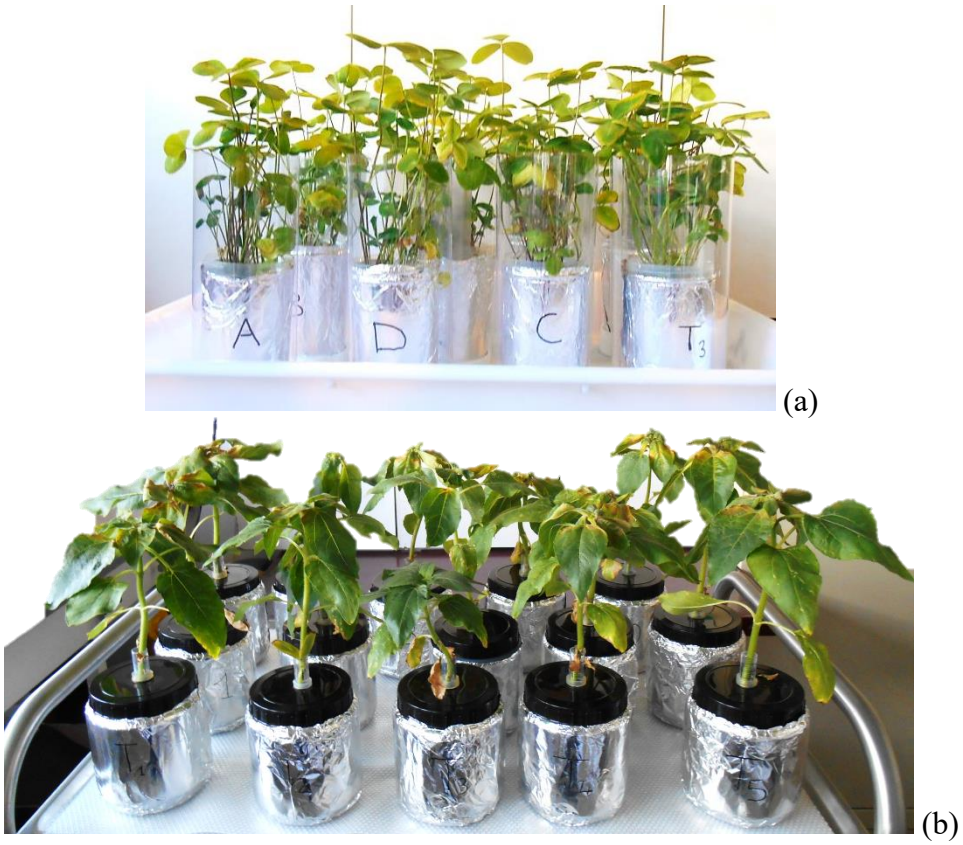


Figure 2.10. Schéma du dispositif expérimental de phyotextraction en hydroponie pour *Trifolium pratense* et *Helianthus annuus* dans un milieu LPP (Low phosphate, low pH).



(a)

(b)

Figure 2.11. Cultures hydroponiques de Trèfle (a) et de Tournesol (b) : dernier jour d'exposition des plantes aux ETM (J14)

6.2 Sélection des souches bactériennes pour la bioaugmentation

Cette étape a pour objectif de sélectionner des bactéries qui présentent des effets PGPR et qui produisent également des molécules augmentant la mobilisation des ETM du sol et leur transfert vers la plante (sidérophores comme la pyoverdine, phosphatases acides).

La sélection est réalisée sur 32 souches bactériennes isolées à partir de prélèvement de sols aux alentours des sites de stockages des PG. Les souches ont été soumises à une pré-sélection utilisant des tests miniaturisés réalisés en microplaques et basés sur les critères suivants :

i. Capacité des souches à tolérer les ETM sélectionnés : croissance sur extrait de PG à différentes concentrations et à différents pH ;
ii. Capacité à mobiliser les ETM sélectionnés : production des sidérophores totaux et production de pyoverdine sur milieu Casamino acid (CAA) ;
iii. Capacité à stimuler la croissance des plantes : production d'Acide Indole Acétique (AIA) sur milieu (DF AIA), biodégradation de l'ACC désaminase sur milieu DF modifié (DFACC).

6.2.1 Préculture des souches bactériennes

A partir de cryotubes avec glycérol 20 % (v/v) conservées à -80 °C cf. §5.1, les bactéries sont pré-cultivées dans des tubes en PP de 5 mL contenant 2 mL d'un milieu TSB dilué au demi (TSB ½) et 100 µL de suspension bactérienne pendant 24h à 28°C et 200 rpm. Après 24h de pré-culture, les cellules sont lavées 2 fois dans une solution de KCl à 9 $g.L^{-1}$ et concentrées par centrifugation (7690 g, 5 minutes) puis finalement reprises dans 5 mL de KCl 9 $g.L^{-1}$. La Densité Optique (DO) de la suspension de bactéries de chaque tube est mesurée à 620 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques Multiskan FC (Thermo Fisher, Illkirsch, France) puis la DO est ajustée à 1,0 par dilution avec du KCl. Des volumes de 25 µL de ces suspensions sont prélevés et inoculés dans les milieux de culture ou dans les réactifs choisis pour chaque test. Les tests sont réalisés en triplicats pour chaque bactérie.

6.2.2 Capacité à mobiliser les ETM

6.2.2.1 Croissance dans les extraits de PG

Ce premier test vise à sélectionner les souches bactériennes les plus aptes à tolérer différentes concentrations en PG et à différents pH, grâce à l'analyse de leur croissance dans un milieu de culture liquide à l'extrait de PG. 32 souches ont été testées.

Le milieu à l'extrait de PG est préparé selon une méthode décrite par Braud et al. (2015) pour l'extrait de terre et adaptée au PG selon l'objectif de l'expérience. Pour ce faire,

une solution mère à 10 g/L de PG est mélangée à 2 L de MLM (milieu liquide minimum) (Ştefănescu et al., 2011), puis autoclavée à 120°C pendant 20 min. Le liquide obtenu est filtré à chaud dès la sortie de l'autoclave (filtre sans cendre en papiers Durieux N°113, puis filtre en fibre de verre 698, seuil de rétention de 0,7 µm). Le filtrat est récupéré et son pH mesuré une fois refroidi. Deux solutions filles d'extrait à « 5 g/L » et à « 1 g/L » sont ensuite préparées par dilution au 1/2 et au 1/10ème de la solution mère avec du MLM. Les solutions filles sont stérilisées par filtration sur une membrane d'acétate de cellulose à 0, 22 µm de seuil de rétention, puis réparties dans des bouteilles stériles.

Les bactéries précultivées dans du TSB ½ comme décrit cf. §5.1 sont adaptées le jour suivant au milieu MLM par repiquage dans des tubes de 10 ml en PP. Chaque tube contient 5ml de MLM + 100 µL de suspension bactérienne. Après incubation à 28 °C et 200 rpm pendant 24h, la Densité Optique (DO) à 620 nm est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques (Multiskan FC, Thermo Fisher, Illkirsch, France) et les cultures sont centrifugées à 5000 g pendant 4 min. Les cellules sont ensuite récupérées et lavées 1 fois dans une solution de NaCl à 9 g/l stérile puis reprises dans un volume bien déterminé de NaCl 9 g/l, calculé pour que la DO à 620 nm soit ajustée à 1,2 dans chaque tube.

Le test est réalisé en microplaques de 96 puits avec un volume final de 300 µl. Dans chaque puit sont répartis : 250 µl de milieu de culture (solution d'extrait à chaud de PG, extrait au ½ ou extrait au 1/10) et 50 µl de suspension bactérienne (DO 620nm =1.2) (Tableau 2.4).

Tableau 2.4. Composition des milieux de culture pour le test de croissance des bactéries en milieu à l'extrait de phosphogypse.

N° microplaque	Milieu de culture	pH
1	MLM	6
2	MLM + Extrait de PG au ½	5,48
3	MLM + Extrait de PG	3,4
4	MLM + Extrait de PG au 1/10	6,0
5	MLM + Extrait de PG au ½	6,0
6	MLM + Extrait de PG	6,0
7	Témoin : milieux sans inoculum	

Chaque dilution est testée au pH de l'extrait de PG et à pH ajusté à 6, en début de culture, avec du NaOH 2M et du Na_2CO_3 10 g/L. Les essais sont réalisés en triplicats sur

chacune des 32 souches. Les microplaques sont incubées à 28°C et 200 rpm. Une mesure de croissance à 620 nm est effectuée à T0 h, T7 h, T24 h, T48 h et T72 h. Pour chaque lecture le couvercle est retiré sous un Poste de sécurité microbilogique (PSM) et un film stérile, étanche et transparent est placé sur la microplaque de façon à lire la DO sans contaminer la plaque. Le film est ensuite enlevé sous le PSM, le couvercle remis en place et la culture poursuivie jusqu'à T 72 h.

6.2.2.2 Test de bioaugmentation en tube de PG-Terreau

6.2.2.2.1 *Préparation des tubes de mélange PG-Terreau*

Comme les PG ont une teneur en matière organique inférieur à 1 %, et que purs ils peuvent présenter une toxicité pour les plantes, ils ont été mélangés à hauteur de 15 % en masse à de la matière organique (terreau).

Le test de bioaugmentation en tube du PG va permettre :

1/ d'estimer l'impact de l'inoculation des souches isolées sur les fractions mobiles et mobilisables des ETM dans le mélange PG + Terreau, grâce à des extractions sélectives (à 1/10 (m/v) au $CaCl_2$ 0,01 M, et à l'EDTA 0.01 M / NH_4CH_3COO 1 M), et

2/ de choisir les concentrations en ETM à utiliser pour le test de phytoextraction en hydroponie (§ 6.1).

Le PG étudié provient du terril de stockage de M'Dhilla (N 34°18.5097 E 8°46.3766). Les Caractéristiques physico-chimiques de PG sont présentées dans le Tableau 2.5. Il est mélangé à du Terreau universel (produit commercial à base de tourbe brune et blonde, d'écorces compostées, d'hortifibre®, de fumier et d'engrais) dont les caractéristiques sont données dans le Tableau 2.6.

Les deux substrats sont mélangés à raison de 15% de PG et 85% de terreau (m/m). Le mélange est tamisé à 2 mm, après sa détermination (§ 3.1.1) l'humidité est amenée à 65% de sa capacité de rétention, puis il est laissé au repos pendant plusieurs jours jusqu'à stabilisation du pH. Une masse précise de 25g du mélange (PG-Terreau) humide a été ensuite répartie dans une série de tubes à centrifuger en PP de 50 mL. Un échantillon du mélange (PG-Terreau) humide a été conservé et séché (en triplicat) pour les analyses du pH et des métaux totaux et extractibles à T0 (Témoin T0).

Tableau 2.5 Caractéristiques physico-chimiques des phosphogypses (PG) Tunisien. Chaque valeur est la moyenne arithmétique ± écart-type de 3 réplicats.

Paramètres	**PG Tunisien**
pH	2,38 ± 0,02
Humidité (%)	21,30 ± 0,04
P_2O_5 total (%)	0,71 ± 0,01
C Organique (%)	0,22 ± 0,05
SO_4^{2-} (%)	49, 87 ± 0,03
Ca^{2+} (%)	20,64 ± 0,93
SiO_2 (%)	1,42 ± 0,03
Cd (mg/Kg)	2,2 ± 0,60
Sr (mg/Kg)	685,10 ± 37,20
Ce (mg/Kg)	27,70 ± 1,20
La (mg/Kg)	30,20 ± 0,80
Nd (mg/Kg)	31,20 ± 0,70
Y (mg/Kg)	27,70 ± 0,60

Tableau 2.6. Caractéristiques physico-chimiques du Terreau selon le fournisseur (La Florentaise CTRU70-St Mars du Désert-France).

Paramètres	**Valeurs moyennes**
Matière sèche	35%
Matière organique	65%
Conductivité	45 mS/m
Capacité de rétention de l'eau	650 mL/l
Engrais NPK 14-16-18	1,2 kg/m^3
pH	6,5

6.2.2.2.2 *Préparation des suspensions bactériennes et bioaugmentation*

Les 32 souches testées sont précultivées dans du milieu TSB ½ puis repiquées dans du milieu MLM. La cinétique de croissance de chaque souche isolée a été déterminée par mesure de la DO à 620 nm à différents temps de culture T= 0 h, T= 4 h, T= 8 h, T= 24 h, T= 28 h, T= 32 h, T= 48 h, T= 52 h et à T= 72 h, afin de déterminer la durée de culture nécessaire à sa croissance optimale. Ce premier test de croissance est suivi, pour les 8 souches présélectionnées présentant les meilleures croissances, d'un second test basé sur les critères suivants :

i. Capacité des souches à tolérer les ETM étudiés,
ii. Capacité à mobiliser ces éléments grâce à des sidérophores (dont la pyoverdine),
iii. Capacité à stimuler la croissance des plantes grâce à la production d'AIA et d'ACC (§6.2.3).

Les 2 souches présentant les meilleurs scores sont retenues pour l'expérience de bio-augmentation.

Les souches présélectionnées et adaptées au milieu MLM : S3B1 et M1B4, ainsi qu'un témoin positif : *Pseudomonas xanthamarina* (référence : ULPAs1) provenant de sédiments miniers contaminés par de l'arsenic, sont utilisées comme inoculum pour les tubes du mélange PG-Terreau. Un témoin négatif non bioaugmenté (sans ajout de bactéries) est également préparé (Témoin T). Chaque modalité est répliquée 5 fois.

Au fond de chaque pot est placé un morceau de feutre pour éviter la perte de terre. 250 g de mélange PG-Terreau à 65 % de la capacité de rétention en eau y sont ajoutés. Chacune des 2 souches sélectionnées ainsi que *Pseudomonas xanthamarina*, sont mises à cultiver dans 50 mL de milieu TSB 1/2 stérile en erlenmeyers de 100 mL à 28°C et sous agitation (200 tpm) pendant 24 h. Ensuite, 1 ml de chaque préculture sert à ensemencer un erlenmeyer de 1 L contenant 500 mL de MLM stérile. Les erlenmeyers sont ensuite placés dans l'incubateur comme précédemment pendant 48 h. Les cellules obtenues sont concentrées si besoin par centrifugation à 7960 *g* pendant 10 minutes et reprises dans une solution de KCl stérile (9 g/L) pour obtenir un volume maximal de 1 mL avec une DO à 620 nm de 5. Les suspensions bactériennes sont inoculées dans chaque pot, une fois par semaine, à raison de 1 mL par pot. Dans chaque pot non inoculé, 1 mL de KCl 9 g/L est ajouté. Le mélange PG-Terreau est ensuite homogénéisé manuellement à l'aide d'une spatule stérile sur toute la hauteur du pot. Les pots non inoculés sont homogénéisés de la même façon.

6.2.2.2.3 *Analyse post-Bioaugmentation*

Après 4 semaines d'incubation chaque pot de mélange PG-Terreau est prélevé puis mis à sécher à 40°C dans des coupelles en aluminium jusqu'à masse constante. Les concentrations en ETM totaux, mobiles et mobilisables sont déterminés comme décrit plus haut (cf. §3.1.4.2).

6.2.3 Rôle dans la promotion de la croissance des plantes (PGPR)

Tous les tests de production des métabolites bactériens sont réalisés en présence et en absence des ETM. Les différents milieux utilisés pour les cultures-tests des bactéries sont décrits en annexe. Au final, huit souches ont été sélectionnées pour réaliser les essais : M7B2, G3B2, G1B1, G1B3, M1B4, G1B2, S3B1, M1B5 ; ainsi que deux témoins positifs : *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens*, deux bactéries connues pour produire des sidérophores.

6.2.3.1 Production de sidérophores

Le test de production de sidérophores permet de sélectionner les microorganismes produisant des sidérophores en présence ou non des ETM dans un milieu CasAmino Acide (CAA). Le milieu CAA (composition en Annexe) est préparé avec de l'EUP et stérilisé par autoclavage. La production de sidérophores est mesurée selon la méthode universelle de Scwhyn et Neilands (1987). Cette méthode repose sur la détection des sidérophores avec le réactif CAS (Chrome Azurol S, composition en Annexe). Elle mesure la capacité des sidérophores du surnageant d'une suspension bactérienne à dissocier le complexe CAS-Fe (III), que l'on peut considérer comme une mesure d'activité de la complexation du Fe (III). La détection de la disparition du complexe [CAS-FeIII] est suivie par une mesure spectrocolorimétrique (coefficient d'extinction molaire du complexe $\varepsilon_{630nm} \approx 100\ 000$ L.mol^{-1}.cm^{-1}, Schwynn et Neilands, 1987) basée sur la réaction suivante :

[CAS–FeIII] + sidérophore → CAS + [sidérophore-FeIII]

(CAS complexé : bleu) (CAS libre : orange)

Les bactéries (25 µL de suspension bactérienne lavés) sont mises en culture dans 200 µL de milieu CAA, enrichi ou non avec 25 µL d'une solution Mère en ETM (Cd, Ce, La, Nd, Sr, Y) dont la concentration finale dans le puits correspond à celle de l'extrait au $CaCl_2$ des PG (concentrations biodisponibles pour la plante, tableau 2.3). Des blancs sont faits avec 25 µl de milieu CAA stérile, avec et sans solution d'ETM. La DO initiale pour tous les puits est

de 0,1. Les essais et les blancs sont réalisés en triplica. Les microplaques sont incubées 48 h à 28 °C sous agitation à 450 rpm. Après 48 h d'incubation, la croissance est mesurée (DO 620nm). Les microplaques sont ensuite centrifugées pendant 20 min à 2500 tpm (866 g) ; un volume de 150 µL du surnageant est prélevé et transféré dans une autre microplaque pour lire la production de pyoverdine (PVD), un sidérophore fluorescent, révélée par la mesure de la DO à 405 nm (Coefficient d'extinction molaire ε_{405nm} = 19600 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ à pH 8) contre le blanc. La limite de détection est estimée à 2 µM (soit une absorbance à 405 nm de 0,05) et le maximum à 100 µM (soit une absorbance de 2,0).
La production spécifique de PVD après 48 h est calculée comme suit :

$$PVD\ (en\ \mu M) = [(DO_{405nm}\ Echantillon - DO_{405nm}\ Blanc) / 19600] \times 1.10^{6}$$

$$Production\ Spécifique\ de\ PVD\ (en\ \mu M) = PVD\ (\mu M) / [(DO_{620\ nm} - 0,1)/2].$$

La présence de sidérophores totaux est révélée en ajoutant 150 µL du surnageant de l'échantillon à analyser à 150 µL de réactif CAS-shuttle dans une proportion 1:1 (v/v). La DO à 630 nm est lue après 2 h de réaction à l'obscurité (Figure 2.12).



Figure 2.12. Test CAS-Fe en microplaque : estimation de la production de sidérophores totaux dans le surnageant d'une culture en milieu sans fer (CAA).

La production spécifique des sidérophores (PSS) après 48 h est calculée comme suit :

$$PSS\ (en\ \mu M) = [(DO_{630\ nm}\ Surnageant - DO_{630\ nm}\ Blanc) \times 1.10^{10})]/ [(DO_{620\ nm} - 0,1)/2]$$

Deux gammes étalons sont réalisées avec du DFOM (déféroxiamine M, Calbiochem) de 0 à 12 µM, sans et avec ETM, afin de corriger la courbe de calibration des éventuelles interactions des éléments traces avec le test CAS.

6.2.3.2 Production d'acide indole acétique (AIA)

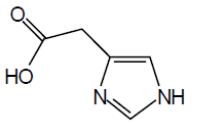
La production d'acide indole acétique à partir de tryptophane par les bactéries est déterminée par un test colorimétrique développé par Patten et Glick (2002), utilisant le réactif de Salkowski (composition en annexe). Le réactif de Salkowski a été développé afin de doser

des molécules présentant un noyau indole (Salkowski, 1884), comme l'AIA. La réaction de Salkowsky est caractérisée par la formation d'un complexe coloré rouge entre le fer et le noyau indole de l'AIA en présence de concentrations élevées en acides minéraux. Le suivi colorimétrique à 541 nm de ce complexe rouge, permet la détection et la détermination quantitative de la concentration en AIA dans les cultures bactériennes (Szkop et al, 2012), par comparaison à une gamme étalon en AIA.

Les souches sont repiquées dans du milieu TSB 1/10ème. Après 48 heures, les bactéries sont mises en culture dans du milieu DF avec fer et 10 g.L^{-1} de glucose (composition en annexe) et incubées 24 h à 28 °C sous agitation (200 rpm). Les cellules bactériennes sont récupérées par centrifugation puis lavées avec une solution de KCl à 9 g.L^{-1}. Le test, réalisé en microplaques, permet de mesurer les concentrations d'AIA produites par chaque souche. Les bactéries sont mises en culture dans 175 µL de milieu DF avec fer et glucose, 25 µL de solution de tryptophane à 10 g/L stérile, 25 µL de solution mère en ETM et 25 µL de suspension bactérienne avec une DO initiale de 1,0 à 620 nm, soient 250 mL/puits au final. Les essais sont réalisés en triplicat et les microplaques sont incubées pendant 48 h à 28 °C sous agitation (450 rpm).

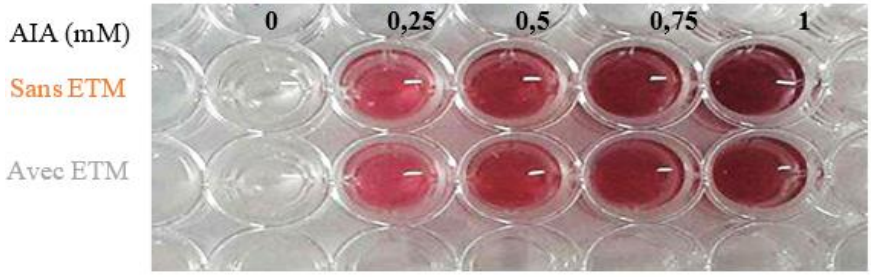
La croissance est ensuite mesurée à 620 nm contre un blanc. Après centrifugation des microplaques pendant 20 min à 2500 rpm (866 g), 50 µL de surnageant sont prélevés et mélangés à 200 µL du réactif de Salkowski. Le mélange est laissé au repos pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. L'absorbance est ensuite mesurée à 541 nm, contre un blanc, la coloration rouge étant proportionnelle à la concentration en AIA.

Deux gammes étalons, avec et sans ETM, sont réalisées avec différentes concentrations d'AIA de 0 à 1 mM, à partir d'une solution Mère de concentration connue en AIA. Elles permettent les tracés des droits étalons et la détermination de l'équation de droite de type : y = a.x + b (Figure 2.13)



AIA + $FeCl_3, 6H_2O + H_2SO_4 + H_2O$ → Composé ROUGE

Réactif de Salkowski



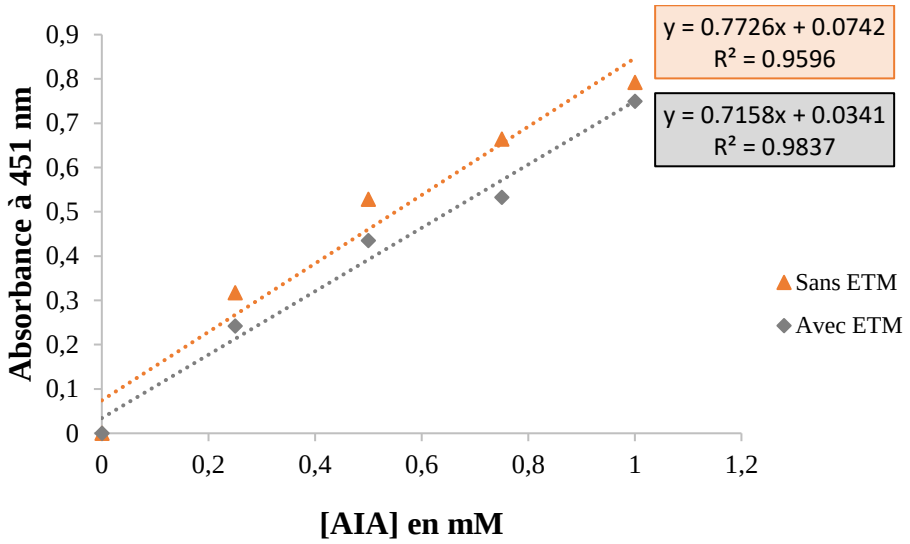


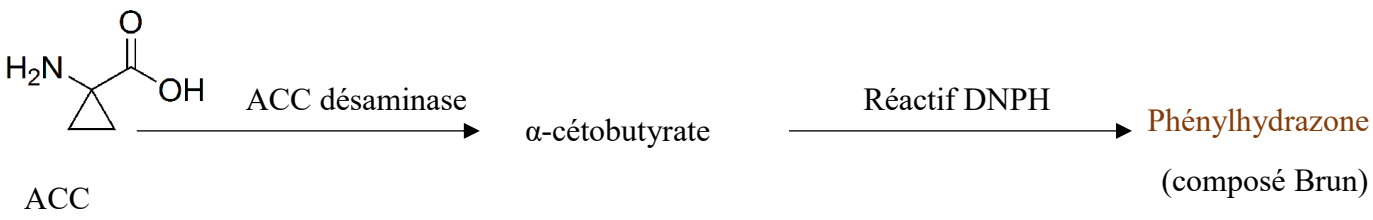
Figure 2.13. Gammes et droites étalons de l'Absorbance à 451 nm de l'acide indole acétique en fonction de sa concentration (mM) avec et sans éléments traces métalliques (ETM).

La production relative d'AIA en 48 heures est estimée comme suit :

$$AIA\ (en\ mM) = (DO_{541nm\ Echantillon} - b)\ /a.$$

6.2.3.3 Biodégradation de l'ACC

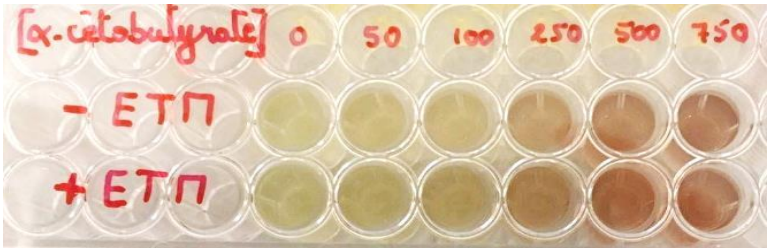
La biodégradation de l'ACC est déterminée par la méthode de Honna et Shimomura (1978) modifiée. Il s'agit d'une mesure de la quantité d'α-cétobutyrate produit par clivage enzymatique de la molécule de 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) sous l'action de l'ACC Désaminase de la souche bactérienne testée. L'α-cétobutyrate est ensuite dérivé en phénylhydrazone par action du réactif DNPH (2,4-dinitrophenylhydrazine à 0.2% dans de l'HCl 2M), dont la coloration brune est développée par addition de soude (NaOH 2M) puis mesurée par colorimétrie à 540 nm. La quantité d'α-cétobutyrate produite est déterminée par comparaison de l'absorbance à 540 nm des échantillons à une courbe d'étalonnage d'une gamme d'α-cétobutyrate comprise entre 0,1 et 1,0 µmol, traitée en parallèle.



Ce test est également réalisé en microplaque. Les bactéries sont mises en culture dans des puits avec :187,5 µL de milieu DF modifié sans source d'azote (composition en annexe), plus 12,5 µL d'ACC 60 mM stérilisé qui constitue la seule source d'azote, et 25 µL de la solution mère en ETM et enfin 25 µL de suspension bactérienne dont la DO initiale a été ajustée en tube à 0,1 ; soient 250 µL/puit. Chaque modalité est réalisée en triplicats, ainsi qu'un blanc avec 212,5 µl de milieu DF, 12,5 µL d'ACC, 25 µL de la solution mère en ETM et sans suspension bactérienne. Les microplaques sont incubées pendant 48 h à 28 °C sous agitation (450 rpm).

Au bout des 48 heures, la croissance est mesurée à 620 nm contre un blanc. Après centrifugation des microplaques pendant 20 min à 2500 rpm (866 g), 20 µL de surnageant sont prélevés et mélangés à 30 µL de réactif (0,2 % 2,4-dinitrophenylhydrazine dans de l'HCl 2 M). Le mélange est laissé à incuber pendant 30 minutes à 28 °C, temps pendant lequel l'α-cétobutyrate est dérivé en phénylhydrazone. Après l'incubation, 200 µL de NaOH 2 M sont ajoutés pour révéler la coloration brune de la phénylhydrazone. L'absorbance est ensuite lue à 541 nm, contre un blanc. Deux gammes étalons, sans et avec ETM, sont réalisées à partir d'une solution Mère connue d'α -cétobutyrate avec différentes concentrations de 0 à 1 mM. Les droites étalons et leurs équations sont ensuite déterminées : y = a.x + b (Figure 2.14)
La capacité de dégradation de l'ACC par chaque bactérie est estimée par le calcul qui suit :

$$\alpha\text{-cb (en µM)} = (DO_{541nm} \text{ Echantillon} - b) / a$$



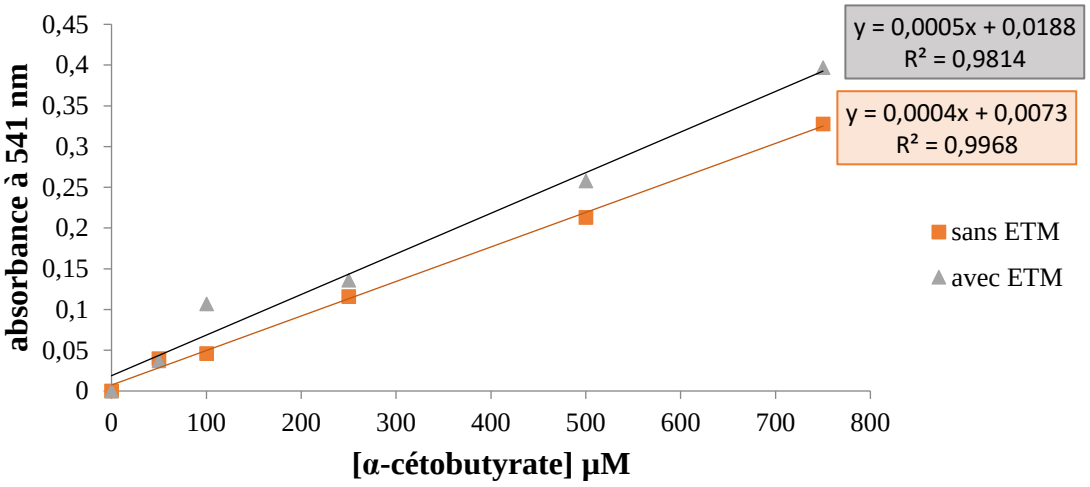


Figure 2.14. Gammes et droites étalons de l'absorbance à 541 nm de l'α-cétobutyrate en fonction de sa concentration (µM), sans et en présence des éléments traces métalliques (ETM).

7 Phytoextraction couplée à la bioaugmentation des ETM

7.1 Préparation du mélange PG-Terreau

Le PG et le Terreau sont ceux utilisé dans la section §6.2.2.2.1. Les deux substrats sont mélangés à raison de 15% de PG et 85% de terreau (m/m). Le pourcentage de PG utilisé pour la culture du tournesol est choisi sur la base des données de la littérature (Khoudi et al., 2012 ; Ayadi et al., 2014 ; Elloumi et al. 2015) et suite à un essai préliminaire avec un mélange PG-terreau à deux ratios (humidité des mélanges amenée à 65% de leur capacité de rétention) : des plants de tournesols précultivés 10 jours en hydroponie ont été plantés dans des pots contenant 50 g de mélange à deux ratios (m/m) différents : {25% PG + 75% Terreau} et {15% PG + 85% Terreau}. Un témoin sans PG est aussi constitué, à partir de plants installés et cultivés sur terreau seul. Chacune des conditions du test sont réalisées en triplica. Les plantes sont arrosées régulièrement.

7.2 Plan d'expérience et préparation des pots

Les 2 souches préalablement sélectionnées dans la section §6.2. et une souche témoin positif : *Pseudomonas xanthamarina* (fournie par Didier Lièvremont, UMR CNRS 7156 - Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie) sont utilisées pour la bioaugmentation du mélange PG-Terreau. Trois modalités sont testées (figure 2.16) :

- **Mélange PG-Terreau non planté inoculé (bioaugmenté) (NPI)**, afin d'évaluer l'effet de la bioaugmentation sur la spéciation des ETM ;
- **Mélange PG-Terreau planté avec *Helianthus annus* ou *Trifolium pratense* non inoculé (PNI,)** pour évaluer l'efficacité de la phytoextraction des ETM par ces plantes.
- **Mélange PG-Terreau planté avec *H. annus* ou *T. pratense* inoculé (PI)** par chaque souche sélectionnée **(S1, S2 ou S3**), afin d'évaluer l'effet de la bioaugmentation sur la phytoextraction.
- **Un témoin** non inoculé non planté **(NPNI)** est également préparé et incubé comme les autres modalités figure 2.15.



Figure 2.15. : Phytoextraction couplée à la bioaugmentation, les 5 réplicats des pots de mélanges PG-Terreau à J0 : Témoin non inoculé (NPNI) et pots inoculés (NPIS1, 2 et 3).

Chaque modalité est répliquée 5 fois. Au fond de chaque pot est placé un morceau de feutre pour éviter la perte de terre. Le dispositif {pot + feutre} est pesé à vide, puis 250 g de mélange PG-Terreau à 65 % de la capacité de rétention en eau y sont ajoutés, et la masse totale est pesée de nouveau et consignée.

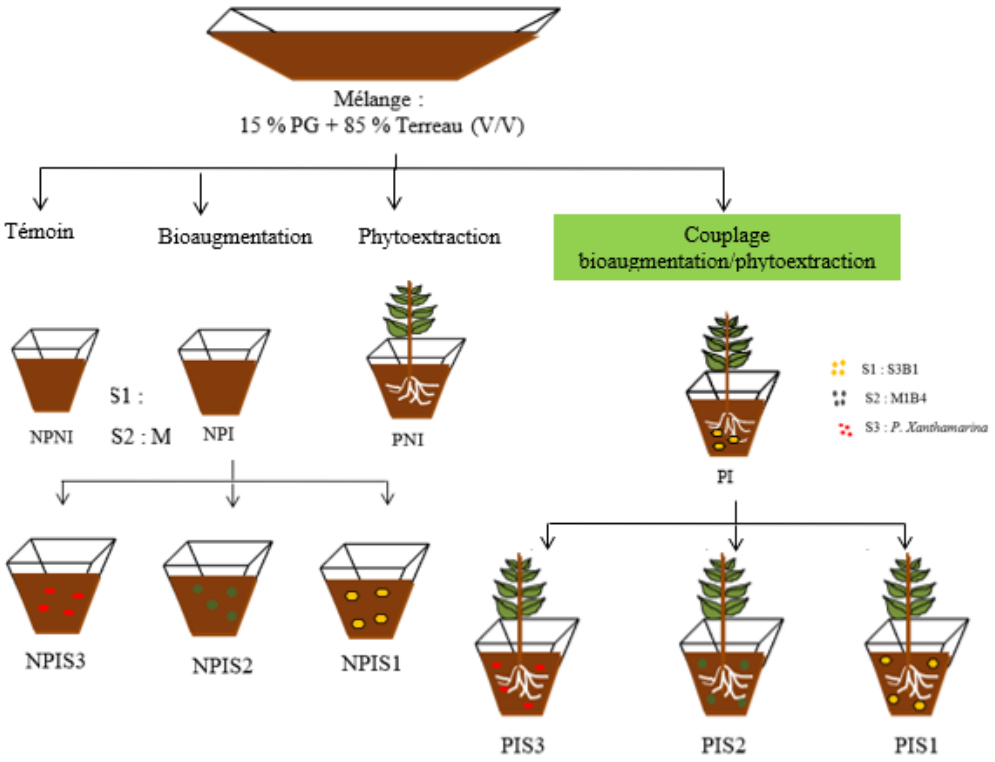


Figure 2.16. Schéma du dispositif expérimental de couplage de la phytoextraction en pot dans un mélange Phosphogypse-Terreau, sans et avec bioaugmentation par 3 souches bactériennes pré-sélectionnées, suivi pour chacune des 2 espèce testées (*Trifolium pratense* et *Helianthus annus*)

.

7.3 Repiquage et suivi des cultures de plantes

Après pré-culture en hydroponie (cf.§3.2.1) jusqu'au stade 4 paires de feuilles (soit environ 21 jours pour le tournesol et 45 jours pour le trèfle), les plants les plus développés sont sélectionnés et sont repiqués dans chaque pot (PNI et PI) : un plant pour le tournesol et 4 plants pour le trèfle violet. Ces pots sont à nouveau pesés, et leurs masses avec plantes consignées. Tous les pots (avec ou sans plantes) sont placés dans le phytotron programmé sur un cycle jour/nuit de 16/8 h, 28/18 °C ± 3 °C en température, et une humidité régulée à 70 % et un éclairage moyen de 138 µmol de photons/m².s. La masse des pots est contrôlée tous les 2 à 3 jours et le niveau d'eau réajusté avec de l'eau distillée de façon à maintenir le sol à 65% de la capacité au champ. Après chaque pesée, les pots sont remis aléatoirement dans la chambre de culture afin de tenir compte de l'hétérogénéité des conditions de culture (température, éclairement, humidité) au sein de la chambre de culture (Figure 2.17).



Figure 2.17. Photographie des pots pour l'essai de phytoextraction couplée ou non à la bioaugmentation : pots à J5 de *Trifolium pratense* dans l'enceinte phytotronique, avant inoculations.

7.4 Préparation de l'inoculum et inoculation des pots

7.4.1 Préculture et préparation de l'inoculum bactérien

Les souches bactériennes sélectionnées : S3B1 et M1B4 (S1 et S2) ayant fait l'objet d'études antérieures sur la mobilité des ETM sont utilisées pour réaliser le couplage Bioaugmentation - Phytoextraction, ainsi que la souche témoin (S3) : *Pseudomonas xanthamarina* (référence : ULPAs1).

Chacune de ces 3 souches est mise à cultiver dans 50 mL de milieu TSB ½ stérile en erlenmeyers de 100 mL (lavés à l'acide nitrique 2%) à 28°C et sous agitation (200 t/min) pendant 24 h. Ensuite, afin d'adapter les souches en Milieu Liquide Minimum (MLM), 1 ml de chaque préculture sert à ensemencer un erlenmeyer de 1 L (lavés à l'acide nitrique 2%) contenant 500 mL de MLM stérile (voir composition Tableau 2). Les erlenmeyers sont placés dans l'incubateur, comme précédemment, pendant 48 h. Les cellules sont ensuite concentrées par centrifugation à 7960 *g* pendant 10 minutes et reprises dans un volume adapté d'une solution de KCl stérile (9 g/L) pour obtenir un volume maximal de 1 mL avec une $DO_{620\ nm}$ égale à 5.

7.4.2 Inoculation des pots

Les suspensions bactériennes sont ajoutées une semaine après le repiquage des plantes. Elles sont réparties à raison de 1 mL par pot (NPIS et PIS). Le mélange PG-Terreau est ensuite homogénéisé manuellement à l'aide d'une spatule stérile par grattage. Les pots non

inoculés (NPNI et PNI) sont homogénéisés de la même façon après ajout de 1 mL d'une solution de KCl (9 g/L).

Les souches sont inoculées de manière hebdomadaire, avec la même quantité de bactéries, pendant 3 semaines. Le renouvellement de l'inoculum a pour but de favoriser l'implantation et la survie des souches.

7.5 Récolte des échantillons

Après 4 semaines de culture, les plantes sont récoltées (Figure 2.18). Le mélange PG-Terreau est d'abord éliminé manuellement des racines. Les parties aériennes (PA) et les parties racinaires (PR) de chaque plante sont récoltées séparément dans un premier bain rapide d'eau distillée. Les PA sont lavées rapidement, rincées à l'eau distillée puis à l'EUP et essuyées. Les racines sont rincées longuement à l'eau du robinet puis à l'eau distillée et enfin à l'EUP afin de retirer toutes les particules du mélange encore collées au réseau racinaire. La masse fraîche des parties aériennes et racinaires est pesée dans des barquettes en aluminium préalablement tarées à vide. Pour le trèfle, les PA des 3 plantes du pot constituant le réplicat d'une part, et les 3 PR d'autre part, sont assemblées et pesées après leurs récoltes pour constituées l'échantillon de PA et celui de PR de ce réplicat. Par ailleurs, environ 40 g de sol sont prélevés par pot, pesés et mis à sécher à 40 °C pendant 5 jours. Ils sont destinés à analyser la mobilité des ETM dans le mélange PG- Terreau, ainsi que leurs teneurs totales et le pH du mélange après culture.



Figure 2.18. Phytoextraction couplée ou non à de la bioaugmentation : pots inoculés (PIS) et non inoculés (PNI) de *Trifolium pratense* à J final.

Les parties aériennes et les racines sont découpées séparément en fragments de 1 cm avec des ciseaux préalablement lavés et désinfectés à l'éthanol 70%. Les échantillons sont séchés jusqu'à masse constante pendant environ 5 j à 40 °C. Enfin, la masse sèche des parties aériennes et des racines est à nouveau pesée, puis broyée, et des masses précises de ces

échantillons végétaux sont minéralisées par voie acide afin de déterminer les teneurs (en mg/kg de Masses Sèches), le facteur de translocation (FT), et le facteur de bioconcentration (FBC) pour les éléments étudiés : Cd, Ce, La, Nd, Sr, Y.

8 Analyses statistiques

Les données obtenues sont traitées avec le logiciel Microsoft Excel XLStat. Le test principalement utilisé est l'analyse de variances (ANOVA), permettant une comparaison de plusieurs moyennes au seuil de 5 %. Dans le cas de différences significatives, cette dernière est suivie d'un test de Tukey, test permettant d'identifier les différences significatives mises en évidence par l'ANOVA. Ces dernières sont représentées par des lettres différentes sur les graphes illustrant les résultats. Les résultats appartenant à un groupe homogène et ne présentent pas de différence significative se voient attribuer la même lettre. Les relations entre les différents paramètres mesurés sont mises en évidence par une Analyse en Composantes Principales(ACP).

Résultats & Discussion

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 1 : Devenir et transfert des éléments traces métalliques dans les sols environnant les terrils des phosphogypses en Tunisie

Jihen Jalali[a,b,d], Pierre Gaudin[a], Hervé Capiaux[a,c], Mohamed Neji Saidi[d], Emna Ammar[b], Thierry Lebeau[a*]

[a]Laboratory of Planetology and Geodynamics of Nantes, UMR 6112 CNRS, Faculty of Sciences and Technology of Nantes, BP 92208, 44322 Nantes Cedex 3, France

[b]Research Unit Coastal and Urban Environments, University of Sfax, National Engineering School of Sfax, BP 1173, 3038 Sfax, Tunisia

[c] Platform for molecular analysis of biodiversity-environnement, IUT Génie Biologique, 85035 La Roche sur Yon, France

[d]Tunisian Chemical Group, M'dhilla-Gafsa factory, B.P. 215, 2100 Gafsa, Tunisia

Résumé

Cette étude a pour objectif d'étudier l'impact environnemental potentiel des rejets des phosphogypses (PG) en Tunisie. Le Cd, Ce, La, Nd, Sr et Y sont analysés à partir de sols (jusqu'à 50 cm de profondeur) situés à proximité des terrils de PG (Sfax et M'dhilla) et des sédiments (jusqu'à 20 cm de profondeur) provenant de rejets marins de PG (Gabès). Leurs impacts sur la structure de la communauté bactérienne et des plantes spontanées (*Chenopodium murale, Conyza canadensis, Kochia indica,* et *Suaeda mollis* pour le site de Sfax; *Arthrocemum indicum, Atriplex Halimus, Bassia muricata* et *Zygophyllum album* pour le site de M'dhilla) sont examinés. Les résultats montrent que les concentrations des ETM (en mg/kg MS) des trois sites d'étude sont plus élevées que celles des sols témoins (à 12 Km de dépôt de PG) et suivent l'ordre décroissant suivant (en mg/kg de sol sec) : Sr (698 et 528,20) > Ce (112,50 et 12,10) > La (98, et 13,50) > Y (87,30 et 13,30), Nd (95,20 et 13,70) > Cd (88,60 et 2,20).

Pour tous les profils de sol, les concentrations les plus élevées sont enregistrées dans les horizons de surface et diminuent avec la profondeur. La proportion la plus élevée d'ETM est détectée principalement dans la fraction liée aux carbonates et mobilisées par complexation. L'étude d'écologie moléculaire par PCR- TTGE ciblant l'ARNr 16S dans les zones d'étude a montré une faible diversité bactérienne et une grande similarité entre les différents sols, à l'exception des sols rhisosphériques qui sont à la fois très différents entre eux et par rapport aux autres prélèvements. La concentration en métaux dans les parties aériennes (PA) et les parties racinaires (PR) varie d'une espèce végétale à l'autre et est plus élevée que celle dans les sols témoins. Les concentrations en ETM dans les PA suivent l'ordre décroissante suivant (en mg/kg de matière sèche) : Sr pour *Z. album* (657,56) > Cd pour *Z. album* (14,20) > La pour *Z. album* (11,05) > Ce pour *C. canadensis* (1,11) > Nd pour *C. canadensis* (0,75) > Y pour *A. indicum* (0.72). Les valeurs des facteurs de bioconcentration (FBC) obtenues pour les métaux étudiés sont inférieures à 1 pour toutes les plantes à l'exception du Cd du site de Sfax pour *K. indica* (1,60) et du site de Gafsa pour *Z. album* (1,05) ainsi que le Sr pour la même plante avec une valeur égale à 1,10. Le facteur de translocation (FT) le plus élevé (6,12) est calculé pour *Z. album*. Par conséquent *Z. album* pourrait être le candidat le plus approprié pour la phytoextraction des ETM.

Mots clés : Biodiversité bactérienne, métaux lourds, phosphogypse, phytoremediation, terres rares, végétation spontanée

1 Introduction

La production d'engrais phosphatés est une activité économique importante dans plusieurs pays méditerranéens, parmi lesquels figure la Tunisie. Bien que les fertilisants chimiques phosphatés soient indispensable au développement de l'agriculture, se pose le problème d'élimination des déchets en raison de la génération d'énormes quantités de phosphogypses (PG), sous-produits majeurs de la production d'acide phosphorique par voie humide. En général 4,5 à 5 tonnes de PG sont générées par tonne d'acide phosphorique (Rapport de sécurité de l'AIEA, 2013), soit une production mondiale annuelle entre 200 et 250 Mt. (Saadaoui et al., 2017). Environ 85 % de la totalité de PG est rejetée sans aucun traitement, dans le milieu naturel, provoquant de sérieux problèmes environnementaux et de santé humaine (Rutherford et al., 1994 ; Hentati et al., 2015, Tayibi et al., 2009 ; Saadaoui et al., 2017). En Tunisie, la quantité totale de PG générée annuellement a dépassé 10^7 tonnes de 1952 à 2016 (Saadaoui et al., 2017), qui sont actuellement soit stockés à côté des unités de transformation de phosphates à Sfax et Gafsa (M'dhilla), sous forme de terrils, ou rejetés en mer à Gabès. Considérant leurs caractéristiques ($CaSO_4$.$2H_2O$ > 90 %), les PG pourraient être valorisés dans les principaux secteurs de l'agriculture, l'industrie chimique et le génie civil (Sfar- Felfoul et al., 2005 ; Papastefanou et al., 2006 ; Saadaoui et al., 2017). Cependant, l'acidité élevée, le contenu faible en azote et la présence des métaux lourds peuvent restreindre son utilisation comme amendement du sol. Le PG est principalement constitué de gypse mélangé avec du phosphate de calcium sous différentes formes, de la silice et d'autres impuretés de diverses natures tels que des oxydes de fer, de magnésium et d'aluminium, des sulfures, de la matière organique, des éléments traces métalliques (ETM) incluant des métaux lourds, des terres rares (TR) et des radionucléides, provenant des phosphates naturels (Pérez-López et al., 2007). Des études antérieures ont montré le transfert des substances toxiques par lessivage des terrils de PG et ont considéré ce transfert de pollution comme une menace pour le sol, la faune et la flore. (Pérez-López et al., 2010 ; Saadaoui et al., 2017). D'autres études se sont focalisées sur la biotransformation des PG par des bactéries sulfato-réductrices, des bactéries solubilisant les phosphates inorganiques (Wolicka et Kowalski, 2006 ; Azabou et al., 2007 ; Thabet et al., 2016 ; Zouch et al., 2017) des bactéries tolérantes aux ETM comme le Sr (Ben salem et al., 2012). Cependant aucune étude n'a porté sur l'impact des PG sur la biodiversité bactérienne des sols environnants. Quelques études ont évalué l'impact des radionucléides présents dans les PG sur l'environnement à proximité des industries de

phosphates (Ajam et al., 2009 ; Bolivar et al., 2000 ; Saadaoui et Al., 2017 ; Tayibi et al., 2009). D'autres chercheurs ont démontré que la bioaccumulation des ETM dans les tissus de différents organismes dépend de la concentration en métal dans le sol et de sa mobilité déterminée par de nombreux facteurs environnementaux notamment la salinité et la valeur du pH (Mendez et Maier, 2008). En effet, l'acidité du PG joue un rôle important dans la solubilisation et la mobilisation des ETM. Les PG tunisiens sont des matériaux dont les caractéristiques évoluent peu en fonction de la durée de son stockage (Sfar- Felfoul et al., 2005). Ils sont peu radioactifs, comparé à d'autres PG dans le monde (Ajam et al., 2009). Ils contiennent des éléments à haute valeur commerciale notamment des Terres rares (TR) (Hammas- Nasri et al., 2016) qui sont utilisées dans des produits de haute technologie au cours des dernières décennies. La teneur moyenne en oxyde de lanthane (Ln_2O_2) dans le PG est compris entre 0,3 et 0,7 % (Kulczycka et al., 2015). Les PG constituent ainsi une matière première potentielle pour la fabrication de 6 à 10 kt des TR (Grabas et al., 2014).

Différentes techniques physico-chimiques se sont développées pour la récupération des ETM incluant les TR tels que la déshydratation, la recristallisation, la précipitation chimique, l'adsorption, la lixiviation et l'échange d'ions (Barakat, 2011; Hammas-Nasri et al., 2016). Cependant, ces techniques sont généralement coûteuses et incapables de traiter la totalité des PG générés : seulement 15 % des PG produits dans le monde sont recyclés. Dans ce contexte, de nouvelles techniques respectueuses de l'environnement doivent être développées. Au cours des dernières décennies, la phytoremédiation, compte parmi les méthodes innovantes de dépollution des sols. En plus d'être peu coûteuse, elle permet de conserver les propriétés des sols (Kothe et al., 2005). Le Phytomining, i.e., la récupération et la réutilisation des métaux précieux, s'inscrit dans une approche d'économie circulaire promouvant le développement durable et la préservation des ressources naturelles. En outre, l'utilisation des plantes pour recouvrir les sols contaminés (phytostabilisation) peut limiter la dispersion de la pollution (Komnitsas et al., 1999). La phytoremédiation, utilisant des plantes tolérantes à de fortes concentrations en ETM peut constituer une stratégie potentielle peu coûteuse capable de dépolluer les sols contaminés par les PG (phytoextraction), de récupérer les TR à haute valeur commerciale (phytomine) et de limiter la dispersion des PG dans l'environnement (phytostabilisation).

Enfin, la phytoremédiation pourrait être associée à la bioaugmentation pour augmenter la vitesse de dépollution par les plantes, l'ajout de micro-organismes favorisant la croissance des plantes et/ou augmentant l'accumulation des ETM dans ces parties récoltables (Lebeau et al., 2008 ; Sessitch et al., 2013).

L'objectif du présent travail est i) d'analyser la teneur en ETM (Cd, Ce, La, Nd, Sr et Y) dans les échantillons de sol collecté aux alentours des sites de stockage de PG des usines de transformation de phosphate en Tunisie et de comparer ces valeurs à celles d'échantillons de sol de référence (i.e., non impactés par les PG) ; ii) d'analyser les teneurs en ces éléments accumulés dans les plantes spontanées poussant dans la zone d'étude et évaluer leurs potentiels pour la phytoremédiation ; iii) d'analyser l'impact des PG sur la structure de la communauté bactériennes colonisant les sites d'études et les comparer aux sols de référence

2 Matériel et méthodes

2.1 Sites d'étude

La zone d'étude comprend trois sites situés aux alentours des sites de rejets des PG par les usines de transformation de phosphates en Tunisie. Ils sont situés dans la zone côtière (Gabès, Sfax) et à proximité du bassin minier de Gafsa (M'dhilla) (Données supplémentaires, fig. F1).

A Sfax, l'industrie des engrais chimiques est l'activité industrielle la plus importante. L'étude est réalisée autour du terril de PG situé dans la zone industrielle à proximité de la zone urbaine sud de Sfax et à peu près à un kilomètre de la zone côtière (34°10' Nord, 10°43' Est). Ce terril, d'une 50 m de haut contient environ 30 Mt de PG, occupant une superficie de 48 ha limité au sud par l'Oued El Maou et la route au nord.

Le deuxième site de M'dhilla est situé à 6 km au sud de Gafsa, où sont stockées 20 Mt de PG à proximité de l'usine de production d'acide phosphorique (34° 10' Nord, 8°45' Est) couvrant 36 ha (55 m de haut) et limité par l'Oued El Maleh au nord.

Le troisième site de Gabès est situé sur la côte de la Tunisie, près des ports de commerce de Ghannouche, abritant la zone de rejet maritime de PG (33° 54' Nord, 10° 06' Est), situé à 3 km au nord de la ville de Gabès, et limité par l'Oued Ettine au nord et l'Oued al Fard au sud. Dans cette zone, 1000 à 13 000 tonnes de PG sont rejetés en mer chaque jour. L'estimation des rejets en 30 ans sur les côtes du Golfe de Gabès est de 135 millions de tonnes de PG secs.

La zone d'étude est soumise à un climat méditerranéen aride caractérisé par des étés chauds et secs influencés par les vents chauds du sud et des hivers froids et humides, avec des précipitations annuelles moyennes de 190 à 210 mm, principalement en automne et en hiver. La température moyenne annuelle varie entre 16/18 °C en hiver et 32/33 °C en été (Jemai et al., 2016).



Données supplémentaires Fig. F1. Carte des terrils de phosphogypse (PG) dans les communes de Sfax et M'dhilla (Gafsa) et localisation des échantillons étudiés : SMP1-SMP4 dans le site de M'dhilla, SSP1-SSP4 dans le site de Sfax et SG1-SG6 dans le site de Gabès. Les profils de sol ont été réalisés dans les sites de M'dhilla et de Sfax. Plusieurs plantes ont été récupérées à différents endroits : *Chenopodium murale*, *Conyza canadensis*, *Kochia indica* et *Suaeda mollis* dans le site de Sfax (PS1-PS4); *Arthrocemum indicum*, *Atriplex halimus*, *Bassia muricata* et *Zygophyllum album* dans le site de M'dhilla (PM1-PM4). La flèche bleue indique le sens du flux de lixiviats générés par les terrils de PG.

2.2 Echantillonnage

Une première campagne d'échantillonnage a été réalisée en juillet 2014. 19 échantillons de sol sont prélevés à une profondeur d'environ 20 cm pour l'analyse des concentrations en ETM près des zones des terrils de PG : SS1 à SS6 à Sfax et SM1 à SM7 à M'dhilla. Dans la région de Gabès, des échantillons de PG sont prélevés dans la zone de rejet en mer (données supplémentaires, fig. F1). La couche supérieure de 0-20 cm de 6 sédiments marins est collecté (SG1-SG6).

À chaque point d'échantillonnage, trois échantillons de sols / sédiments sont prélevés à des distances relativement proches les uns des autres et soigneusement mélangés afin d'obtenir un échantillon composite. Deux échantillons de PG, de différents âges, sont également prélevés : un le plus ancien (environ 30 ans), au pied du terril (PGp) et un le plus frais prélevé au sommet du terril du PG à M'dhilla (PGt). En juillet 2015 (deuxième campagne d'échantillonnage), 33 échantillons de sol sont collectés sur 8 profils de sol (jusqu'à une profondeur de 50 cm autour des racines de chaque plante) à l'aide d'une pelle en acier inoxydable : quatre ou cinq échantillons de sol ont été collectés pour chaque profil de sol à 10, 20, 30, 40 et 50 cm de profondeur, afin d'analyser la distribution verticale des ETM près des zones de stockage des PG des sites de Sfax (SSP1 à SSP4) et M'dhilla (SMP1 à SMP4).

Dans les sites de Sfax et de M'dhilla (Données supplémentaires Fig. F1), les plantes indigènes les plus abondantes, avec le couvert végétal le plus important, sont sélectionnées. Quatre espèces sont récoltées au hasard, à une distance de 1 à 3,5 m de chaque terril de PG. L'identification taxonomique du matériel végétal est réalisée dans le laboratoire de botanique de la Faculté des sciences de l'Université de Sfax (Tunisie), sur la base de la flore des zones arides et sahariennes (Chaieb et Boukhris, 1998). Pour chaque site, des plantes témoins et les sols associés (SSC à Sfax et SMC à M'dhilla) sont collectés dans une zone non polluée, à environ 12 km de la zone de dépôt de PG. En laboratoire, les échantillons de sol, de PG et de sédiments sont stockés à 4 °C pour les analyses des ETM et à -20°C pour les analyses microbiologiques. Les échantillons végétaux sont soigneusement lavés avec de l'eau du robinet et rincés trois fois avec de l'eau désionisée (Mezghani et al., 2005). Les échantillons de plantes sont ensuite séparés en parties aériennes (feuilles et tiges) et parties racinaires puis, séchés à l'étuve à 40°C pendant 10 jours et conservés à température ambiante jusqu'à l'analyse. Les échantillons de sol et de sédiments sont séchés à 40°C pendant 5 jours jusqu'à un poids constant et ils sont ensuite tamisés à travers un tamis en acier inoxydable de 2 mm pour éliminer les cailloux et les débris.

2.3 Analyses chimiques

Le pH_{eau} est déterminé selon la norme NF ISO 10390 (AFNOR 1994b) avec un ratio sol/eau de 1:5 (p:v). Après séchage, 5 g de sol/sédiment sont agités dans 25 mL d'eau ultra pure pendant 15 min. La suspension est ensuite mise à reposer au moins 2 h. Puis, le mélange est agité énergiquement à la main pour le remettre en suspension avant la mesure du pH (pH-mètre Mettler Toledo FE20/EL20).

La spéciation des ETM du sol est évaluée selon la méthode de Mittermüller et al., (2016), adaptée aux terres rares. Selon les étapes suivantes : une prise d'essai de 250 mg de sol sec, broyés et tamisés, est introduite dans un tube en polypropylène (PP) de 50 mL. Etape 1 : Extraction avec 50 mL d'une solution de nitrate de calcium Ca $(NO_3)_2$ à 0,05 M pendant 6h sous agitation et à température ambiante. Le surnageant est récupéré après centrifugation à 7690 *g* pendant 10 minutes et filtré sur une membrane à 0,22 µm. Le sol est ensuite rincé avec de l'EUP puis centrifugé à nouveau. Le surnageant de rinçage est éliminé, et le culot est traité avec l'extractant suivant ; Etape 2 : Extraction avec 50 mL d'une solution d'acide citrique ($C_6H_8O_7$) à 0,1 M et pH 2 (ajusté avec de l'HNO_3) pendant 24h sous agitation (après une remise en suspension manuelle initiale). Le procédé est ensuite le même que celui décrit ci-dessus jusqu'au rinçage ; Etape 3 : Extraction avec 50 mL d'une solution de chlorhydrate d'hydroxylamine (chlorure d'hydroxylammonium, $HONH^{3+}$, Cl^-) à 0,5 M et pH 2 (ajusté avec de l'acide nitrique HNO_3) pendant 24h sous agitation ; Etape 4 : Extraction avec 50 mL de HNO_3 6.5% (1,4 M, 24h d'agitation). Entre chaque extraction, le surnageant de chaque fraction est récupéré, filtré sur membrane de 0,22 µm et conservé à 4°C pour analyse en ICP-AES, et le culot est rincé avec 30 mL d'EUP et reconcentré par centrifugation. L'extraction est réalisée en triplicats pour chaque sol.

Les échantillons de sol/sédiment sont analysés par des méthodes spectrophotométriques pour les éléments majeurs (Ca, SO_4, P_2O_5, SiO_2). La teneur totale en ETM est déterminée selon la norme ISO 11464 (AFNOR 2006), Après séchage et broyage à 250 µm à l'aide d'un boyeur à battoir (A 11 basic et battoir A 11.1 de IKA, Staufen, Germany). Une prise d'essai de 0,50 ± 0,01 g d'échantillon du mélange PG-Terreau sec est introduite dans un réacteur en téflon de 55 mL (CEM µWave, Orsay, France) dans lequel sont ajoutés 3 mL de HCl 37 % (v/v) et 9 mL de HNO_3 65 % (v/v). La mise en solution par attaque acide est réalisée dans un four à micro-ondes CEM MARS 6 (Microwave Accelerated Reaction System de CEM µWave, Orsay, France). Une fois l'échantillon refroidi, le minéralisat est repris dans une fiole jaugée avec de l'eau ultra pure (EUP) dont le volume est ajusté à 25 mL. Le liquide est ensuite filtré sur du papier filtre Whatman N° 40 ou Durieux N°111, puis récupéré et conservé dans des tubes en polypropylène (PP) résistants à l'acide (DigiTUBEs de SCP Science, Courtaboeuf, France). Les analyses des ETM sont réalisées par ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy) avec un iCAP 6300 DUO Radial associé à un passeur automatique CETAC ASX-520 de Thermo-Fischer SCIENTIFIC (Illkirch, France). Les longueurs d'ondes auxquelles sont analysés les éléments

étudiés sont les suivantes (en nm) : Cd (2265) et Sr (3464), Ce (4040), La (3794), Nd (3784) et Y (24222).

Deux indices d'accumulation des ETM dans les végétaux sont évalués dans cette étude. Les Facteurs de Bio Concentration (FBC) et de Translocation (FT); FBC étant la teneur en ETM dans les parties aériennes de la plante (mg/kg MS) rapportée à la teneur totale du mélange PG-Terreau ou la solution de culture (mg/kg MS) et FT, la teneur en ETM dans les parties aériennes (mg/kg MS) rapportée à celle dans les parties racinaires (mg/kg MS) (Brooks, 1998).

2.4 Structure de la communauté bactérienne par PCR-TTGE

La structure de la communauté bactérienne est réalisée par PCR-TTGE ciblant l'ARNr 16S.

2.4.1 Extraction d'ADN

En raison de la faible densité de micro-organismes dans les échantillons, une étape d'enrichissement est réalisée avant extraction de l'ADN. Les cultures sont réalisées en Erlen-meyers stériles de 25 mL contenant 10 mL de milieu CDM (milieu chimiquement défini) stérile (Muller et al., 2003) dans lequel est ajouté 0.5 g d'échantillons de sol, incubées à 23°C pendant 48 h, sous agitation à 130 rpm. Puis, l'ADN total est extrait à partir de 5,2 mL de culture après centrifugation pendant 1 min à 8000 rpm avec le Kit NucleoSpin® Soil (Macherey-Nagel, GmbH & Co, Germany) et en suivant les recommandations du fournisseur. La première étape du protocole d'extraction est réalisée avec le broyeur à billes MM400 (Retsch, Germany) pendant 1 min à 30 mvt/sec. L'élution finale est faite dans un volume de 50 µL. La quantité d'ADN extraite est dosée par fluorimétrie en utilisant le kit Qubit® 3.0 Fluorometer (Life Technologies®) et Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Life Technologies®) puis les échantillons sont stockés à -20 °C.

2.4.2 Analyse de l'ADNr 16S par Electrophorèse temporelle sur gel à gradient thermique (TTGE)

A partir des ADN génomiques extraits, les PCR sont réalisées avec le kit HOT FIREPol® DNA Polymerase (Solis BioDyne). La composition du mix réactionnel est la suivante pour un volume final de 100 µL : 10 µL Buffer 2 10X, 6 µL $MgCl_2$ (50 mM), 2 µL dNTPs (10 mM chaque), 2 µL Primer Forward (10 µM), 2 µL primer reverse (10 µM), 1 µL BSA (10 mg/mL), 2.5 unités de TaqDNApol, 30 ng d'ADN. Les amplifications sont réalisées sur le gène ARNr 16S bactérien. Le couple de primers utilisé est 1401F/968R-GC (Fleske et

al., 1998). Les amplifications sont réalisées dans un thermocycleur CFX96 (Bio-Rad) selon les conditions décrites par Cebron et al. (2005). Les produits de la PCR sont dosés par fluorométrie, Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Life Technologies®) et le Qubit® 3,0 Fluorometer (Life Technologies®). 250 ng de produit PCR sont déposés dans un gel d'électrophorèse à gradient temporel de température (TTGE) en utilisant le DCode systeme (Bio-Rad). La composition des gels ainsi que les conditions d'électrophorèses sont décrites par Cebron et al., (2005). Les gels sont colorés au GelRed™ (Biotium, United States) puis révélés sous UV (Molecular Imager® Gel Doc™ XR System, Bio-Rad and Image Lab™ Software). Les analyses des profils TTGE sont réalisées avec le logiciel FPQuest™ Software (Bio-Rad, United States). L'analyse de la structure de la communauté bactérienne est réalisée à partir des empreintes génétiques. Un test de Pearson est utilisé pour comparer les profils de TTGE et la Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) est utilisée pour créer un dendrogramme à partir des coefficients de similitude (Ibekwe et al., 2010).

2.4.3 Indice de diversité spécifique de Shannon-Weaver (H')

L'indice de Shannon est calculé en utilisant la formule suivante (Shannon and Weaver, 1949) :

$$H' = -\sum_{i=1}^{s} pi \ln pi$$

Avec : H' : indice de biodiversité de Shannon ; s : nombre total d'espèces (i.e., richesse spécifique (R) du milieu) ; *i* : espèce du milieu étudié ; *pi* : proportion d'une espèce *i* par rapport au nombre total d'espèces (s) dans le milieu d'étude. H 'est compris entre zéro et ln s.

2.5 Analyse Statistique

Les analyses statistiques des données environnementales et moléculaires ont été traitées avec le logiciel XLSTAT. La corrélation entre les ETM accumulés dans les différentes parties de chaque espèce végétale, la biodiversité bactérienne (indice de Shannon) et certains facteurs physico-chimiques des sols étudiés est analysée à l'aide d'une analyse en composantes principales (ACP) et le coefficient de corrélation de Pearson.avec un seuil de signification de $p < 0,05$ et $p < 0,01$.

3 Résultats et discussion

3.1 Caractéristiques du sol près des terrils de phosphogypse

Les concentrations en ETM étudiés (Cd, Sr et 4 TR : Ce, La, Nd, Y) dans les sols à proximité de la zone d'évacuation des PG dans les sites de Sfax et de M'dhilla et à la surface des sédiments dans la zone côtière du site de Gabès sont présentés dans le tableau 1. Les résultats montrent qu'à proximité de l'industrie du traitement des phosphates, les caractéristiques physico-chimiques des sols sont très différentes de celles du sol témoin. En effet, le pH du sol témoin varie de 7 à 8, ce qui est typique dans la région (Boukhris et al., 2015 ; Galfati et al., 2011), tandis que le pH des échantillons de PG sont faibles (environ 2,4). Cette acidité est très probablement due à la fraction résiduelle d'acides libres des PG - principalement l'acide phosphorique et, dans une moindre mesure, les acides fluorhydrique et sulfurique (Smith et Wrench, 1984) - et à la porosité spécifique du PG entraînant la fixation d'acides durant le processus de traitement (Kandil et al., 2017).

Bien que les sols collectés à proximité des terrils de PG aient des valeurs de pH légèrement supérieures, ils restent acides et assez proches de ceux du PG (Baize, 2000 ; Salminen et al., 2005). En outre, le phénomène de lessivage provoqué par les eaux pluviales pourrait être responsable des faibles pH enregistrés. Cette acidité globale constatée dans les zones étudiées augmente la biodisponibilité des ETM, puis le risque de contamination de l'environnement (Mendez et Maier, 2008, Pazand et Javanshir, 2014). Les sols présentent une humidité relativement élevée pour les trois sites. Les teneurs les plus élevés sont enregistrées à Gabès en raison de la proximité de la mer et les teneurs les plus bas à M'dhilla. Le PG a également une teneur en eau plus élevée que celle de la boue gypseuse après filtration (25-30%) (Kandil et al., 2017 ; Tayibi et al., 2009).

La teneur en SiO_2 varie entre 1,42 % dans le PG et 12,60 % dans les sédiments de Gabès. Cette concentration est très faible comparée à celle du sol témoin, i.e., supérieure à 73,03%. Les échantillons de PG contiennent également de petites quantités de P_2O_5 (0,71%), en accord avec Galfati et al. (2011) et Jalali et al. (2016). Ces concentrations sont plus élevées dans le golfe de Gabès (respectivement 7,41%, 22,38 et 24,15%). Au contraire, la teneur en P_2O_5 dans le sol témoin (e.g., à 12 km des terrils) est inférieure à la limite de quantification. Cela peut être dû aux poussières de phosphate provenant de l'usine d'acide phosphorique qui ont été dispersées par le vent et se sont déposées, en raison de leur densité élevée, à la surface du sol environnant les terrils (Galfati et al., 2011).

Tableau 1.1. Caractéristiques physico-chimiques des sols collectés à proximité des terrils de phosphogypse (PG) à Sfax, M'dhilla et Gabès par rapport aux PG de M'dhilla et aux sols « témoins » (collectées à 12 km des terrils de PG pour chaque site). Chaque valeur est la moyenne arithmétique ± écart type de n points d'échantillonnage (voir la section « Matériel et méthodes » et la figure supplémentaire F.1 pour plus de détails).

Paramètres	**Sfax n= 6**	**Mdhilla n= 7**	**Gabès n= 6**	**PG n= 2**	**sol témoin n= 3**	**Valeurs de PG Tunisien**	**Gamme valeurs courante sol Min-Max (médiane)**
			physico-chimiques (%)				
pH	2,75 ± 0,16	3,24 ± 0,75	3,86 ± 0,51	2,38 ± 0,02	7,63 ± 0,40	2,40 ± 0,02 [a]	ND
Humidité (%)	21,62 ± 9,73	17,50 ± 6,94	38,57 ± 2,87	21,30 ± 0,04	ND	13,20 ± 2,02 [a]	ND
							ND
P_2O_5 total (%)	7,42 ± 3,58	22,38 ± 18,37	24,15 ± 0,19	0,71 ± 0,01	< LOD	0,62 ± 0,07 [a]	ND
C Organique (%)	0,60 ± 0,69	0,41 ± 0,16	6,64 ±1,14	0,22 ± 0,05	4,71 ± 0,33	0,18 ± 0,07 [a]	ND
SO_4^{2-} (%)	43,31 ± 18,82	45,54 ± 7,24	45,89 ± 0,04	49, 87 ± 0,03	< LOD	49,87 ± 0,03 [a]	ND
Ca^{2+} (%)	23,83 ± 11,09	28,44 ± 3,29	27,34 ± 1,89	20,64 ± 0,93	15,13 ± 2,62	20,64 ± 0,93 [a]	ND
SiO_2 (%)	7,08 ± 5,29	8,09 ± 5,25	12,60 ± 0,31	1,42 ± 0,03	73,03 ± 16,78	1,42 ± 0,03 [a]	ND

Parametres	Sfax n= 6	Mdhilla n= 7	Gabès n= 6	PG n= 2	sol témoin n= 3	Valeurs de PG Tunisien	Gamme valeurs courante sol Min-Max (médiane)
Eléments traces métalliques (Min-Max) (mg/Kg MS)							
Cd (mg/kg)	8,90 ± 8,50	9,00 ± 7,50	88,60 ± 121,80	2,2 ± 0,60	< LOD	8,00 ± 0,03 [b]	0,05-0,45 (0,16) [c]
Sr (mg/kg)	698,00±370,00	648,30±126,10	528,20±67,30	685,10±37,20	53,31 ± 4,82	1238-1375 [b]	8-3120 (89,00)[d]
Ce (mg/kg)	12,10 ± 4,40	22,50 ± 6,80	112,50 ± 64,20	27,70 ± 1,20	5,12 ± 0,83	77,1-89,1 [b]	2,45-267 (48,2)[d]
La (mg/kg)	13,50 ± 4,50	22,10 ± 6,30	98,50 ± 52,80	30,20 ± 0,80	5,10 ± 0,55	50,1-59,3 [b]	1,10-143 (23,5)[d]
Nd (mg/kg)	13,70 ± 5,40	14,30 ± 5,90	95,20 ± 49,20	31,20 ± 0,70	2,61 ± 0,46	46,2-54,6 [b]	1,14-132 (20,8)[d]
Y (mg/kg)	13,30 ± 4,96	22,50 ± 4,80	87,30 ± 39,60	27,70 ± 0,60	2,78 ± 1,92	54,7-68,6 [b]	<3,0-267 (21,0)[d]

<LOD : inférieur à la limite de détection ; ND: non déterminé,
(a) Jalali et al,, 2016,
(b) Sfar-Falfoul et al,, 2005 (PG de différents âges),
(c) Geochemical background reported by ASPITET (Baize, 2000),
(d) Geochemical Atlas of Europe (Salminen et al,, 2005),

Les échantillons de sol du Sfax, M'dhilla et l'échantillon de PG sont caractérisés par de faibles teneurs en carbone organique (<1%), e.g., 10 et 22 fois plus faibles que pour le sol témoin. Au contraire, la teneur en carbone organique est élevée (6,64%) pour le site de Gabès. Cela est probablement dû au développement d'algues photosynthétiques qui colonisent les sédiments. Le tableau 3.1 montre également que les ions dominants sont le SO_4^{2-} et le Ca^{2+} dans les PG et les différents échantillons de sols des trois zones d'étude

Tous les échantillons de sol prélevés dans la zone de stockage de PG contiennent des concentrations relativement élevées en contaminants (Cd), certains éléments ayant une affinité chimique pour le Ca (par exemple, Sr et Y) (Pérez-López et al., 2007) et des TR. La composition du PG montre des teneurs totales généralement élevées en Ag, Au, Cd, Se, Sr, certains lanthanides et Y (Hammas-Nasri et al., 2016 ; Tayibi et al., 2009). Les concentrations moyennes en ETM sont beaucoup plus élevées dans les échantillons de sol et de sédiments de surface entourant les terrils de PG que celles dans le sol témoin (tableau 3.1). Les résultats montrent que les concentrations les plus élevées en ETM dans les échantillons de PG et de sols sont (par ordre décroissant d'abondance) : Sr > Ce ≈ La > Y ≈Nd > Cd. Des concentrations similaires ont été trouvées par Galfati et al. (2011), El Zrelli et al. (2015) et Zmemla et al. (2016) qui ont quantifié les ETM dans le sol près de la zone d'évacuation du PG, respectivement à Gafsa, à Gabès et à Sfax. Tous ces résultats ont mis en évidence que les valeurs de concentration les plus élevées observées dans l'échantillon de PG (en abondance) sont en ordre décroissant : Sr > Cs > Zn > Cu > Y > Ni > Ba > As > Cd.

Toutes les concentrations en ETM dans les trois zones d'études et dans le PG dépassent le fond géochimique du sol (tableau 3.1). Aux sites de Sfax, M'dhilla et Gabès, les concentrations moyennes de Cd et de Sr dépassaient les valeurs rapportées par l'ASPITET pour le sol français d'un facteur de 221 et de 7, respectivement. Ces données de fond géochimique sont utilisées comme référence en l'absence de données disponibles en Tunisie. Par conséquent, le cadmium peut être considéré comme l'élément polluant le plus critique dans les zones étudiées. La concentration la plus élevée de Cd est enregistrée sur le site de Gabès ; elle est d'environ 44 fois supérieure à celle du PG, ce qui correspond à la plage de valeurs rapportée par El Zrelli et al. (2015) dans les sédiments de surface du centre du golfe de Gabès (0,11 < Cd < 950 mg/kg).

Le PG tunisien subit des remontées capillaires importantes. À Sfax, les mesures de perméabilité sur le PG ont été effectuées par Zairi et Rouis (1999). Le coefficient de perméabilité était de 10^{-5} $m.s^{-1}$. Par conséquent, l'infiltration et la lixiviation des ETM sont possibles et les terrils de PG pourront affecter la zone environnante. La concentration totale en

ETM dans les échantillons de la zone d'étude montre un apport important au sol et aux sédiments provenant de l'évacuation de PG, ce qui peut être considéré comme un indicateur de la contamination des sols par les déchets des industries de phosphate. Ainsi, la pollution générée par les terrils de PG pourrait poser un problème environnemental d'impact sanitaire (Hentati et al., 2015). Par conséquent, la remédiation de ces sites est indispensable. Selon El Zrelli et al. (2015), Zmemla et al. (2016), l'industrie de transformation de phosphate « Groupe Chimique Tunisien » est l'une des principales sources d'émission des ETM contenus dans les PG, qualitativement et quantitativement les déchets industriels les plus dangereux parmi d'autres. Le transfert des ETM pourrait entraîner des perturbations des êtres vivants (faune, flore et l'homme) et des compartiments abiotiques des milieux (eau, sol, atmosphère) (Hentati et al., 2015 ; Saadaoui et Al., 2017).

La comparaison des teneurs en ETM a montré des différences significatives entre les trois sites, Toutefois, cette différence est non significative entre les deux sites de Sfax et de Gafsa. Dans les zones arides et semi-arides, le vent et l'érosion induisent la dispersion des déchets dans le milieu environnant (Munshower, 1994). Du fait, de la conductivité hydraulique élevée des PG (1×10^{-3} et 2×10^{-5} cm sec^{-1}), de la pluie et des lixiviats acides, l'eau peut facilement s'infiltrer à travers le terril de PG en transportant les ETM vers les sols environnants. En outre, les particules solides sont transportées par le vent à plusieurs altitudes autour du complexe industriel de Sfax (Al-Masri et al., 2004 ; Wali et al., 2014). Par conséquent, les ETM pourraient être transférés par les eaux de pluie du terril de PG vers les sols environnants ou les eaux de surface et souterraines (érosion ou dissolution).

Les concentrations les plus élevés en ETM ont été trouvées dans le site de Gabès, où est installé le port commercial ; il s'agit de la zone la plus polluée du Golfe. La contamination des sédiments de surface en ETM est la plus élevée au sud des usines d'engrais phosphatés, où les piliers du port empêchent le flux de PG de se diriger vers le nord. Par conséquent, la plupart des PG sont transportés par les courants littoraux vers la partie sud du golfe de Gabès (Rabaoui et al., 2014 ; El Zrelli et al., 2015). Les concentrations les plus élevées observées pour le Cd, Ce, La et Nd ont été observées dans les échantillons prélevés à Gabès, à l'intérieur de la zone portuaire. À Gabès, là où se trouve l'usine la plus ancienne, les sédiments sont affectés par une exposition sur le long terme par des ETM. Pour les sédiments de surface (site de Gabès), les analyses d'ETM ont mis en évidence deux sources possibles expliquant ces concentrations élevées en ETM : i) d'origine naturelle, par interaction eau-roche entre les eaux souterraines et les roches ; et ii) source anthropique, issue du rejet de PG. Agoubi et Gzam (2016) ont montré que le gypse et l'halite ont toujours tendance à se dissoudre dans les eaux

souterraines, avec un faciès chimique dominant le Na-Cl-Ca-SO_4-F du à l'interaction entre la roche/l'eau et le rejet du déchet de phosphate par l'industrie de transformation du phosphate.

3.2 Teneur en éléments traces métalliques dans les profils de sol

La figure 3.1 montre la distribution verticale des ETM des quatre profils de sol (jusqu'à 50 cm de profondeur autour des racines des plantes indigènes) de chaque site : de Sfax (SSP1 à SSP4) et de Gafsa (SMP1 à SMP4). Dans l'ensemble, les concentrations moyennes en ETM sont significativement plus élevées dans les horizons de surface et diminuent avec la profondeur. En particulier, la concentration en Cd a fortement diminué pour presque tous les profils de sol lorsque la profondeur du sol augmente, en raison de la grande mobilité de cet élément. Wali et al. (2014) ont montré des profils similaires dans les sols contaminés par les ETM, en particulier le Cu, le Pb et le Zn provenant de l'industrie des engrais phosphatés à Sfax : les quantités d'ETM diminuent progressivement avec l'augmentation de la profondeur du sol. Pour les autres ETM, sauf le Sr où les concentrations sont restées pratiquement les mêmes quelle que soit la profondeur du sol, les concentrations en ETM n'ont que peu diminué avec la profondeur du fait de la faible mobilité des terres rares (Aquino et al., 2009 ; Cao et al., 2000). En fonction de leur mobilité, Zmemla et al. (2016) ont classé les ETM contenus dans le PG en trois catégories : i) ceux à mobilité élevée (Sr, Zn), ii) à mobilité modérée (As, Ba, Cd, Cr) et à faible mobilité (Cu, Ni, Pb, Se, V, Y, Zr). Dans l'horizon de surface les concentrations en ETM varient fortement pour le même site : dans les sites de Sfax et de M'dhilla, en fonction de l'élément considéré. SMP2 et SMP3 ont présenté les profils les plus différents avec la plus forte diminution en ETM observée dans SMP3 le long du profil du sol, et le contraire pour SMP2.

Différentes explications sur la mobilité des terres rares ont été apportées dans la littérature. Sur la base d'expériences de précipitations artificielles, Liang et al. (2014) ont constaté que 92% des TR sont capables de migrer avec les particules de sol dans les eaux de ruissellement et que la migration de la forme soluble des TR ne représente qu'une infime partie. Cependant, Zhou et al. (2012) et Migaszewski et al. (2015) ont démontré que dans les horizons de surface, les TR sont immobiles et liés à la matière organique ou des adsorbants minéraux. De plus, le pH pourrait jouer un rôle important dans le contrôle de la mobilité des terres rares, ces derniers étant mobiles à pH bas (<3) (Migaszewski et al., 2015). Les phosphates de terres rares sont faiblement solubles et peuvent être mobilisés dans des conditions fortement acides (Cetiner et al., 2005 ; Nordstrom, 2011).

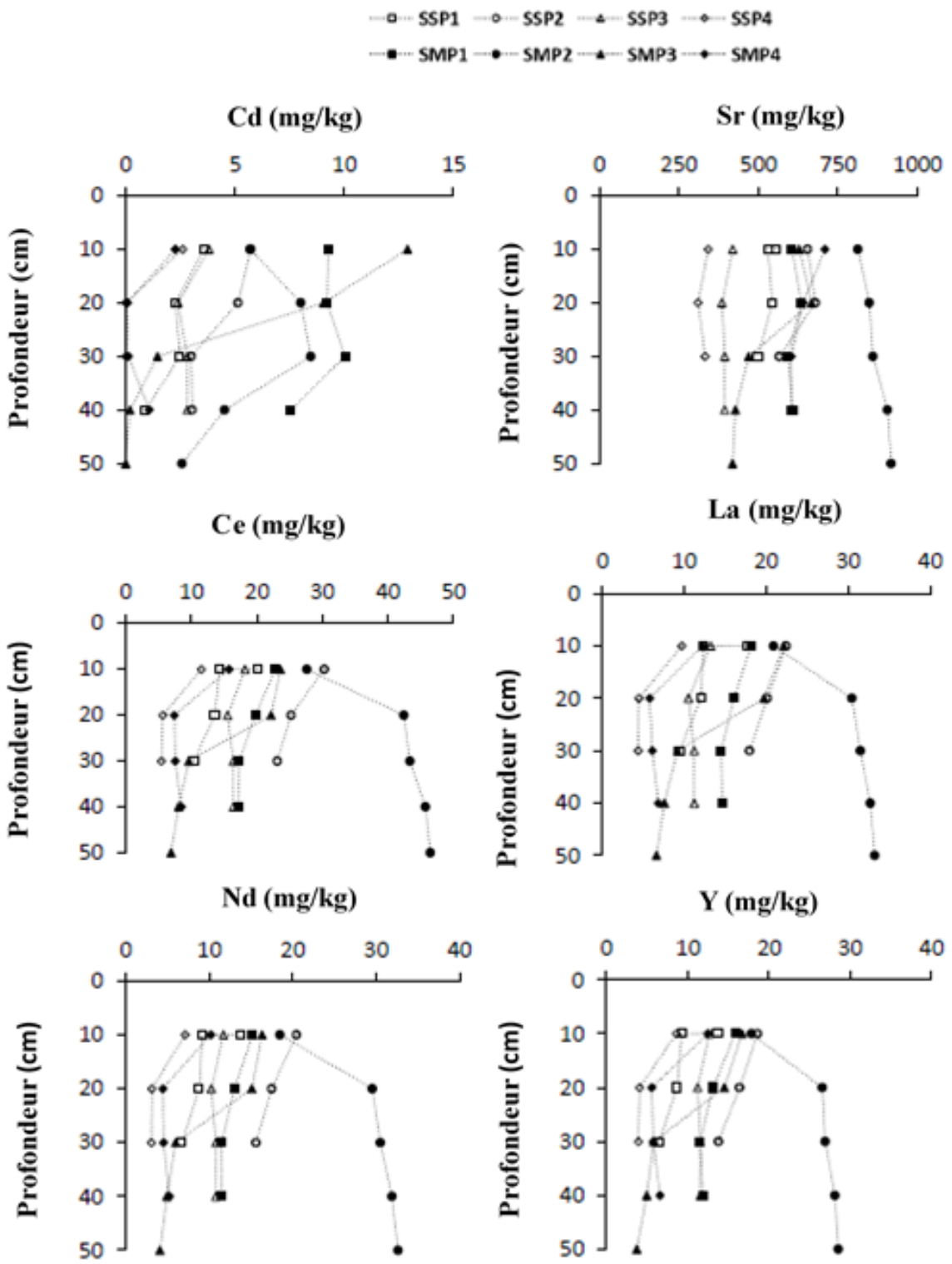


Fig. 3.1. Evolution de la distribution verticale des éléments traces métalliques (Cd, Ce, La, Nd, Y et Sr) près des zones de stockage des phosphogypse des sites de Sfax (SSP1 à SSP4) et M'dhilla (SMP1 à SMP4).

3.3 Spéciation chimique des éléments traces métalliques dans les échantillons de sols

Pour évaluer la spéciation chimique des ETM, leurs mobilités et leurs risques potentiels sur l'environnement, des extractions séquentielles de Cd, Sr, Ce, La, Nd et Y ont été réalisées dans les sols autour des terrils de PG des sites de M'dhilla et de Sfax. Dans l'horizon de surface (0-20 cm), les concentrations des fractions chimiques des ETM (F1, échangeables ; F2, liée au carbonate, F3, F4 réductible, fraction soluble dans l'acide) ont été tracées sur des diagrammes distincts pour chaque métal étudié (Fig. 3.2). Dans les sols de référence (SSC et SMC), tous les éléments traces sont partagés entre les différentes fractions de quantité relativement équivalente sauf l'Y, trouvé principalement dans la fraction F1. Le Cd est principalement associé à F2 avec un pourcentage de 84,85 % dans SMP3 et 94,28 % dans SSP4 et négligeable dans les fractions F1, F3 et F4 dans tous les échantillons de sol. Au contraire, Cd était dominant dans la fraction échangeable de PG (F1), soit 69,99%, indiquant sa plus grande mobilité par rapport aux autres métaux étudiés. La lixiviation des PG montre la capacité du Cd à se dissoudre et à contaminer l'environnement (Al-Masri et al., 2004).

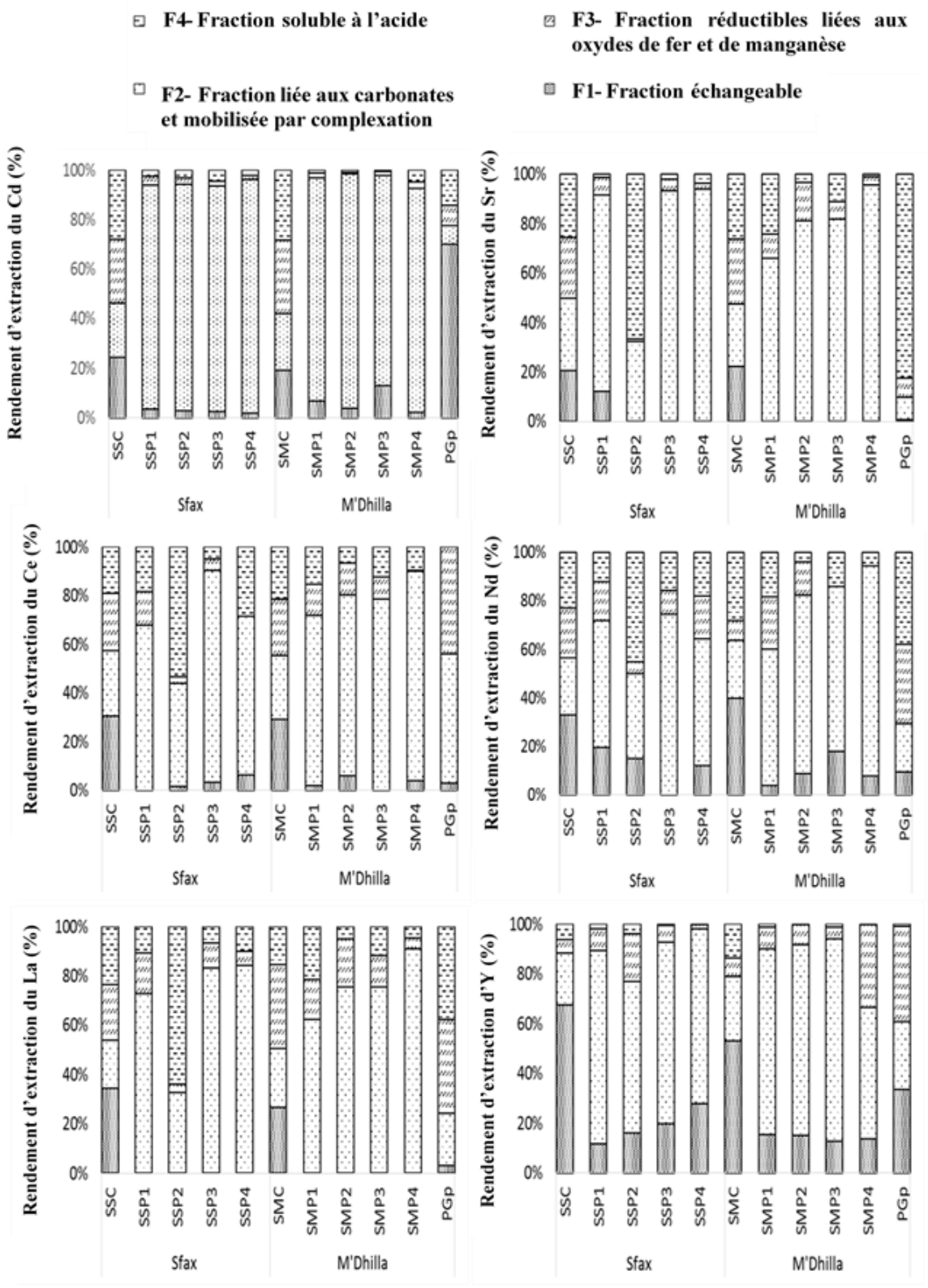


Figure 3.2. Schéma d'extraction séquentielle des element traces métalliques presents dans les échantillons de sol en utilisant une méthode nouvellement développée adaptée aux éléments sélectionnés (terres rares) (Mittermüller et al., 2016).

3.4 Teneur en éléments traces métalliques dans les végétaux

L'accumulation de Cd, Ce, Nd, La, Y et Sr dans les plantes spontanées poussant dans la zone industrielle de Sfax et Gafsa aux alentours des terrils de PG est évaluée. Chaque plante d'une espèce est comparée à la même sp. collectée sur les sites de référence. Les plantes collectées sur les sites d'étude sont non seulement tolérantes aux ETM, mais également dominantes et forment des couvertures différentes sur les deux sites. La végétation de la terre ferme est connue pour être très clairsemée, généralement nue et éparpillée, les arbres sont rares et les herbes n'apparaissent que pendant une très courte période de l'année, lorsque les conditions deviennent favorables (D'Odorico et al., 2007). En raison de la faible densité de végétation, seules huit espèces de plantes appartenant à quatre familles (Amaranthaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae et Zygophyllaceae) ont été étudiées. La spécificité de l'accumulation des ETM dépend en effet du genre et de la famille de la plante (Baker, 1981). Les espèces végétales les plus abondantes ont été ensuite collectées sur chaque site (tableau 3.2). La figure 3.3 montre les concentrations en ETM dans les parties aériennes (PA) et les racines (PR) de plantes récoltées dans les sites de M'dhilla et de Sfax. La concentration des ETM dans les parties aériennes (PA) et les racines (PR) varie d'une espèce végétale à l'autre et est plus élevée que celle dans les sols témoins (Galfati et al. 2011). Les concentrations en ETM dans les PA suivent l'ordre décroissante suivant (en mg/kg de matière sèche) : Sr pour *Z. album* (657,56) > Cd pour *Z. album* (14,20) > La pour *Z. album* (11,05) > Ce pour *C. canadensis* (1,11) > Nd pour *C. canadensis* (0,75) > Y pour *A. indicum* (0,72).

Des études précédentes ont montré que les sols contaminés par les ETM du sol augmentent les concentrations de métaux traces dans les végétaux (Kabata et Pendias, 1992 ; Nagajyoti et al., 2010 ; Tohidi et al., 2009). À la suite de la pollution du sol avec les ETM par les engrais phosphatés, il n'est pas surprenant que les plantes indigènes les accumulent. Les résultats montrent également que les teneurs en ETM varient entre les parties aériennes et les racines pour la même plante lorsqu'elle a poussé dans des sols contaminés (par rapport au sol de référence). *Z. album* a accumulé tous les éléments étudiés dans les parties aériennes (Cd, Ce, La, Nd, Sr et Y), *C. canadensis* en a accumulé quatre (Ce, La, Nd et Y). Dans les racines, *A. indicum* n'a accumulé que trois éléments (Ce, La, Y), *K. indica* a accumulé quatre éléments (Cd, Ce, La et Y), *S. mollis* a accumulé trois éléments (Ce, Y et Nd). Les résultats sont similaires à ceux rapportés par Galfati et al. (2011) pour *S. mollis* avec une faible concentration en Cd (maximum 2,83 mg/kg dans les feuilles) et une accumulation de Sr élevée pour *Z. album* (600 mg/kg dans les feuilles et 450 mg/kg dans les racines).

Table 3.2. Espèces végétales collectées à proximité des terrils de Sfax et de M'Dhilla.

Site	Nom scientifique	Famille	Nom commun
Sfax	*Kochia indica*	Chenopodiaceae	Kochia
	Suaeda mollis	Chenopodiaceae	*Suaeda friticosa*
	Chenopodium murale	Amaranthaceae	Salt-green
	Conyza canadensis	Asteraceae	Horseweed
M'dhilla	*Arthrocemum indicum*	Chenopodiaceae	-
	Atriplex halimus	Chenopodiaceae	Arroche halime
	Zygophyllum album	Zygophyllaceae	White bean-caper
	Bassia muricata	Chenopodiaceae	*Echinopsilon muricatus*

Le tableau 3.3 montre les facteurs de bioconcentration et de translocation des ETM (FBC et FT). Les végétaux sont considérés accumulateurs des ETM lorsque la valeur du FBC dépasse 1 (Sun et al., 2009). La valeur la plus élevée du FBC (1,60) est enregistré pour le Cd chez *K. indica*, faisant de cette plante un excellent candidat pour remédier les sols pollués par le Cd. De plus, *K. indica*, *Z. album*, *B. muricata* et *C. murale* ont les facteurs de bioconcentration en Cd les plus élevés. Le FT le plus élevé (6.12) est trouvée pour La dans *Z. album*. La réponse des plantes aux ETM dans le sol dépend de certains paramètres tels que leurs concentrations, leur biodisponibilité, les propriétés physico-chimiques du sol et les espèces végétales. Les environnements des deux sites sont similaires, compte tenu de la topographie et du climat. Au contraire, l'hétérogénéité des sols à l'échelle du site peut expliquer les différences d'accumulation de FT par les plantes, telles que rapportées par Kardanpour et al. (2015).

De manière similaire aux résultats de Baker (1981), différents degrés d'accumulation de métaux ont été relevés, ce qui démontre les différences entre les stratégies des plantes vis-à-vis de la toxicité potentielle des ETM. En effet, il existe deux stratégies de base pour les plantes - accumulatrices et exclusives - avec des mécanismes biologiques différents pour la tolérance et la détoxification des ETM. Certaines de ces plantes empêchent l'absorption de métal dans la rhizosphère ou son passage dans les parties aériennes, tandis que d'autres toléraient des niveaux extrêmement élevés de métaux dans les parties aériennes (hyperaccumulateurs) (Whiting et al., 2004). D'après Boyd et al. (2008), les plantes hyperaccumulatrices peuvent tolérer des concentrations des métaux jusqu'à 100 fois plus que les plantes classiques.

Les plantes hyperaccumulatrices peuvent accumuler plus de 100 mg/kg de Cd dans la matière sèche (Baker et Brooks, 1989). Par conséquent, aucune espèce de plante collectée dans cette étude n'est hyperaccumulatrice de Cd (max. 14,20 mg/Kg pour *Z. album*). Pour Wang et al. (2003), les plantes considérées comme hyperaccumulatrices des TR sont capables de concentrer plus de 1000 mg/kg de TR dans leurs PA et aucune des plantes étudiées n'a rempli ce critère. Cela est confirmé par le calcul de facteur de bioconcentration (FBC). Les valeurs obtenues pour les métaux étudiés sont inférieures à 1 pour toutes les plantes à l'exception du Cd dans le site de Sfax pour *K. indica* (1,60) et dans le site de Gafsa pour *Z. album* (1,05) ainsi que le Sr pour la même plante avec une valeur égale à 1,10. le facteur de translocation (FT) le plus élevé (6,12) est calculé pour *Z. album*.

Les plantes avec un FBC élevé et un FT faible présentent un potentiel de phytostabilisation. *S. mollis* a des concentrations en ETM plus élevées dans ses racines que dans ses parties aériennes. Dans *A. halimus* et *Bassia muricata*, les teneurs en Ce sont également plus élevées dans les racines que dans les PA. Des travaux antérieurs menés dans différentes laveries et près de l'usine de traitement d'acide phosphorique à Gafsa (Galfati et al., 2011) et à Sfax (Boukhris et al., 2015) ont montré qu'aucune des plantes métallifères analysées dans la zone d'étude n'est hyperaccumulatrice.

La comparaison des différentes plantes montre que *Z. album* à une capacité plus grande à accumuler les ETM et pourrait par conséquent être le candidat le plus approprié pour la phytoextraction des ETM (Fitz et Wenzel, 2002). La comparaison des différentes plantes montre que Z. album a une capacité plus grande à accumuler des ETM (Garcia et al., 2003, Lefevre et al., 2005, Galfati et al. 2011). *Z. album*, est un arbuste répandu dans les régions arides d'Afrique et les marais salants du sud de la Tunisie. Il domine la plupart des communautés végétales dans lesquelles il se développe. *Z. album* est très résistant à la sécheresse, pousse bien dans les terres arides et est très adaptable. Selon Munshower (1994), *Z. album* se développe normalement dans les zones minières et possède une bonne capacité d'enrichissement pour divers types de ETM. Cette plante est une des espèces les plus résistantes dans des sols très pauvres dans les écosystèmes très dégradés. Des travaux antérieurs ont montré que *Z. album* tolère des concentrations élevées en ETM grâce à son machinerie enzymatique *antioxydante* efficace et sa homéostasie des lipidiques membranaires importante. En plus, *Z. album* limite le stress aux ETM en augmentant ses activités enzymatiques antioxydantes (Morsy et al., 2012).

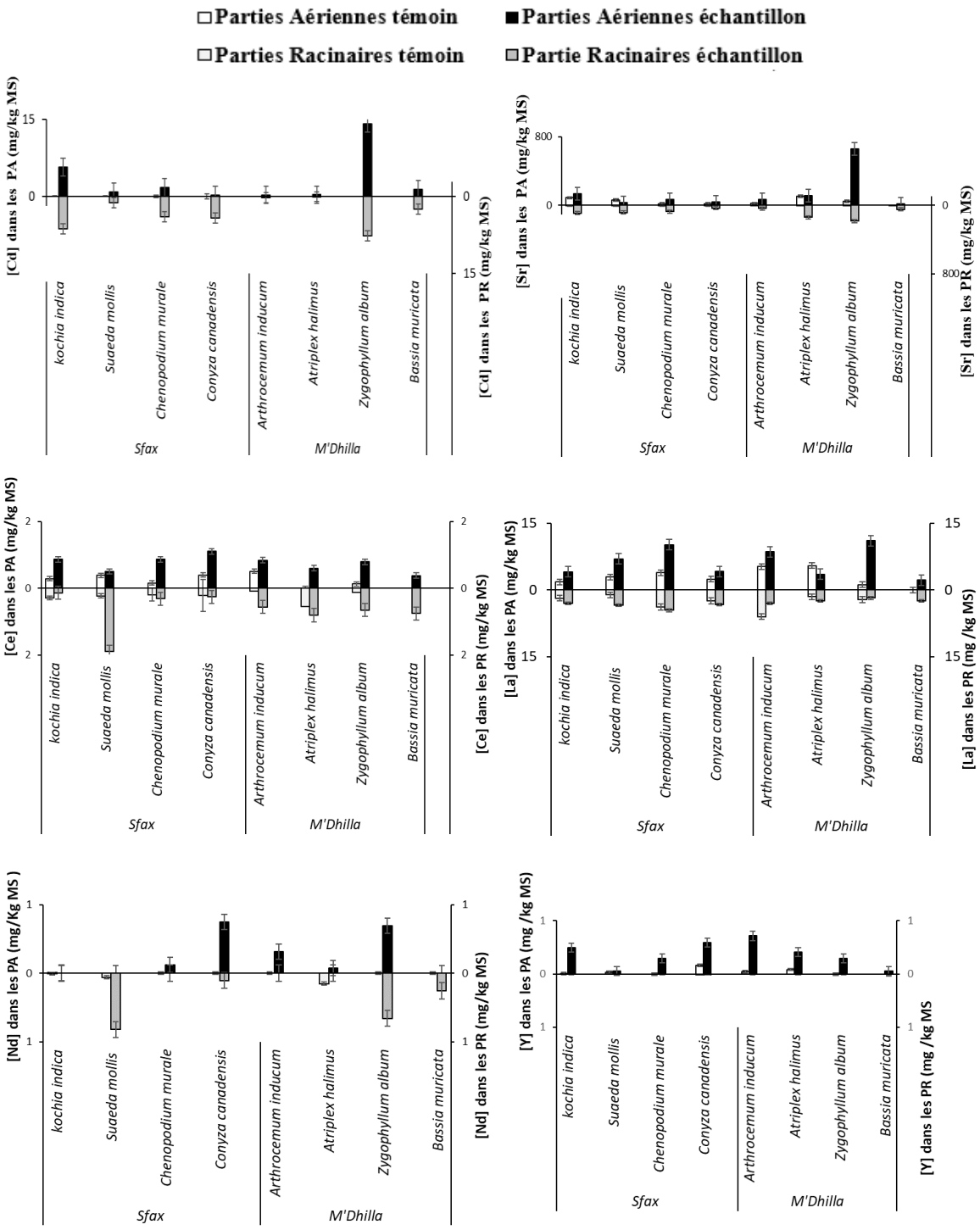


Figure 3.3. Concentration des éléments traces métalliques (ETM) en mg/Kg MS dans les parties aériennes (PA) et les parties racinaires (PR) de plantes récoltées dans les sites contaminés de M'dhilla et de Sfax et dans des sites témoins.

Tableau 3.3. Concentration des éléments traces métalliques (ETM) en mg/Kg MS dans les parties aériennes (PA) et les parties racinaires (PR) et calcul de Facteurs de Bioconcentration (FBC) et de Translocation (FT) de ces éléments dans les plantes collectées dans les sols contaminés des sites de Sfax (a) et Md'hilla (b) et les sites témoins.

(a)

Site de Sfax																				
Plante	***Kochia indica***					***Suaeda mollis***					***Chenopodium murale***					***Conyza canadensis***				
ETM (mg/kg)	**PA**	**PR**	**Sol**	**FT**	**FBC**	**PA**	**PR**	**Sol**	**FT**	**FBC**	**PA**	**PR**	**Sol**	**FT**	**FBC**	**PA**	**PR**	**Sol**	**FT**	**FBC**
Sol témoin																				
Cd	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ce	0.68±0.14	0.29±0 .06	4.19±0.014	2.36	0.16	0.39±0.17	0.22±0.06	6.72±0.02	1.75	0.06	0.16±0.19	0.19±0.05	4.190.01	0.86	0.04	0.40±0.19	0.21±0.37	5.43±0.1	1.93	0.07
La	3.00±0.18	1.82±0.10	5.54±0.07	1.65	0.54	7.00±0.29	1.10±0.08	6.66±0.06	6.38	1.05	3.86±0.43	4.57±0.08	5.54±0.10	0.84	0.70	2.44±0.43	2.43±0.14	4.39±0.10	1.01	0.56
Nd	0.00±0.25	0.01±0.63	2.10±0.24	*	0.00	*	0.06±0.65	3.52±0.09	*	*	*	*	2.10±0.02	*	*	*	*	3.08±0.02	*	*
Y	0.00±0.18	*	3.21±0.24	*	0.00	0.03±0.23	*	*	*	*	*	*	3.21±0.25	*	*	0.17±0.21	0.00±0.03	3.93±0.22	42.27	0.04
Sr	88.80±6.08	74.05±3.32	48.52±20.39	1.20	1.83	60.38±1.88	57.28±1.71	300.47±12.32	1.05	0.20	19.74±0.82	3.79±0.71	48.52±12.32	5.21	0.41	19.67±2.80	35.61±0.82	332.85±22.57	0.55	0.06
Sol contaminé																				
Cd	5.69±0.19	6.29±0.12	3.56±0.01	0.90	1.60	0.85±0.29	1.27±0.32	5.72±0.01	0.67	0.15	1.75±0.09	3.96±0.32	3.82±0.059	0.44	0.46	0.21±0.16	4.24±0.20	2.60±0.01	0.05	0.08
Ce	0.87±0.24	0.13±0.19	20.09±0.08	6.58	0.04	0.51±0.06	1.90±0.18	30.28±0.07	0.27	0.02	0.87±0.54	0.31±0.18	18.21±0.01	2.81	0.05	1.11±0.17	0.25±0.20	11.53±0.02	4.34	0.10
La	4.09±0.34	2.98±0.11	17.63±0.06	1.37	0.23	2.95±0.37	3.41±0.65	22.46±0.09	0.87	0.13	10.19±0.48	4.57±0.65	13.23±0.02	2.23	0.77	4.17±0.29	3.21±0.31	9.72±0.02	1.30	0.43
Nd	*	*	13.84±0.02	*	*	*	0.82±0.15	20.46±0.02	*	*	0.12±0.20	*	11.71±0.02	*	0.01	0.75±0.19	0.11±0.18	7.11±0.03	6.99	0.11
Y	0.50±0.14	0.19±0.24	13.69±0.02	2.66	0.04	0.06±0.27	1.07±0.15	18.59±0.02	0.06	0.00	0.29±0.20	*	12.66±0.02	*	0.02	0.59±0.19	0.04±0.18	8.61±0.03	16.50	0.07
Sr	135.04±4.07	90.21±2.95	555.24±10.46	1.82	0.24	33.10±1.10	83.27±3.31	654.69±14.79	0.40	0.05	68.89±2.89	71.50±3.31	419.81±13.67	0.96	0.16	41.60±0.88	32.29±3.76	342.45±24.26	1.29	0.12

(b)

Site de M'dhilla																				
Plante	***Arthrocemum indicum***					***Atriplex halimus***					***Zygophyllum album***					***Bassia muricata***				
ETM(mg/kg)	**PA**	**PR**	**Sol**	**FT**	**FBC**	**PA**	**PR**	**Sol**	**FT**	**FBC**	**PA**	**PR**	**Sol**	**FT**	**FBC**	**PA**	**PR**	**Sol**	**FT**	**FBC**
Sol témoin																				
Cd	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Ce	0.51±0.22	0.09±0.20	10.67±0.38	5.67	0.05	0.62±0.21	0.55±0.25	27.61±0.21	1.13	0.02	0.64±0.28	0.13±0.48	10.67±0.07	5.02	0.06	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
La	5.28±0.20	6.00±0.31	8.73±0.11	0.88	0.61	5.49±0.30	1.51±0.11	6.28±0.11	3.63	0.87	1.64±0.17	1.81±0.06	8.73±0.10	0.91	0.19	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Nd	*	*	5.85±0.03	*	*	*	0.15±0.38	2.87±0.03	*	*	*	*	5.85±0.03	*	*	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Y	0.05±0.09	*	7.55±0.11	*	0.01	0.08±0.11	*	3.24±0.06	*	0.03	*	*	7.55±0.09	*	*	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Sr	22.49±0.84	29.35±0.59	270.15±26.46	0.77	0.08	104.51±3.57	152.16±1.77	238.38±8.19	0.69	0.44	147.11±5.38	47.76±6.47	270.15±25.82	3.08	0.54	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Sol contaminé																Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Cd	0.29±0.08	0.26±0.12	12.90±0.05	1.12	*	0.31±0.32	0.07±0.35	5.69±0.10	4.28	0.05	14.20±0.28	7.67±0.22	9.26±0.046	1.85	1.53	1.41±0.28	2.46±0.22	2.27±0.10	0.57	0.62
Ce	0.84±0.66	0.56±0.11	23.61±0.41	1.50	0.04	0.61±0.88	0.80±0.04	27.61±0.32	0.75	0.02	0.80±0.17	0.65±0.05	22.81±0.28	1.22	0.03	0.39±0.15	0.75±0.06	15.74±0.24	0.51	0.02
La	8.58±0.66	2.94±0.11	22.15±0.41	2.92	0.39	3.58±0.88	2.41±0.04	20.92±0.32	1.48	0.17	11.05±0.17	1.81±0.05	18.17±0.28	6.12	0.61	2.22±0.15	2.44±0.06	12.25±0.24	0.91	0.18
Nd	0.31±0.57	*	16.32±0.03	*	0.02	0.08±0.55	*	18.47±0.03	*	0.00	0.69±0.27	0.66±0.25	15.21±0.03	1.04	0.05	*	0.26±0.42	10.19±0.02	*	*
Y	0.72±0.09	0.00±0.14	16.68±0.03	*	0.04	0.42±0.10	0.15±0.17	17.84±0.03	2.75	0.02	0.29±0.13	0.14±0.06	15.85±0.02	2.03	0.02	0.05±0.15	0.56±0.21	12.47±0.08	0.09	0.00
Sr	66.68±5.00	34.80±0.64	628.06±29.09	1.92	0.11	111.37±29.69	138.13±5.63	812.86±27.52	0.81	0.14	657.56±5.38	182.71±5.10	605.80±28.05	3.60	1.09	19.31±0.40	46.87±1.23	709.42±17.19	0.41	0.03

*< LOD: inférieur à la limite de détection
ND: non déterminé

3.5 Communautés bactériennes dans les sols aux alentours des terrils de PG

Les profils génétiques des communautés bactériennes ont été analysés par PCR-TTGE, en ciblant la région conservée d'ADNr 16S. Les analyses microbiologiques ont été rendues difficiles à cause des faibles quantités d'ADN extrait des différents échantillons, cela malgré l'essai de différents kit d'extraction et des conditions d'extraction. Aucun ADN (concentration inférieure à 0,2 ng/µL) n'a pu être extrait des échantillons de Sfax (sauf SSP1) et les faibles concentrations obtenues pour les autres échantillons retenus nous ont conduit à réaliser une étape d'enrichissement préalablement à l'extraction d'ADN, tout en vérifiant que cette étape d'enrichissement ne modifie pas la structure de la communauté bactérienne. L'ADN n'est extrait que pour 10 échantillons sur 16 et les profils TTGE sont présentés pour ces 10 échantillons (Fig. 3.4a). Dans l'ensemble, la présence d'une communauté bactérienne est observée dans ces sols. La faible taille de la structure de la communauté bactérienne (faible nombre de bandes) peut être liée aux caractéristiques particulières des sites d'étude proches des terrils de PG. En effet, les résidus miniers sont connus pour héberger une communauté microbienne hétérotrophe stressée et un petit nombre de microorganismes deusol (Mendez et Maier, 2008).

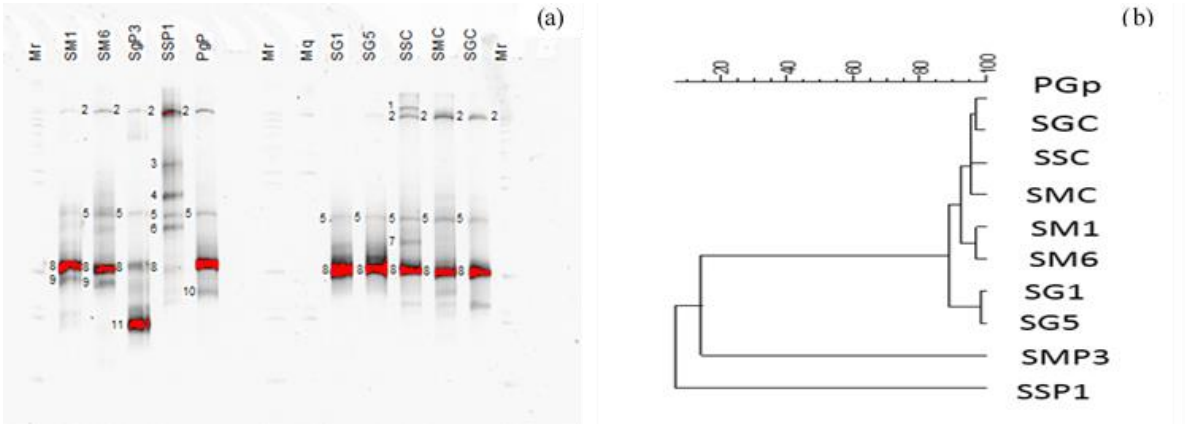


Figure 3.4. Analyse PCR-TTGE (Electrophorèse temporelle sur gel à gradient thermique) de l'ARNr 16S (a) et pourcentage de similarité (b) entre les structures de communautés bactériennes des sols collectés: échantillons de sol SM1, SM6 et SMP3 du site de M'dhilla; SSP1 échantillon de sol du site de Sfax; Échantillons de sédiments SG1 et SG5 du site de Gabès; PGp: échantillon de phospohgypse prélevé au pied du terril de M'dhilla; SSC, SMC et SGC les sols témoins des sites de Sfax, M'dhilla et Gabès respectivement, et M. Mq marqueur de taille.

Islam et Sar (2011) ont prouvé l'effet de la contamination minière par l'uranium sur la réduction de la diversité bactérienne des sols et l'abondance des groupes bactériens spécifiques. Pourtant, il est démontré (ADEME, 2017) que la diversité bactérienne est plus faible dans des forêts de vignobles, cependant fortement soumis aux pesticides avec des terres consacrées à la viticulture ne représentant que 1,6 % de la superficie agricole totale en France, les pesticides utilisés dans ces pratiques représentent environ 20% du total des pesticides commercialisés (Agreste, 2006). Quelques rares populations dominantes sont supposées bien s'établir dans les sols soumis à un faible stress abiotique, tandis que les populations minoritaires peuvent également se développer dans des sols soumis à des facteurs de stress, ce qui se traduit par une diversité microbienne plus importante. Le gel TTGE (Fig. 3.4a) a montré des bandes communes à plusieurs échantillons (désigné par le même numéro sur le gel). Ces bandes sont parfois communes aux sols collectés dans les mêmes sites, par exemple la bande 9 qui désigne une ou plusieurs espèces présentes dans les sols du site de M'dhilla. D'autres bandes sont communes à différents sites, par exemple les bandes 5 et 8 qui sont présentes dans tous les sols collectés.

Les pourcentages de similarité entre les structures de communautés bactériennes (Fig. 3.4b) permettent de regrouper les sols collectés par type d'échantillons, par exemple, SG1 et SG5 (site de Gabès), SM1 et SM6 (site de M'dhilla), les sols témoins (SSC, SMC et SGC) avec une similarité supérieure à 90%. Au contraire, la structure de la communauté bactérienne des échantillons de SGP3 et de SSP1 est à la fois très différente l'une de l'autre et vis-à-vis d'autres échantillons. Ces échantillons ont été prélevés sur deux sites différents, respectivement M'dhilla et Sfax, mais les deux dans la rhizosphère de deux plantes, respectivement *Z. album* et *K. indica*. On peut conclure que les plantes ont un effet sur la structure bactérienne qui n'est pas surprenant en raison des rhizodépôts produits par les plantes, comme cela est largement décrit dans la littérature (Finkel et al., 2017 et Garbeva et al., 2004). Parmi les quatre échantillons (SS1, SS3, SS5 et SSP1) collectés autour des stocks de PG du site de Sfax, SSP1 est le seul qui a montré des bandes d'ADN.

Les impacts du PG en tant qu'amendements sur le biote du sol n'ont jamais été testés. Seuls Nayak et al. (2011) ont constaté qu'un amendement contenant 10 mg/ha de PG avait un effet positif sur la croissance microbienne (fongique et bactérienne) et sur les activités cellulase et amylase dans les sols agricoles. La structure spécifique de la communauté bactérienne peut être due pour certains sols aux fortes concentrations en ETM. Des changements significatifs dans la

communauté microbienne est mis en évidence en réponse au stress métallique (voir Fig. 3.4b et Tableau 3.1): i) La communauté bactérienne spécifique dans les échantillons de SG1 et SG5 pourrait être liée à la concentration élevée de Cd (62,1 et 81,2 mg/kg), respectivement contre 3,56 à 26,90 mg/kg pour d'autres échantillons de sol); ii) En ce qui concerne les échantillons de SSP1 et de SGP3, une diversité bactérienne élevée dans le sol est remarqué malgré les niveaux élevés de Sr (555,24 et 635,6 mg/kg), contre 284,9 à 552,6 mg/kg pour d'autres échantillons de sol. Par conséquent, on peut supposer que la rhizodéposition de la plante a eu un effet bénéfique et plus important sur la diversité bactérienne que l'effet délétère potentiel du Sr. Dans ces situations, cela suggère également la présence de bactéries tolérantes au Cd ou au Sr. Ce, La, Nd et Y sont trouvés dans différents sols à des concentrations inférieures à celles du Cd et du Sr, sans qu'il soit possible dans cette étude d'évaluer leur contribution dans la structure de la communauté bactérienne, bien que les concentrations en TR soient plus élevées dans les sols contaminés que dans les sols des références non contaminés. Dans de tels environnements, c'est-à-dire des sols contaminés avec du PG, les bactéries risquent d'être affectées en termes d'activité, de physiologie et de diversité, avec le développement potentiel d'espèces tolérantes pouvant s'adapter en raison de leurs caractéristiques génétiques (Giller et al., 1998).

Les sédiments SG1 et SG5, caractérisés par une salinité élevée, pourraient fournir les informations sur la présence d'une flore bactérienne halotolérante. Il est démontré que les bactéries halophiles ont un potentiel important dans la détoxification des polluants métalliques (Zhuang et al., 2010). Finalement, le gel TTGE a montré que la communauté bactérienne des sols de référence présente une grande similitude avec les autres sols, ce qui montre que le dépôt du PG n'a pas eu une grande influence sur la structure de la communauté bactérienne de ces sols.

Une analyse en composantes principales (ACP) est réalisée pour identifier les facteurs qui affectent la communauté bactérienne (Fig. 3.5). Les deux premières composantes principales expliquent 83,14% de la variabilité des données. Une analyse de corrélation de Pearson est utilisée pour examiner les relations entre la structure de la communauté bactérienne et la composition physico-chimique des échantillons de sol. La distribution spatiale des sols PGp, SM1, SM6 est proche de l'intersection des deux axes, ce qui prouve que la variation entre ces échantillons n'est pas influencée par les paramètres analysés. Les sols témoins (SSC, SMC, SGC) sont rassemblés et différents des autres sols. Leurs structures bactériennes sont expliquées par la teneur en SiO_2 et en C organique, et par le pH. La communauté bactérienne spécifique dans

L'échantillon SG1 pourrait être lié à la concentration élevée de Cd, Ce, La et Y. Des corrélations significatives et négatives ont été observées entre le pH et certains éléments (CaO, Sr, $SO4^{2-}$, P_2O_5). Ce, La, Y. L'indice de Shanon est important dans le sol de référence, en raison des faibles quantités d'ETM et de leur faible disponibilité (voir section 3.3.). Les valeurs de l'indice de Shannon (tableau 3.4) sont corrélées de manière significative et négative à certains ETM : Cd, Ce, La, Y.

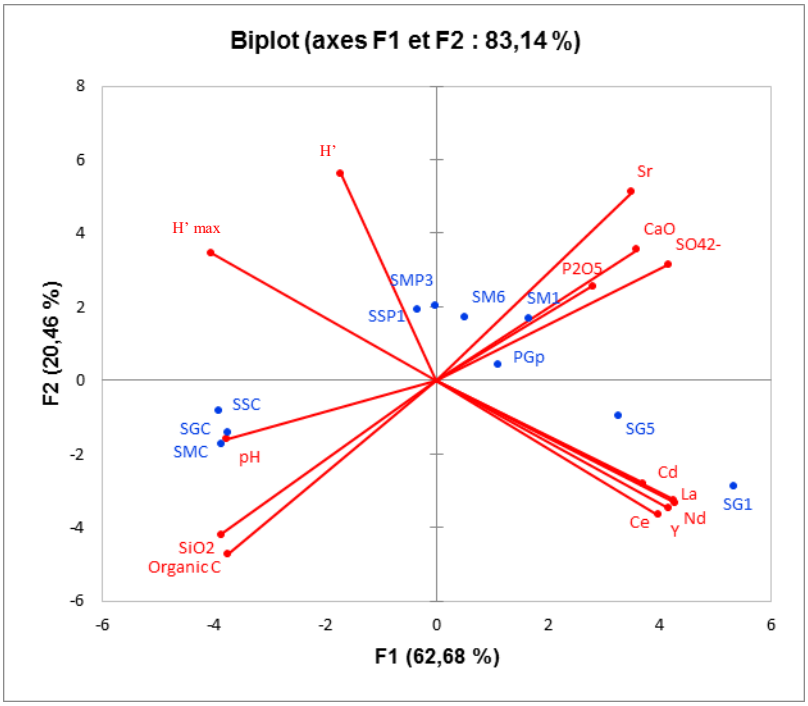


Figure 3.5. Biplot d'analyse en composantes principales (ACP) montrant les relations entre la structure de la communauté bactérienne (indice de Shannon) et la composition physico-chimique des échantillons de sol. Échantillons de sol SM1, SM6 et SMP3 du site de M'dhilla; SSP1 échantillon de sol du site de Sfax; Échantillons de sédiments SG1 et SG5 du site de Gabès; PGp: échantillon de phospohgypse prélevé au pied du terril de PG à M'dhilla; SSC, SMC et SGC les sols témoins de Sfax, M'dhilla et Gabès; H ': indice de Shannon; H'max: indice de Shannon maximal.

Tableau 3.4. Calcul de l'indice de diversité microbienne de Shannon (H ') des échantillons de sol collectés : SM1, SM6 et SMP3 : échantillons de sol de M'dhilla ; SSP1 : échantillons de sol de Sfax et SGB5 et SG5 : échantillons de sédiments de Gabès, CPS, CSP et SGC : échantillons témoins ; PGb : échantillon de phospohgypse prélevé au pied du terril de M'dhilla.

Origine	**M'dhilla (Sol)**					**Sfax (Sol)**		**Gabès (Sediment)**		
Echantillon	**SM1**	**SM6**	**SMP3**	**SMC**	**PGb**	**SSP1**	**SSC**	**SG1**	**SG5**	**SGC**
H'	1.14	1.62	2.13	1.17	1.13	2.38	1.68	0.80	1.16	1.37
***H'*max**	2.32	2.58	2.58	2.58	2.00	2.58	2.80	1.58	2.00	2.58

4 Conclusion

La présente étude est la première investigation sur les ETM, y compris les terres rares (Cd, Sr, Ce, La, Y), la communauté bactérienne et les espèces de plantes spontanées poussant dans les sols et les sédiments de la zone industrielle à proximité des terrils de PG en Tunisie. Par rapport au fond géochimique et en raison du pH bas, la restauration de ces sites est nécessaire. Les présents résultats ont permis de sélectionner deux espèces de plantes sauvages tolérantes aux ETM, à savoir *Zygophylum album* et *Kochia indica*, en tant qu'espèces arbustives potentiellement efficaces pour la phytoremédiation *in situ* du Cd et du Sr. Les analyses microbiologiques ont montré que, dans un sol contaminé avec du PG, les bactéries sont affectées en termes de diversité avec le développement potentiel d'espèces tolérantes. La structure de la communauté bactérienne est plus affectée par les plantes (effet de la rhizosphère) que par les ETM. Les informations obtenues dans le cadre de cette étude peuvent fournir des informations sur l'utilisation de plantes spontanées pour dépolluer des sites contaminés par des métaux. Néanmoins, il conviendrait de poursuivre les recherches pour mieux comprendre le rôle potentiel des végétaux spontanés trouvés dans les zones arides étudiées mais aussi les interactions entre bactéries et plantes.

CHAPITRE 2 : Screening rapides d'isolats bactériens pour la mobilisation d'éléments traces par bioaugmentation de phosphogypses

Jihen Jalali[a,b,d], Pierre Gaudin[a], Hervé Capiaux[a,c], Mohamed Neji Saidi[d], Emna Ammar[b], Thierry Lebeau[a*]

[a]Laboratory of Planetology and Geodynamics of Nantes, UMR 6112 CNRS, Faculty of Sciences and Technology of Nantes, BP 92208, 44322 Nantes Cedex 3, France

[b]Research Unit Coastal and Urban Environments, University of Sfax, National Engineering School of Sfax, BP 1173, 3038 Sfax, Tunisia

[c] Platform for molecular analysis of biodiversity-environnement, IUT Génie Biologique, 85035 La Roche sur Yon, France

[d]Tunisian Chemical Group, M'dhilla-Gafsa factory, B.P. 215, 2100 Gafsa, Tunisia

Résumé

Cette étude a pour objectif d'identifier des bactéries indigènes issues de prélèvement de sols aux alentours des sites de stockages des phosphogypses (PG) pour leurs propriétés intéressantes pour la phytoextraction telles que la capacité à mobiliser les éléments traces métalliques (MTE) (la production de sidérophores dont la pyoverdine) et/ou leurs propriétés PGPR (production d'AIA et dégradation d'ACC desaminase). Des tests biochimiques miniaturisés, réalisés en microplaques, sont basés sur ces critères. Les résultats montrent que l'ajout d'un mélange d'ETM (Cd, Sr, Ce, La, Nd et Y) a eu un effet inhibiteur global sur la dégradation d'ACC et sur la croissance des bactéries cultivées avec un milieu de culture enrichie avec l'extrait de PG, alors que les productions spécifiques de sidérophores, dont la pyoverdine, et d'AIA semblent avoir été stimulées en présence des ETM. Des statistiques descriptives sont faites sur les résultats numériques ont permis de sélectionner deux isolats les plus efficaces qui ont été identifiées les 2 appartenant à l'espèce *Bacillus cereus*.

Afin de valider la méthode de sélection, ces deux isolats ont servi à la bioaugmentation d'un mélange PG-Terreau. Les résultats révèlent que ces deux bactéries n'ont pas démontré d'effet évident sur la mobilisation des ETM étudiés, sauf sur le Cd.

Mots clés : Phosphogypse, Bioaugmentation, Phytoextraction, PGPR, Sidérophores.

1 Introduction

Les industries des engrais phosphatés posent un problème sérieux de pollution de l'environnement dû aux émissions gazeuses, aux déchets solides et aux effluents liquides souillant le sol et le milieu aquatique (Hentati et al., 2015 ; Saadaoui et al., 2017). Les phosphogypses (PG) sont les déchets solides majeurs de la production d'acide phosphorique. Les déchets de PG représentent 200 à 250 Mt/ année dans le monde. En Tunisie, la production annuelle de PG est estimée actuellement à 10 Mt (Tayibi et al., 2009). A l'échelle industrielle, les PG sont soit stockés sur les sites mêmes (terril), soit évacués en mer (Tayibi et al., 2009). Ils contiennent des teneurs importantes en éléments traces métalliques (ETM), incluant les terres rares (TR) qui représentent un problème environnemental et en même temps une ressource potentiellement valorisable (Eawag, 2013 ; Hammas et al., 2006). Différentes tentatives de traitement et de valorisation des PG par des voies physiques et chimiques ont été développées dans les principaux domaines de l'agriculture (Papastefanou et al., 2006, Prochnow et al., 2016 ; Nascimento et al., 2017), l'industrie chimique et le génie civil (Ajam et al., 2009, Islam et al., 2017). Toutefois, la valorisation des PG ne concerne qu'une modeste proportion des quantités produites : 15 % du PG produit dans le monde (Tayibi et al., 2009). En Tunisie, la valorisation est quasiment absente. Une nouvelle technique en émergence, la rhizoremédiation, qui associe la bioaugmentation (ajout de microorganismes au sol) et la phytoextraction (capacité de certains végétaux à accumuler les ETM dans leurs parties aériennes) peut constituer une alternative intéressante aux procédés conventionnels, avec une solution peu coûteuse et écologique. L'utilisation de bactéries capables de mobiliser les ETM et/ou de stimuler le développement de la plante, peut permettre d'augmenter la quantité des ETM extrait par cette dernière et par conséquent l'efficacité de la phytoextraction (Lebeau et al., 2008 ; Stefanescu., 2014 ; Dorjeyet al., 2017). Les microorganismes employés peuvent être issus de sélections réalisées à partir d'échantillons environnementaux (Bois et al., 2011). Ils sont ensuite cultivés et inoculés dans leur environnement d'origine ou dans un autre environnement, Lebeau et al., (2008) ont montré dans leur revue que la quantité de métaux extraits par la plante augmentait d'un facteur 2 à 5. Parmi les microorganismes, les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) également appelées rhizobactéries jouent un rôle important dans la stimulation de la croissance des plantes et de leur tolérance aux stress abiotiques (Dimkpa et al., 2009). Elles possèdent la capacité d'augmenter à la

fois la biomasse de la plante et/ou de mobiliser les métaux du sol. La stimulation de la biomasse végétale s'explique par i) la production des phytohormones telles que l'acide indole acétique (AIA) (Patten, Glick 2002). Une faible concentration d'AIA dans la rhizosphère stimule l'élongation des racines primaires (chez les jeunes pousses) alors que des fortes concentrations l'inhibe mais favorise celle des racines latérales et adventives (Xie et al., 1996) ; ii) la production des enzymes tel que la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase. De nombreuses PGPR peuvent cliver l'ACC produit par les plantes, précurseur de l'éthylène, une phytohormone impliquée dans la modulation de la croissance et du métabolisme cellulaires chez les végétaux (Ping et Boland., 2004) et, ce faisant, permet de réduire la teneur en éthylène chez les plantes en développement ou soumises à un stress, par exemple celui lié aux ETM (Belimov et al., 2005). En moyenne le taux d'ACC et d'éthylène est divisé par un facteur 2 à 4 grâce aux PGPR (Belimov et al., 2005).

La modification de la mobilité des métaux du sol s'explique par la production de métabolites microbiens tels que les sidérophores, de petites molécules de poids moléculaire entre 150 et 2000 Da, connues pour leur très forte affinité pour le fer (Khan et al., 2018). Elles sont produites par divers microorganismes lors de carence en fer (<10 µM : (Díaz de Villegas et al., 2002 ; Braud et al., 2009) dans le but de solubiliser et d'acquérir ce métal indispensable mais peu biodisponible. Les racines peuvent alors incorporer le fer des complexes sidérophores bactériens-fer par des mécanismes de dégradation du chélateur s'accompagnant de la libération du fer ou d'incorporation directe de ces complexes (Rajkumar et al., 2010). Les sidérophores, telle que la pyoverdine et la pyochéline peuvent aussi complexer d'autres métaux, tels que le Cu, Ni (Braud et al., 2009). Une étude récente de Trifi et al. (2017) a montré que *Pantoea* sp. *BRM17,* bactérie isolée de PG tunisien produit des sidéropohres, de l'AIA ainsi que de l'ACC désaminase. Son ajout à un sol amendé avec 2 % de PG a permis l'augmentation de la biomasse des tiges et des racines de *Brassica napus* cultivée.

Le choix de l'association plante-micro-organisme doit être pertinent (survie de l'inoculum microbien et capacité à augmenter la mobilité des métaux voire le développement de la plante, plante tolérante et capable d'extraire le métal considéré) (Lebeau et al., 2008). L'utilisation de méthodes pour la sélection de bactéries spécifiquement pour des applications en bioaugmentation-phytoextraction est quasi inexistante (Braud et al., 2015) et aucune étude n'a à ce jour été consacrée aux terres rares pour des applications en phytomine.

Cette étude a pour objectif la sélection de bactéries indigènes dans des sols aux alentours des sites de stockages des PG en Tunisie. Les souches isolées ont été présélectionnées sur la base de tests miniaturisés en microplaques et basés sur les critères suivants : i) capacité des souches à tolérer les ETM sélectionnés incluant des terres rares (Ce, La, Y), ii) capacité à mobiliser les ETM sélectionnés grâce aux sidérophores (dont la pyoverdine), iii) Capacité à stimuler la croissance des plantes grâce à la production d'AIA et d'ACC. Un essai de bioaugmentation de PG a été réalisé pour valider la méthode de sélection.

2 Matériel et méthodes

2.1 Isolement des bactéries cultivables

32 isolats bactériens ont été obtenus à partir de 9 sols collectés aléatoirement à différentes distances aux alentours des terrils des PG en Tunisie dans la région de Sfax (34°10' North 10° 43'East) et Md'hilla (34°10' North 8°45' East) et de 6 sédiments marins à Gabès (33° 54' North 10° 06' East) collectés sur la plage au sud du port de commerce de Ghannouche, lieu de déversement des PG.

Des dilutions décimales ont été réalisées à partir d'une suspension mère contenant 25 g de sol/sédiment et 225 mL d'eau peptonée à 10 g/L. La suspension est agitée pendant 30 min à 30 °C et 250 tpm puis les dilutions (10-1 à 10-6) sont réalisées. 1 mL de chaque dilution est étalé sur milieu PCA (Plat Counting Agar) (Guiraud., 1998). Les boites sont ensemencées en masse de façon à permettre un développement bactérien en surface et en profondeur. Les boites de Petri sont incubées à 28 °C pendant 48 heures. Ensuite, les colonies morphologiquement différentes sont isolées et purifiées (plusieurs repiquages successifs).

Les isolats sont cultivés sur un milieu TSB (Tryptic Soy Broth) dilué au demi (TSB 1/2) et incubées 24h à 28°C à 200 tpm. Après 24 heures, les suspensions sont stockées dans des cryotubes a -80 °C dans 20% (v/v) de glycérol.

2.2 Tests biochimiques pour la sélection des souches

2.2.1 Mise au point des tests de sélections en microplaque

Les différents tests sont réalisés dans des microplaques stériles contenant des milieux spécifiques à chaque test. Pour tous les tests, les isolats bactériens sont pré-cultivés pendant 24 h dans le milieu TSB 1/2 à 28 °C et 200 tpm. Ils sont ensuite repiqués dans le milieu minimum liquide (MLM) (Ştefănescu et al., 2011). Ensuite les cellules bactériennes sont

lavées 2 fois dans du NaCl 9 g/L, centrifugées puis reprises dans du NaCl 9 g/L pour ajuster la densité optique (DO) à 620 nm à 0.1. Pour tous les tests, la croissance bactérienne est mesurée par DO après 48 h de culture à 28 °C et à 200 tpm, à l'aide d'un lecteur de microplaques (Multiskan FC, Thermo Fisher, Illkirsch, France). 25 µL de ces suspensions bactériennes sont ensuite prélevés et inoculés en microplaque, dans le milieu de culture choisi pour chacun des tests. Tous les tests et les blancs sont réalisés en quadriplicats pour chaque isolat bactérien.

2.2.2 Tolérance et mobilisation des éléments traces métalliques

Un milieu à l'extrait de PG a été réalisé selon la méthode décrite par Braud et al. (2015) pour l'extrait de terre et adapté au PG selon l'objectif de l'expérience. Le PG étudié provient du terril de stockage de M'dhilla (N 34°18.5097 E 8°46.3766). Les caractéristiques physico-chimiques de PG sont présentées dans le Tableau 4.1.

Tableau 4.1. Caractéristiques physico-chimiques des phosphogypses (PG).

Paramètre	Moyenne ± SD
pH	2.38 ± 0.02
Humidité (%)	21.30 ± 0.04
P_2O_5 total (%)	0.71 ± 0.01
C Organique (%)	0.22 ± 0.05
SO_4^{2-} (%)	49. 87 ± 0.03
Ca^{2+} (%)	20.64 ± 0.93
SiO_2 (%)	1.42 ± 0.03
Cd (mg/Kg)	2.2 ± 0.60
Sr (mg/Kg)	685.10 ± 37.20
Ce (mg/Kg)	27.70 ± 1.20
La (mg/Kg)	30.20 ± 0.80
Nd (mg/Kg)	31.20 ± 0.70
Y (mg/Kg)	27.70 ± 0.60

Une suspension de PG dans du milieu MLM (10:1 m/v) est autoclavée à 120°C pendant 20 min. Le liquide obtenu est filtré à chaud dès la sortie de l'autoclave (filtre sans cendre en papier Durieux N°113, puis filtre en fibre de verre 698 de 0,7 µm de taille de pore). Le filtrat est récupéré et le pH mesuré. Deux solutions filles sont ensuite préparées par dilution au 1/2 et au 1/10ème avec du MLM de la solution mère. Les solutions sont stérilisées par filtration sur une membrane d'acétate de cellulose (0, 22 µm de taille de pore).

Les 32 isolats bactériens pré cultivées dans du TSB 1/2 sont adaptés le jour suivant au milieu MLM. Les cellules sont récupérées et lavées 1 fois dans du NaCl 9 g/l stérile puis reprises dans un volume déterminé de NaCl 9 g/l pour obtenir une DO à 620 nm de 1,2. Chaque puits de la microplaque (96 puits) est ensuite rempli avec 250 µl de l'extrait de PG (dilué au 1/2 ou au 1/10) et 50 µl de suspension bactérienne (DO de 0.1). Chaque dilution est testée à pH de l'extrait de PG et à pH ajusté à 6, en début de culture, avec du NaOH 2M et du Na_2CO_3 10 g/L. Les essais sont réalisés en triplicats. Les microplaques sont incubées à 28 °C sous agitation à 200 tpm. La DO est mesurée à 0, 7, 24, 48 et 72 h en utilisant un film transparent pour conserver la stérilité de la microplaque.

2.2.3 Rôle des bactéries dans la croissance des plantes et la mobilisation des ETM

Tous les tests de production des métabolites bactériens sont réalisés en présence ou non d'un mélange de 7 ETM apportés sous forme de sels de nitrate. Les concentrations en Cd, Sr, Ce, La, Nd, Tb et Y sont respectivement de 0,5 ; 20 ; 0,50 ; 0,25 ; 0,20 ; 0,25 et 0,25 mg/L. Elles correspondent à celles de l'extrait au $CaCl_2$ (0,01 M) des PG.

Tous les milieux sont préparés avec de l'eau ultra pure (EUP) et stérilisés par autoclavage à 120°C, 1 bar, pendant 20 min. L'existence d'interactions entre les ETM étudiés et les réactifs utilisés a été testée grâce à deux gammes étalon (avec ou sans mélange des 7 ETM). Les résultats obtenus sont exprimés en production spécifique, en rapportant la concentration de la molécule mesurée à la densité bactérienne (DO 620 nm) après 48h.

2.2.3.1 Production de sidérophores

La production de sidérophores est mesurée selon la méthode universelle de Schwyn, Neilands, (1987) modifiée pour accélérer la réaction (Chrome Azurol S (CAS) shuttle: (Schwyn Neilands, 1987) Les isolats bactériens (25 µL de suspensions bactériennes lavées) sont cultivés dans 200 µL de milieu Casamino acide (CAA : 5 g de Casamino acids (Difco) ; 1.8 g de

K_2HPO_4 ; 0.25 g $MgSO_4$, $7H_2O$ dans q.s.p 1000 mL eau ultra pur (EUP) ; pH= 7), enrichi ou non avec 25 µL de la solution d'ETM. Des blancs sont faits avec 25 µl de milieu CAA stérile, avec et sans ETM. La DO initiale dans tous les puits est de 0,1. Les microplaques sont incubées 48 h à 28°C sous agitation à 450 tpm à la suite de quoi la DO est mesurée. Les microplaques sont ensuite centrifugées pendant 20 min à 2500 tpm (866 *g*). Un volume de 150 µL du surnageant est prélevé et transféré dans une autre microplaque pour lire la production de pyoverdine, un sidérophore fluorescent, à 405 nm (coefficient d'extinction molaire ε_{405nm} = 19600 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ à pH 8). La présence de sidérophores totaux est mesurée en ajoutant 150 µL du surnageant de l'échantillon à analyser à 150 µL de réactif CAS-shuttle dans une proportion 1:1 (v/v). La DO à 630 nm est lue après 2 h de réaction à l'obscurité. Une gamme étalon est réalisée avec du déféroxiamine M, (DFOM, Calbiochem) de 0 à 12 µM, avec ou sans ETM afin de corriger la courbe de calibration des éventuelles interactions des éléments traces avec le test CAS.

2.2.3.2 Production d'acide indole acétique (AIA)

La production d'acide indole acétique à partir de tryptophane par les bactéries est déterminée par un test colorimétrique développé par Patten, Glick., (2002), utilisant le réactif de Salkowski (Salkowski., 1884). Les souches sont repiquées dans du milieu TSB 1/10ème. Après 48 heures à 28°C, elles sont cultivées dans du milieu autoclavé (121 °C, 20 min) de Dworkin Foster (DF) avec fer (4 g de KH_2PO_4 ; 6 g de Na_2HPO_4 ; 2 g de $(NH4)_2SO_4$; 0.2 g de $MgSO_4$, $7H_2O$; 0.1 mL de solution 1 d'éléments traces (10 mg de H_3BO_3, 11,2 mg de $MnSO_4$, H_2O, 124,6 mg de $ZnSO_4$, $7H_2O$, 78,2 mg de $CuSO_4$, $5H_2O$, 10 mg de MoO_3), q.s.p 100 ml EUP stérile ; 0.1 mL de solution 2 de sulfate de fer (100 mg FeSO4, 7H2O, q.s.p 10 mL EUP stérile, q.s.p 1000 mL EUP) et 10 g/L de glucose et incubées 24 h à 28 °C sous agitation (200 tpm). Les bactéries sont récupérées par centrifugation puis lavées avec du NaCl 9 g/L.

Les bactéries sont ensuite cultivées dans 175 µL de milieu DF avec fer et glucose, 25 µL de solution de tryptophane à 10 g/L stérile, 25 µL de solution mère en ETM stérile et 25 µL de suspension bactérienne avec une DO initiale de 1.0 à 620 nm. Les essais sont réalisés en quadriplicas et les microplaques sont incubées pendant 48 h à 28 °C sous agitation (450 tpm).
La croissance est mesurée à 620 nm. Après centrifugation des microplaques (20 min, 866 g), le surnageant est prélevé (50 µL) et mélangé à 200 µL du réactif de Salkowski. Le mélange est laissé au repos pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. L'absorbance est

ensuite mesurée à 541 nm. En présence d'AIA, le réactif de Salkowski se colore en rouge. Une gamme étalon est réalisée avec différentes concentrations d'AIA de 0 à 1 mM avec ou sans ETM.

2.2.3.3 Biodégradation de l'ACC

La biodégradation de l'ACC est déterminée par la méthode de Honma Shimomura, (1978) modifiée. Les bactéries sont mises en culture en microplaques avec, pour chaque puits : 187,5 µL de milieu DF modifié sans source d'azote de composition : i) Solution mère : 4 g de KH_2PO_4, 6 g de Na_2HPO_4, 6 g de Na_2HPO_4, 0,2 g de $MgSO_4$, $7H_2O$, 0,1 ml de solution 1, 0,1 ml de solution 2 (cf. section c.ii.) Qsp 800 ml EUP ; pH ajusté à 7,2 avant autoclavage (121 °C, 20 min) ; ii) Solution de sucres : 2 g de glucose, 2 g d'acide gluconique, 2 g d'acide citrique, Qsp 200 ml EUP ; autoclavage (121 °C, 20 min) puis mélange des solutions mères et de sucres (volume final de Qsp 1 L EUP). 12,5 µL d'ACC 60 mM stérilisé sont ajoutés, qui constituent la seule source d'azote, et 25 µL de la solution mère en ETM (en présence d'ETM) ou 25 µL d'EUP (en absence d'ETM) et enfin 25 µL de suspension bactérienne avec une DO de 0,1 ; soient au total 250 µL/puit. Chaque modalité est réalisée en quadriplicats, Les microplaques sont incubées pendant 48 h à 28°C à 450 tpm. Au bout des 48 heures, la croissance est mesurée à 620 nm. Après centrifugation des microplaques, 20 µL de surnageant sont prélevés et mélangés à 30 µL de réactif (0,2 % 2,4-dinitrophenylhydrazine dans de l'HCl 2 M). Le mélange est laissé à incuber pendant 30 minutes à 28°C, temps pendant lequel l'α-cétobutyrate est dérivé en phénylhydrazone. Après l'incubation, 200 µL de NaOH 2 M sont ajoutés pour révéler la couleur brune de la phénylhydrazone. L'absorbance est ensuite lue à 541 nm. Une gamme étalon est réalisée avec différentes concentrations d'α-cétobutyrate de 0 à 1 mM avec ou sans ETM.

2.2.4 Evaluation du potentiel des souches par scoring et identification

Pour chaque critère (cf. section 2.2), des statistiques descriptives sont faites sur les résultats numériques. Une note sur 2 est attribuée à chaque souche en fonction du quartile dans lequel elle se situe. La réponse de chaque souche pour chaque test est noté "2" si le résultat excède le dernier quartile, "1" entre le premier et le dernier quartile, ou "0" si le résultat est inférieur au premier quartile. Les notes sont additionnées pour chaque bactérie donnant au final une note sur un maximum de 12 points. (les 6 tests avec 2 points maximum par test).
Les souches ayant le score le plus élevé ont été identifiées par séquençage de l'ADN 16S.

2.3 Test de bioaugmentation en pot de PG

Le phosphogypse (PG) est celui utilisé dans la section 2.2.2. Il est mélangé à du Terreau universel (produit commercial à base de tourbe brune et blonde, d'écorces compostées, d'hortifibre®, de fumier et d'engrais) dont les caractéristiques sont données dans le Tableau 4.2.

Tableau 4.2. Caractéristiques physico-chimiques du Terreau selon le fournisseur (Florentaise CTRU70-St Mars du Désert-France).

Paramètre	Valeur
Matière sèche	35%
Matière organique	65%
Conductivité	45 mS/m
Capacité de rétention de l'eau	650 mL/l
Engrais NPK 14-16-18	1.2 kg/m^3
pH	6.5

Les deux substrats sont mélangés à raison de 15% de PG et 85% de terreau (v/v) et le mélange laissé reposer pendant plusieurs jours jusqu'à stabilisation du pH.

Les souches de *Bacillus cereus* (S3B1) et *Bacillus cereus* (M1B4) sont utilisées comme inoculum pour les pots du mélange PG-Terreau à raison de 1 ml de suspension bactérienne par tube à raison de 5 unités de DO/mL. Un témoin négatif non bioaugmenté (sans ajout de bactéries) est également préparé (Témoin T).

Chaque modalité est répliquée 5 fois. Au fond de chaque pot est placé un morceau de feutre pour éviter la perte de terre. 250 g de mélange PG-Terreau à 65 % de la capacité de rétention en eau y sont ajoutés. Chacune des souches sélectionnées ainsi qu'une souche connue de *Pseudomonas xanthamarina* (référence : ULPAs1) provenant de sédiments miniers contaminés en As, sont mises à cultiver dans 50 mL de milieu TSB 1/2 stérile en erlenmeyers de 100 mL à 28°C et sous agitation (200 tpm) pendant 24 h. Ensuite, 1 ml de chaque préculture sert à ensemencer un erlenmeyer de 1 L contenant 500 mL de MLM stérile. Les erlenmeyers sont placés dans l'incubateur comme précédemment pendant 48 h à 28 °C. Les cellules sont concentrées si besoin par centrifugation à 900 *g* pendant 10 minutes et reprises dans du KCl stérile (9 g/L) pour obtenir un volume maximal de 1 mL avec une DO à 620 nm de 5. Les

suspensions bactériennes sont inoculées dans chaque pot, une fois par semaine, à raison de 1 mL par pot. 1 mL de KCl est ajouté pour les pots non inoculés. Le mélange PG-Terreau est ensuite homogénéisé manuellement à l'aide d'une spatule stérile sur toute la hauteur du mélange de chaque pot. Les pots non inoculés sont homogénéisés de la même façon. Après 4 semaines d'incubation, chaque pot de mélange PG-Terreau est prélevé puis mis à sécher à 40°C pendant 5 jours. La mobilité des ETM dans le mélange PG-Terreau ainsi que la teneur en éléments totaux sont déterminées.

2.4 Analyses chimiques

2.4.1 Extractions simples des fractions phytodisponibles des éléments traces métalliques

2.4.1.1 Fraction mobile

L'extraction de la fraction dite mobiles du Cd, Sr et des terre rares (Ce, Y, La, Ne) du mélange PG-Terreau est réalisée selon la norme NEN 5704 des Pays Bas qui utilise une solution saline de chlorure de calcium $CaCl_2$ (0,01 M) capable d'extraire les métaux présents dans la solution du sol et les formes facilement échangeables. Une prise d'essai de 1 g (± 0,01 g) du mélange PG-Terreau sec broyé et tamisé à 250 µm est introduite dans un tube de 15 mL auquel est ajouté 10 mL de $CaCl_2$ (0,01 M) (ratio : 1/10 (m/v)). Les tubes sont ensuite agités pendant 24h à température ambiante. Après agitation, les tubes sont centrifugés pendant 8 min à 7690*g* puis le surnageant de chaque fraction est récupéré à l'aide d'une seringue de 10 mL, filtré sur membrane acétate de cellulose à 0,22 µm et acidifié avec une goutte (<10µL) de HNO_3 concentré (65%). Chaque extrait est conservé à 4 °C avant analyse. Tous les réactifs utilisés sont de qualité analytique et les solutions sont préparées dans de l'EUP. Pour un sol considéré, les analyses sont réalisées en triplicats.

2.4.1.2 Fraction potentiellement mobilisable

L'extraction se fait selon la norme NF X 31-120 (1992) qui utilise une solution de 1 M d'acétate d'ammonium (CH_3COONH_4) et 0.01 M de Na_2EDTA (pH= 7) à laquelle est ajouté 1 g du mélange PG-Terreau sec broyé et tamisé à 250 µm (ratio : 1/10 (m/v)). L'extraction est réalisée de la même façon que celle au $CaCl_2$.

2.4.2 Détermination des métaux totaux

La teneur totale en ETM est déterminée selon la norme ISO 11464 (AFNOR, 2006), Après séchage et broyage à 250 µm à l'aide d'un boyeur à battoir (A 11 basic et battoir A 11.1 de IKA, Staufen, Germany). Une prise d'essai de 0.50 ± 0,01 g d'échantillon du mélange PG-Terreau sec est introduite dans un réacteur en téflon de 55 mL (CEM µWave, Orsay, France) dans lequel sont ajoutés 3 mL de HCl 37 % (v/v) et 9 mL de HNO_3 65 % (v/v). La mise en solution par attaque acide est réalisée dans un four à micro-ondes CEM MARS 6 (Microwave Accelerated Reaction System de CEM µWave, Orsay, France)**.** Une fois l'échantillon refroidi, le minéralisat est repris dans une fiole jaugée avec de l'eau ultra pure (EUP) dont le volume est ajusté à 25 mL. Le liquide est ensuite filtré sur du papier filtre Whatman N° 40 ou Durieux N°111, puis récupéré et conservé dans des tubes en polypropylène (PP) résistants à l'acide (DigiTUBEs de SCP Science, Courtaboeuf, France). Les analyses des ETM sont réalisées par ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy) avec un iCAP 6300 DUO Radial associé à un passeur automatique CETAC ASX-520 de Thermo-Fischer SCIENTIFIC (Illkirch, France). Les longueurs d'ondes auxquelles sont analysés les éléments étudiés sont les suivantes : Cd (226,502 nm) et Sr (346,446), Ce (404,076), La (379,478), Nd (378,425) et Y (242,220).

2.5 Analyses Statistiques

Les moyennes et les écart-types sont calculés par modalité.

Les données obtenues sont traitées avec le logiciel Microsoft Excel XLStat. Le test utilisé est l'analyse de variances (ANOVA), permettant une comparaison de plusieurs moyennes au seuil de 5 %. Dans le cas de différences significatives, cette dernière est suivie d'un test de Tukey, test permettant dřidentifier les différences significatives mises en évidence par l'ANOVA. Ces dernières sont représentées par des lettres différentes sur les graphes illustrant les résultats. Tous les résultats se traduisant par lřattribution dřune même lettre appartiennent à un groupe homogène et ne présentent pas de différence significative.

3 Résultats et discussion

3.1 Isolement des bactéries cultivables

Le premier critère de sélection sur la base de l'aspect morphologique des Colony Forming Units (CFU) a été la pigmentation, les pigments présents à la surface des cellules bactériennes pouvant agir comme antioxydants en réponse à un stress (Asker et al., 2007). 32 isolats batériens

ont été retenus qui sont caractérisés par des pigmentations jaunâtre (claire et foncé), rouge, orangée, saumon rose, miel. Les CFU de forme ronde présentaient par ailleurs un aspect lisse ou granuleux.

3.2 Tests biochimiques pour la sélection des isolats

3.2.1 Croissance sur milieu de culture à l'extrait de phosphogypse (PG) et tolérance aux éléments traces métalliques

Ce premier test visait à sélectionner les isolats bactériens les plus aptes à tolérer différentes concentrations en phosphogypse (PG) grâce à l'analyse de leur croissance dans un milieu de culture liquide à l'extrait de PG. Ce test a été adapté de celui utilisé par Braud et al. (2015) en remplaçant l'extrait de sol, classiquement utilisé, par l'extrait de PG. Comparé aux milieux de culture standard (milieux synthétiques), les milieux à l'extrait de sol permettent de se rapprocher de la composition du milieu naturel complexe (Braud et al., 2015 ; Liebeke et al., 2009).

La Figure 4.1 montre les différences de pH et de densité bactérienne moyenne (valeurs de DO mesurées en fin de phase de croissance) des 32 souches isolées cultivées dans le milieu MLM enrichi avec l'extrait de PG. Le pH diminue avec l'augmentation des teneurs en PG dans le milieu de culture : pH 6 dans le milieu minimum liquide (MLM) sans PG à pH 3,40 dans l'extrait de PG où la concentration en PG est de l'ordre de 10 g/L. La densité bactérienne moyenne (DO) diminue avec l'augmentation de la concentration de PG et ce, quelle que soit la valeur du pH. A 5 g PG/L, l'ajustement initial du pH à 6 limité l'impact des PG sur la croissance. A 10 g PG/L, on n'observe pas de baisse supplémentaire de la DO lorsque le pH n'est pas ajusté préalablement à 6 contrairement au cas où le pH est préalablement ajusté. Même à une concentration de 10 g/L de PG et un pH de 3,4, la densité bactérienne avoisine les 0,3 ce qui atteste que les bactéries ont survécu bien que leur croissance soit ralentie (DO initiale de 0,1). Les isolats avec les meilleures croissances bactériennes pour la teneur en PG la plus élevée (10 g/L) et le pH le plus bas (3,40) ont été retenus pour les tests biochimiques. G1B1, G1B3, G3B2, M1B4, M1B5', M7B2, S3B1. Deux bactéries productrices de sidérophores (*Pseudomonas aeruginosa* et P*seudomonas fluorescens*) ont été rajoutées en tant que témoins positifs.

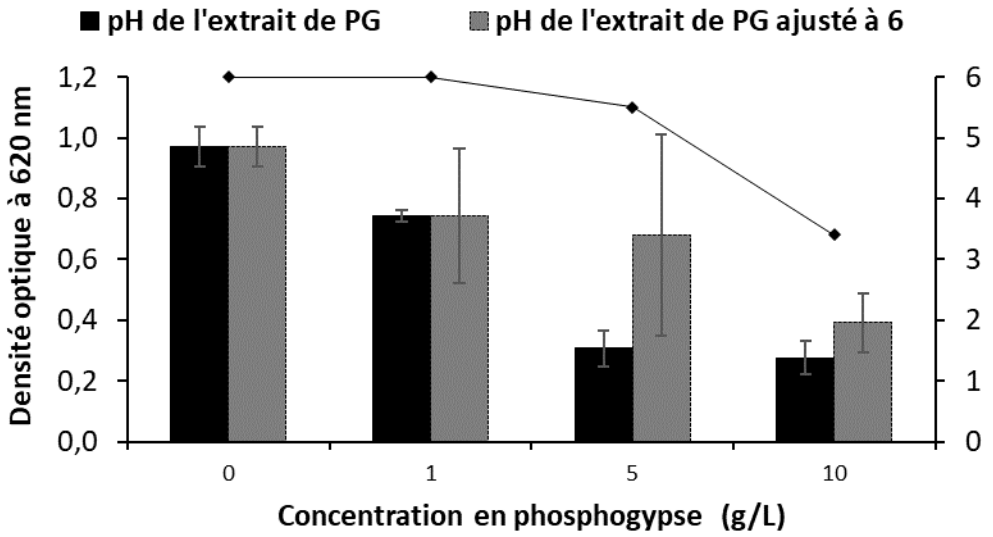


Figure 4.1. Biomasse moyenne (mesurée à l'aide de la densité optique (DO) à 620 nm) des 32 isolats bactériens cultivés dans le milieu MLM enrichi avec un extrait de phosphogypse. Les barres noires correspondent à la DO du milieu de culture dont le pH n'a pas été ajusté en début d'expérience. Les barres grises correspondent à la DO du milieu de culture dont le pH a été ajusté en début d'expérience à 6. Les losanges correspondent au pH du milieu de culture non ajusté en début d'expérience.

3.2.2 Production de métabolites

3.2.2.1 Production de sidérophores

Les résultats de la production spécifique de pyoverdine sont présentés en figure 4.2a. Excepté l'isolat G3B2, tous les autres produisent de la pyoverdine dans le milieu CAA. G1B2, M1B4 et S3B1 sont les plus performants. L'ajout du mélange d'ETM diminue significativement la production de pyoverdine des isolats M7B2, G3B2, G1B1 alors qu'ils sont sans effet pour les autres isolats. La figure 4.2b montre des résultats similaires pour la production de sidérophores totaux ce qui pourrait indiquer que ces isolats produisent essentiellement des sidérophores fluorescents tels que la pyoverdine, pigments fluorescents vert-jaune solubles dans l'eau constituant les sidérophores majoritaires des *Pseudomonas* sp. (Lemanceau et al., 2009). Les deux souches de P*seudomonas fluorescens* et *Pseudomonas aeruginosa* (utilisées comme témoins positifs) sont connues pour la sécrétion de deux sidérophores majeurs, la pyoverdine et la

pyochéline (Meyer.,2000 ; Sheng et al., 2008). Contrairement à ce qu'on observe pour les autres isolats, la présence des ETM semble favoriser la sécrétion des sidérophres chez *P. aeruginosa* et *P. fluorescens*, alors qu'elle est connue pour être inhibée dès 10 µM de Fe biodisponible (Díaz de Villegas et al., 2002 ; Braud et al., 2009). Loges et al (2012) ont observé que les sidérophores ont une très forte affinité pour le Ce (IV). Les terres rares présentent par ailleurs une activité antibactérienne quand elles sont chélatées à des sidérophores (Rogers et al., 1984 ; Tang et al., 2009).

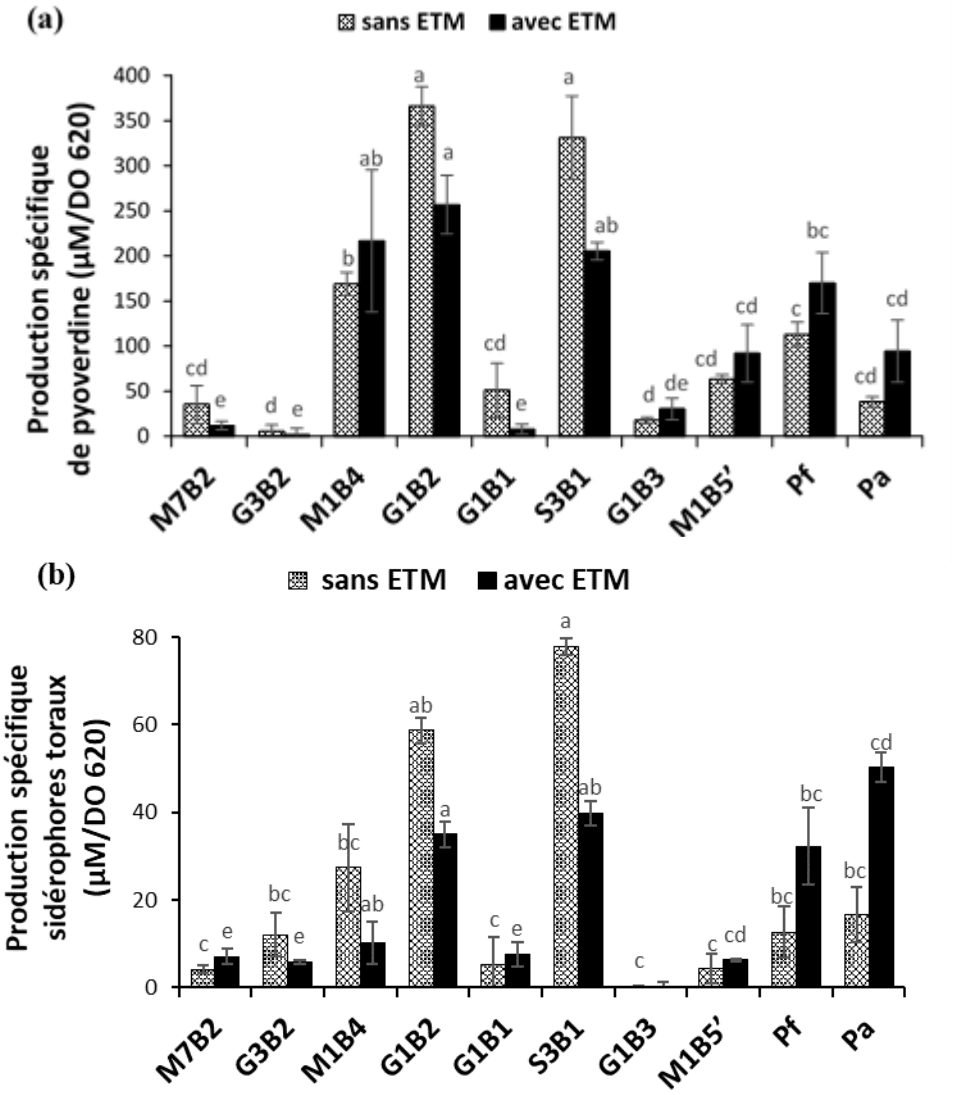


Figure 4.2. Production spécifique de pyoverdine (a) et de sidérophores totaux (b) des 8 isolats bactériens testés : G1B1, G1B2, G1B3, G3B2, M1B4, M1B5, M7B2, S3B1 ainsi que 2 bactéries productrices des sidérophores, *Pseudomonas aeruginosa (Pa) et Pseudomonas fluorescens (Pf)* dans le milieu de culture Casamino acid (CAA) en présence ou non du

mélange d'ETM. Les groupes homogènes sont déterminés par ANOVA et représentés sur les figures par les lettres a,b,c…

3.2.2.2 Production d'AIA

Trois comportements bactériens de production d'AIA sont observés selon la présence ou l'absence d'ETM (figure 4.3) : i) Production moyenne fortement stimulée par l'ajout des ETM pour la majorité des isolats (G1B1, M1B4, M1B5', M7B2, S3B1 et *Pa*). La présence des ETM a doublé la production d'AIA pour S3B1 et d'un facteur 3,25 pour M1B5', ii) production d'AIA identique en présence ou non ETM pour les isolats G1B3 et *P. fluorescens*, iii) production d'AIA seulement en absence d'ETM avec G3B2. La production d'AIA est connue pour varier d'une bactérie à l'autre avec par exemple 22.83 µM pour *Brevibacillus SJ-101* (Vivas et al., 2006) et 313,95 µM pour *Bacillus subtilis* (Zaidi et al., 2006). Selon Mirza et al. (2001), la production d'AIA par les micro-organismes peut varier au sein d'une même espèce, plusieurs facteurs peuvent influencer la production de l'IAA tel que le pH du milieu (Spaepen et al., 2007).

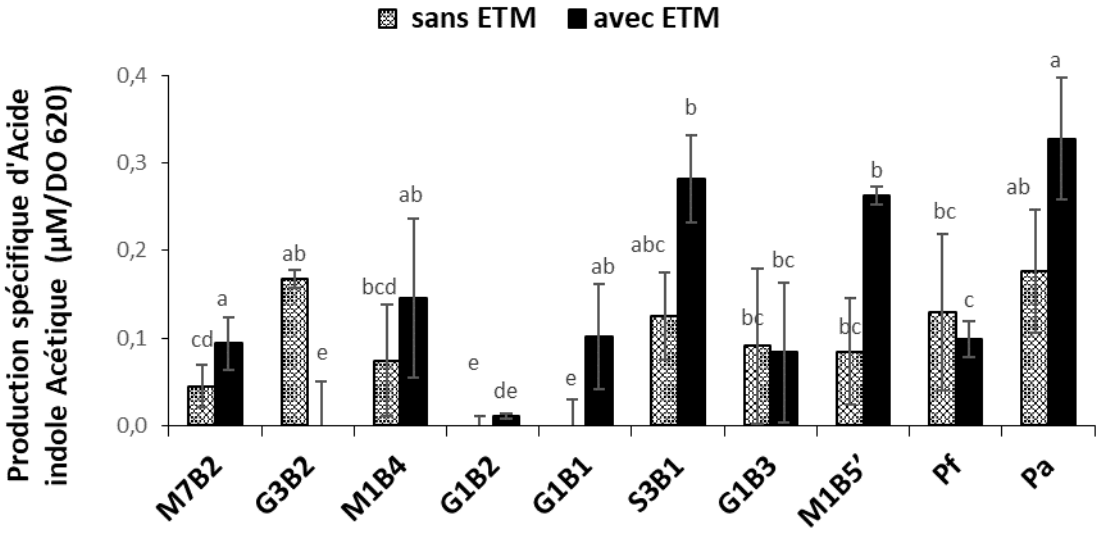


Figure 4.3. Production spécifique d'acide indole acétique (AIA) des 8 isolats bactériens testés : G1B1, G1B2, G1B3, G3B2, M1B4, M1B5, M7B2, S3B1 ainsi que 2 bactéries productrices des sidérophores, *Pseudomonas aeruginosa (Pa) et Pseudomonas fluorescens (Pf)* dans le milieu de culture DF AIA, en présence ou non du mélange d'ETM. Les groupes homogènes sont déterminés par ANOVA et représentés sur les figures par les lettres a,b,c…

3.2.2.3 Dégradation d'ACC désaminase

Les résultats de la dégradation d'ACC (Figure 4.4) montrent que la présence du mélange d'ETM inhibe fortement la dégradation de cet enzyme pour toutes les bactéries testées (sauf M1B5' qui n'est pas sensible).

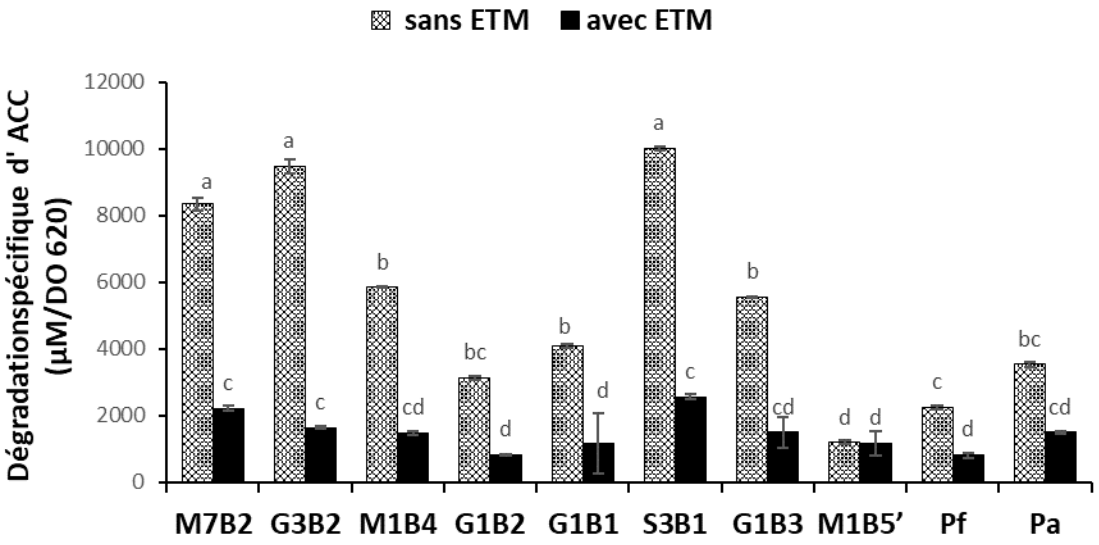


Figure 4.4. Dégradation spécifique de l'enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase des 8 isolats bactériens testés : G1B1, G1B2, G1B3, G3B2, M1B4, M1B5, M7B2, S3B1 ainsi que 2 bactéries productrices des sidérophores, *Pseudomonas aeruginosa (Pa) et Pseudomonas fluorescens (Pf)* dans le milieu de culture DF modifié (DF ACC) en présence ou non du mélange d'ETM. Les groupes homogènes sont déterminés par ANOVA et représentés sur les figures par les lettres a,b,c…

3.2.2.4 Sélection des souches bactériennes pour la bioaugmentation

Les résultats des différents tests montrent qu'en présence d'un mélange d'ETM, les souches isolées de prélèvements de sols aux alentours des sites de stockage des PG, présentent des comportements différents : des souches ayant un effet PGPR avec la production d'AIA et la dégradation d'ACC (M1B5', M7B2), des bactéries agissant plutôt sur la mobilisation des ETM

(G1B2, G3B2). Et d'autres agissant en même temps sur la production d'AIA et la mobilisation des ETM (M1B4 et S3B1).

Les tests de sélection des bactéries utilisées dans la présente étude ont permis de mettre en évidence l'importance de prendre en compte le métal étudié (Braud et al., 2015), ici un mélange de 6 ETM (Cd, Ce, La, Nd, Sr, Y). La concentration en ETM utilisés a permis de sélectionner les bactéries tolérantes à la concentration en ETM facilement mobilisables (i.e., extrait des ETM au $CaCl_2$). Les résultats ont en effet clairement montré que la présence des ETM peut influer les réponses de chaque bactérie testée. L'ajout des ETM a eu un effet inhibiteur global sur la dégradation d'ACC et sur la croissance des bactéries cultivées avec un milieu de culture enrichie avec l'extrait de PG, alors que les productions spécifiques de sidérophores, dont la pyoverdine, et d'AIA semblent avoir été stimulées en présence des ETM.

Des expériences sur *Helianthus annuus* révèlent que son inoculation avec *Acinetobacter* sp. CC30, qui produit des sidérophores, de l'AIA, et solubilise le phosphore, augmente significativement la biomasse de la plante (en moyenne de 4,15 % pour les tiges et 29 % pour les racines) (Rojas et al., 2012). De manière similaire, Zhang et al. (2011) ont rapporté que l'inoculation de *Brassica napus* avec un consortium bactérien (*Ralstonia* sp. J1-22-2, *Pantoea agglomerans* Jp3-3 et *Pseudomonas thivervalensis* Y1-3-9) augmentait la masse sèche des parties chlorophylliennes (de 24% à 124%) et des racines (de 38% à 100%). Au cours des dernières années, le nombre des PGPR identifiées a fortement augmenté (2 à 5 % des rhizobactéries). Elles comprennent de nombreux genres bactériens (*Azotobacter, Bacillus, Burkholderia, Erwini*a, *Micrococcus, Pseudomonas* et *Rhizobium*) Les plus répandus sont *Azotobacter* et *Pseudomonas*, très représentés dans l'environnement rhizosphérique qui possèdent des propriétés PGPR. 80 % des *Pseudomonas* produisent de l'AIA (Ahmad et al., 2008).

Le tableau 4.3 présente les valeurs seuils des 3 quartiles pour chaque test, utilisées pour l'attribution des notes servant à la sélection des 32 isolats bactériens testées. Les notes des 5 paramètres sont additionnés pour chaque isolat donnant au final une note sur 10 (note maximale de 2 par paramètre).

Les notes obtenues pour chaque isolat bactérien sont présentées dans le tableau 4.4. Les meilleures notes sont 9/10 obtenue pour S3B1 et 7/10 pour M1B4. Parmi les 32 isolats testés (au total), ces 2 isolats bactériens ont été retenus comme étant potentiellement les plus efficaces au

regard de leurs propriétés PGPR et de mobilisation des ETM et par conséquent les plus adaptés pour la bioaugmentation du mélange PG-Terreau.

Tableau 4.3. Statistiques descriptives de chaque paramètre choisi pour la sélection des isolats bactériens : croissance dans un extrait de PG (Ccc ExPG) exprimée en % par rapport à la croissance dans TSB ½, production spécifique de pyoverdine (PS PVD), production spécifique de sidérophores totaux (PS ST), production spécifique d'acide indole acétique (PS AIA) et dégradation spécifique de l'enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase (DS ACC) exprimées en µM/DO 620 nm.

	Cce ExPG (%)	**PS PVD (µM/DO)**	**PS ST (µM/DO)**	**PS AIA (µM/DO)**	**DS ACC (µM/DO)**
1er quartile	44.1	16.8	6.5	0.09	1160.9
Médiane	53.4	93.3	8.9	0.1	1480.4
3ème quartile	55.8	196.6	34.3	0.23	1594.5

La séquensage de l'ADN des deux bactéries ayant le score le plus élevée a montré que les deux souches sont à 100 % similaires avec *Bacilus cereus*. Il est important de noter que même si les résultats de l'identification de deux isolats sont les mêmes, ils diffèrent par l'aspect des colonies sur boite de Petri. Le genre *Bacillus cereus* est parmi les bactéries cultivables les plus abondantes du sol (Stetten et al., 1999). Elles sont connues pour leur activité PGPR, néanmoins, il existe peu d'études sur leur potentiel de production d'AIA. Rahman et al. (2016) ont démontré que les *B. cereus* sont connues pour leurs capacités à synthétiser de l'AIA. Une autre étude a confirmé l'implication de cette souche dans la promotion de la croissance de soja (*Glycine max*) (Bullied et al., 2002) et favorise celle de *Cajanus cajan sp* (L.) Mill (Tilak., 2006). Arif et al. (2017) ont montré que la production d'AIA par *B. cereus* GS6 peut varier de 5,3 ± 1,10 à 13,1 ± 2,01 mg/L et l'activité ACC-désaminase a été mesurée à 413 ± 9,4 µmol d'α kétobutyrate/g protéine/h. *B. cereus* GS6 a également un fort potentiel de colonisation racinaire, de production de sidérophores et de solubilisation des phosphates.

Tableau 4.4. Synthèse des résultats de la sélection des isolats bactériens pour les différents tests en présence du mélange d'ETM, et détail des notes attribuées pour chaque isolat sur un maximum de 10 points. (2 points maximum par test : Croissance dans un extrait de PG (Cce ExPG), production spécifique de pyoverdine (PS PVD), production spécifique de sidérophores totaux (PS ST), production spécifique d'acide indole acétique (PS AIA) et dégradation spécifique de l'enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase (DS ACC)).

Note isolats	Cce ExPG	PS PVD	PS ST	PS AIA	DS ACC	Total
G1B1	1	0	1	1	1	4
G1B2	1	2	2	0	0	5
G1B3	1	1	0	0	1	3
M1B4	2	2	1	1	1	7
G3B2	1	0	0	0	2	3
M1B5'	0	1	0	2	0	3
M7B2	0	0	1	1	1	3
S3B1	1	2	2	2	2	9
P. aeruginosa	ND	0	2	2	1	5
P. fluorescens	ND	1	1	1	0	3

ND : Non déterminé

3.2.3 Test de la bioaugmentation

Afin de valider la méthode de sélection, les deux isolats bactériens présélectionnés ayant le meilleur score à l'issue des tests biochimiques ont servi à la bioaugmentation du mélange PG-Terreau. Ce test permet d'estimer les fractions mobiles et mobilisables des ETM étudiées par extraction sélective au $CaCl_2$ et à l'EDTA. Les teneurs en ETM (Cd, Ce, La, Nd, Sr et Y) extractible au $CaCl_2$ et à l'EDTA sont présentées dans la figure 4.5.

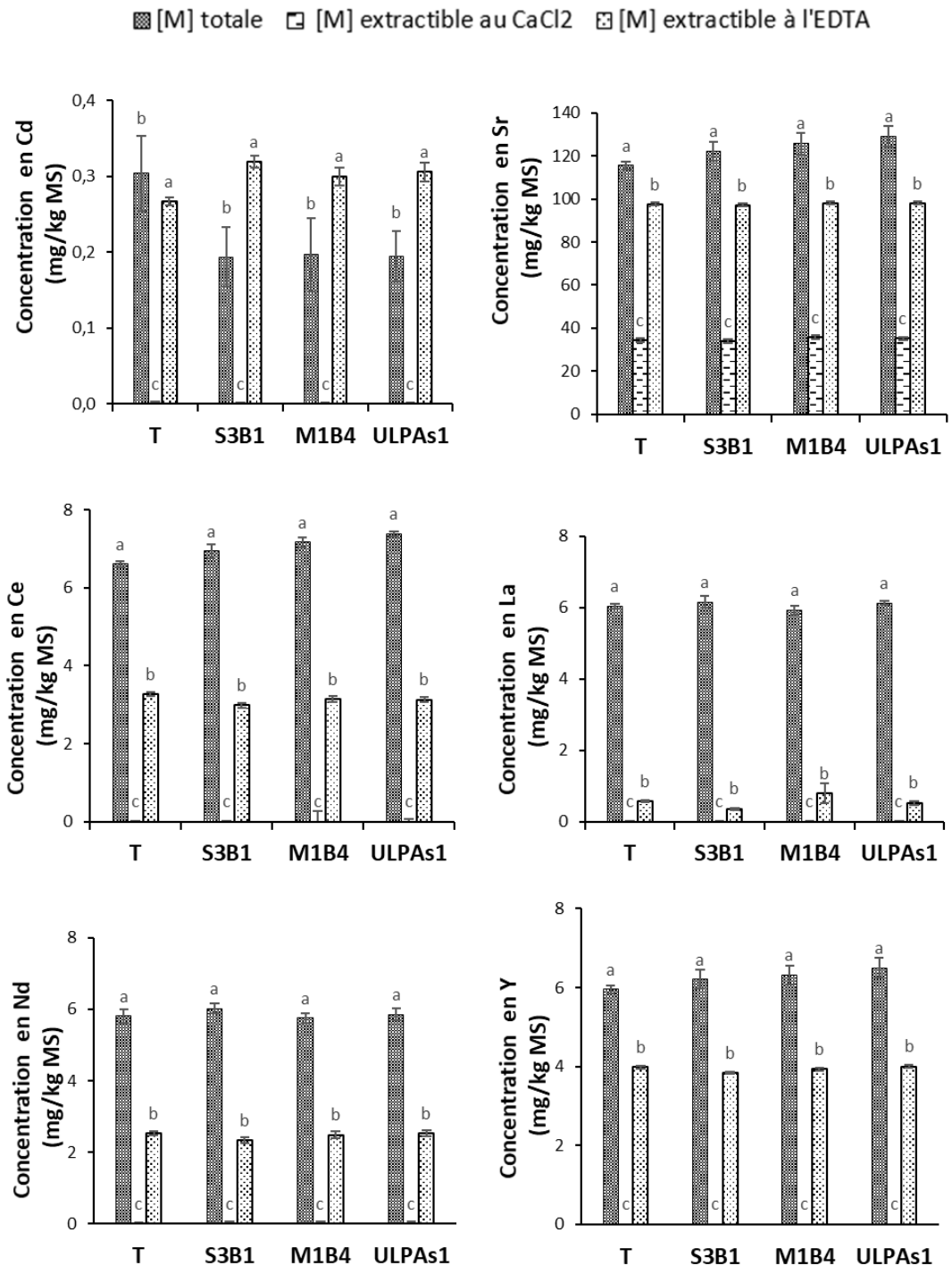


Figure 4.5. Teneurs en Cd, Ce, La, Nd et Sr totaux, extractibles au $CaCl_2$ et à l'EDTA après 3 semaines d'incubation sans bioaugmentation (T) et après inoculation du mélange PG-Terreau avec les deux isolats bactériens pré-sélectionnées M1B4 et S3B1 et un témoin « positif » *Pseudomonas*.

L'EDTA extrait sans surprise une part plus importante d'ETM que le $CaCl_2$, quel que soit l'ETM considéré. La concentration des ETM dans l'extrait au $CaCl_2$ est inférieure à la limite de quantification sauf pour Sr dont la concentration totale dans le mélange PG-Terreau est la plus élevée de tous les ETM analysés.

La bioaugmentation du mélange PG-Terreau avec les isolats S3B1, M1B4 et la souche ULPAs1 n'a entraîné aucun effet sur la quantité d'ETM extractibles à l'EDTA sauf pour Cd où les 2 isolats et la souche ULPAs1 sélectionnées augmentent légèrement (en moyenne) la fraction mobilisable par rapport au témoin T non bioaugmenté. L'absence d'effet de la bioaugmentation pour les autres ETM, pourrait s'expliquer par une resorption rapide (avant le prélèvement réalisé après 3 semaines d'incubation) sur les phases du mélange PG/terreau des ETM mobilisés par les bactéries. Kazy et al. (2006) ont montré que chez *Pseudomonas* sp. le lanthane est adsorbé et facilement désorbé par la suite. Une étude similaire est rapportée par Xu et al. (2011) montrant pour le cérium le même comportement chez *Agrobacterium* sp. HN1. Bien que *Pseudomonas xanthamarina* ait la capacité de mobiliser des métaux (Weeger et al., 1999), aucun effet de la souche ULPAs1 n'a été démontré sur la mobilité des ETM étudiées, dans les conditions de l'expérience. L'ajout de la plante permettra d'évaluer l'effet réel de la bioaugmentation par ces bactéries. En effet, dès que ces bactéries mobilisent les ETM du mélange PG-terreau entraînant un enrichissement de la solution du sol, la plante est susceptible de les prélever avant leur éventuelle resorption sur les phases solides du mélange.

4 Conclusion

L'objectif de cette étude était de sélectionner des bactéries capables de produire des métabolites jouant un rôle dans la mobilisation des ETM et/ou la promotion de la croissance des plantes (effet PGPR), par screening (test biochimiques réalisés en microplaques) et scoring (évaluation du potentiel des souches). Les bactéries ont été sélectionnées pour leurs propriétés potentiellement intéressantes en phytoextraction telles que leurs propriétés PGPR. Les paramètres utilisés pour la sélection étaient : la croissance dans les extraits de PG, la production de pyoverdine et de sidérophores totaux, la production d'AIA et la dégradation de l'ACC. Les 2 bactéries potentiellement les plus intéressantes n'ont pas démontré d'effet évident sur la mobilisation des ETM étudiés, sauf le Cd. Des essais de bioaugmentation associée directement à la phytoextraction permettront de conclure quant à l'efficacité réelle de ces bactérie.

CHAPITRE 3 : Procédé de phytoextraction couplé à la bioaugmentation pour le traitement du Cd, Sr et la valorisation de terres rares dans des phosphogypses.

Jihen Jalali[a,b,c], Pierre Gaudin[a], Emna Ammar[b], Thierry Lebeau[a*]

[a]Laboratory of Planetology and Geodynamics of Nantes, UMR 6112 CNRS, Faculty of Sciences and Technology of Nantes, BP 92208, 44322 Nantes Cedex 3, France

[b]Research Unit Coastal and Urban Environments, University of Sfax, National Engineering School of Sfax, BP 1173, 3038 Sfax, Tunisia

[c]Tunisian Chemical Group, M'dhilla-Gafsa factory, B.P. 215, 2100 Gafsa, Tunisia

Résumé

L'objectif de ce travail est d'évaluer le potentiel de phytoextraction du Cd, Ce, La, Nd, Sr et Y par deux plantes accumulatrices des élements traces métalliques (Trifolium pratense et Helianthus annuus) en hydroponie et ensuite d'évaluer l'effet de la bioaugmentation sur un mélange de PG et terreau pour la phytoextraction des ETM par ces deux plantes. Les plantes sont associées avec des bactéries à effet PGPR capables d'augmenter la fraction phytodisponible des ETM et/ou d'augmenter la production de biomasse végétale, en pot avec un mélange PG-Terreau à raison de 15 % de PG et 85 % de Terreau (v/v) Cette méthode (bioaugmentation couplée à la phytoextraction) a pour objectif : d'augmenter les performances de traitement des PG par phytoextraction afin de réduire son impact sur l'environnement (Cd et Sr) tout en offrant la possibilité de récupérer et valoriser les terres rares accumulés dans la biomasse végétale (Ce, La, Nd et Y).

En hydroponie, le tournesol se révèle plus efficace en termes de teneurs en ETM dans les PA mais, contrairement au trèfle, il régule l'accumulation des ETM. Les niveaux d'accumulation des ETM par les plantes cultivées en pots avec le mélange PG-terreau sont beaucoup plus faibles qu'en hydroponie. Le couplage bactéries-plantes a permis de stimuler la croissance des plantes testées et d'augmenter la biodisponibilité de tous les ETM étudiés (surtout Ce, La, Nd, Y) dans le

tournesol et encore plus dans le trèfle permettant ainsi d'augmenter les performances de traitement des PG par phytoextraction.

Mot clès : Bioaugmentation, Eléments traces métalliques, hydroponie, Phosphogypse, Phytoextraction, Terre rare,

1 Introduction

Le phosphogypse (PG) est le sous-produit principal de la production de l'acide phosphorique (constituant de base dans la fabrication d'engrais phosphatés). Il résulte de l'attaque sulfurique de la roche phosphatée. En général, une tonne et demi de PG est générée par tonne de roche phosphatée traitée, soit une production mondiale annuelle estimée à 258 Mt en 2018 (Saadaoui et al., 2017), ce qui pose des problèmes de gestion et environnementaux. Plus de 10 Mt de PG sont produits annuellement par les unités de production de l'acide phosphorique en Tunisie qui sont actuellement soit rejetés en mer ou stockés sur les sites mêmes sous forme de terrils (Sfar Falfoul et al., 2002). Les caractéristiques chimiques et minéralogiques des PG dépendent de la nature du minerai, du procédé utilisé et de l'âge du terril du stockage. Il est principalement constitué de gypse mélangé avec du phosphate de calcium sous différentes formes, de la silice et d'autres impuretés de diverses natures telles que l'oxyde de fer, de magnésium et d'aluminium, des sulfures, de la matière organique, des éléments traces métalliques (ETM) incluant des métaux lourds, des terres rares (TR) et des radionucléides (Sfar Felfoul *et al.*, 2002, Al- Hwaiti et al., 2010, Hammas-Nasri et al., 2016). Les PG représentent un problème environnemental en raison de la mobilité plus ou moins élevée des ETM, et en même temps, une ressource potentiellement valorisable, en particulier les terres rares qu'ils contiennent, utilisées dans des fabrications de haute technologie. Les PG sont valorisés dans divers domaines par des techniques conventionnelles physiques et chimiques (Saadaoui et al., 2017). Toutefois, ces techniques sont souvent onéreuses et souvent polluantes en raison de l'utilisation d'acides. Actuellement, la valorisation des PG ne concerne qu'une modeste proportion des quantités produites, i.e., 15 % du PG produit dans le monde (Tayibi et al., 2009).

La phytoextraction, peut constituer une alternative intéressante aux procédés conventionnels, avec une solution peu coûteuse et écologique. Le choix des espèces végétales à utiliser est crucial. En général, les qualités recherchées sont une croissance rapide, une forte biomasse, une concentration élevée en contaminants dans les parties récoltables, la capacité à tolérer la contamination et une bonne adaptation à l'environnement dans lequel elles sont cultivées (Ali et al. 2013). Komnitsas et al., 1998) ont testé la phytostabilisation d'un terril de PG en Roumanie. Plusieurs espèces herbacées ont été cultivées en pot contenant un mélange de PG et différents amendements (Dolomie, kaolin, boues d'épuration et du sol) pour une meilleure croissance de ces plantes. Pour autant, les ETM demeurent dans le sol, et leur évolution à long terme n'est pas

prévisible alors que la dépollution vise à l'élimination des ETM du sol. C'est l'objectif de la phytoextraction, seule technique de dépollution in situ des ETM où leur accumulation dans les parties récoltables de la plante est recherchée. Le trèfle violet (*Trifolium pratense)* et le tournesol (*Helianthus annuus)* sont parmi les plantes capables d'accumuler les ETM suivant dans ses parties aériennes : Cd (Andrade et al., 2008) et Sr (tournesol), Ce, La, Nd, et Y (trèfle violet) (Boisselet et al., 2012). L'avantage est de disposer de graines commercialisées pour ces plantes.

La principale limite vient de la quantité limitée de métal extrait par ces plantes ce qui nécessite plusieurs cycles de culture sur plusieurs années en fonction du type de plante utilisé et de leur vitesse de croissance ainsi que des propriétés du sol qui influencent la disponibilité des ETM (Pilon-Smits, 2005). Pour réduire la durée de traitement, l'ajout au sol de chélatants chimiques a été testé avec succès (Alkorta et al., 2004) mais pose la question de leur toxicité pour la plante (Nowack et al, 2006) et les microorganismes du sol (Lee and Sung, 2014). Par ailleurs, certains chélatants ne sont pas suffisamment efficaces (cas de l'acide citrique) (Bouquet et al. 2016). La technique de dépollution des sols par couplage bioaugmentation-phytoextraction ou appelé aussi rhizoremédiation a été suggérée comme une solution prometteuse (Kuiper et al., 2004). L'utilisation de bactéries capables de mobiliser les ETM et/ou de stimuler le développement de la plante (propriétés PGPR), peut permettre d'augmenter la quantité des ETM extrait par cette dernière et par conséquent l'efficacité de la phytoextraction. Selon la revue de Lebeau et al. (2008), le couplage plante/bactérie sur un milieu contaminé peut augmenter, dans 60% des études, la biomasse de la plante de 1,2 à 4 fois et/ou la concentration en métaux dans les feuilles de 1,1 à 3,1 fois. Jusqu'à présent, la rhizoremédiation a surtout été employée dans le but d'augmenter la biomasse des végétaux inoculés grâce aux métabolites produits par les microorganismes bioaugmentés (Lebeau et al. 2008).

L'objectif de ce présent travail est l'évaluation du potentiel de phytoextraction du Cd, Ce, La, Nd, Sr et Y présent dans les PG par *Trifolium pratense* et *Helianthus annuus* et leur association avec des isolats bactériens (S3B1et MB4) préalablement sélectionnées (Jalali et al. soumis). Ces isolats ont été isolés à partir de PG et des tests biochimiques ont montré leur potentiel à augmenter la fraction phytodisponible des ETM et la biomasse végétale. L'association de la bioaugmentation et de la phytoextraction a pour objectif d'augmenter les performances de traitement des PG par phytoextraction afin de réduire son impact sur l'environnement (Cd et Sr)

tout en offrant la possibilité de récupérer et valoriser les terres rares accumulées dans la biomasse végétale (Ce, La, Nd et Y).

2 Matériel et méthodes :

2.1 Culture des plantes

2.1.1 Désinfection et germination des graines

Les plantes utilisées pour cette étude sont le trèfle (*Trifolium pratense*) et le tournesol (*Helianthus annus)* variété Kapplanont. Pour chaque mode de culture (en hydroponie ou en pot avec du sol), les graines de trèfle ont été stérilisées à température ambiante par ajout d'une solution d'eau de javel 9.6 % (v : v)) : dilution 1/3 de la solution mère à 15° de chlore actif à laquelle ont été ajoutées une à deux gouttes de tween 80 pour 100 ml de solution. Les graines de tournesol ont été d'abord lavées 3 fois et laissées sous agitation dans l'Eau Ultra Pure (EUP) stérile pendant 1h pour éliminer les fongicides puis rincées 10 fois avec l'EUP stérile. Après stérilisation, les graines ont été mises à germer dans une boîte de Pétri sur filtre humidifié préalablement stérilsé pour le trèfle, et dans un bocal en verre tapissé de vermiculite pour les graines de tournesol, préalablement humidifiée et stérilisée par autoclavage. Les graines ont été mises à l'étuve à 25 °C, à l'obscurité, pendant 2-5 jours.

2.1.2 Pré-culture des plantes en hydroponie

Après germination des graines en conditions stériles, les germes ont été pré-cultivées dans du milieu de culture Hoagland (Tableau 5.1) dans une chambre de culture phytotronique (Phytotron FITOCLIMA D1200, Rio de Mouro, Portugal) en conditions contrôlées (16h de jour à 20°C et 8h de nuit à 18°C ± 3 °C) avec une humidité relative de 70 % et un éclairage moyen de 138 µmol de photons/m²/s pendant 60 jours pour le trèfle et 28 jours pour le tournesol. Le milieu est intégralement renouvelé tous les 7 jours, puis tous les 4 jours lorsque les plants atteignent le stade 6-8 feuilles.

Tableau 1. Composition des milieux de culture pour plantes : Hoagland (Hoagland et Arnon, 1950) et Low Phosphate Low pH (LPP ; Fischer et al., 2014).

	Hoagland Mmol/L	**LPP µmol/L**
$MgSO_4$, $4H_2O$	2,0	200
$Ca(NO_3)_2$, $4H_2O$	4,0	280
KNO_3	6,5	600
KH_2PO_4	1,0	-
Fe-citrate	0,05	-
	µmol/L	
H_3BO_3	46,3	-
$MnCl_2$, $4H_2O$	9,1	-
$ZnSO_4$, $7H_2O$	0,87	-
$CuSO_4$, 5 H_2O	0,32	-
Na_2MoO_4, 2 H_2O	1,03	-
$(NH_4)_2HPO_4$	-	10
NH_4NO_3	-	90
Fe-NaEDTA	-	5

2.2 Culture en pot du mélange phosphogypse-terreau

Le PG étudié provient du terril de stockage de M'Dhilla situé derrière l'usine de production d'engrais phosphatées en Tunisie (N 34°18.5097 E 8°46.3766). Les caractéristiques physico-chimiques du phosphogypse (PG) sont présentées dans le Tableau 5.2. Le terreau universel utilisé est un produit commercialisé à base de tourbe brune et blonde, d'écorces compostées, d'hortifibre®, de fumier et d'engrais. Les caractéristiques physico-chimiques du terreau sont présentées dans le Tableau 5.3.

Les deux substrats ont été mélangés à raison de 15% de PG et 85% de terreau (v/v). L'humidité du mélange a été déterminée selon la norme NF ISO 11465 (AFNOR 1994) et amenée à 65% de sa capacité de rétention (déterminée selon la norme ISO DIS 11269-2 (2006)). Puis le mélange a été laissé reposer pendant plusieurs jours jusqu'à la stabilisation du pH_{eau} (mesuré selon la norme NF ISO 10390 :2005 (ratio sol : eau (m:v) de 1:5). Les pots de mélange PG-terreau ont été préparés ensuite à raison de 250 g de mélange par pot.

Tableau 5.2. Caractéristiques physico-chimiques du phosphogypse (PG) tunisien utilisé (prélevé à M'dhilla-Gafsa). Chaque valeur est la moyenne arithmétique ± écart-type de 3 réplicats.

Paramètres	**PG**
pH	2,38 ± 0,02
Humidité (%)	21,30 ± 0,04
P_2O_5 total (%)	0,71 ± 0,01
C Organique (%)	0,22 ± 0,05
SO_4^{2-} (%)	49, 87 ± 0,03
Ca^{2+} (%)	20,64 ± 0,93
SiO_2 (%)	1,42 ± 0,03
Cd (mg/Kg)	2,2 ± 0,60
Sr (mg/Kg)	685,10±37,20
Ce (mg/Kg)	27,70 ± 1,20
La (mg/Kg)	30,20 ± 0,80
Nd (mg/Kg)	31,20 ± 0,70
Y (mg/Kg)	27,70 ± 0,60

Tableau 5.3. Caractéristiques physico-chimiques du Terreau selon le fournisseur (Florentaise CTRU70-St Mars du Désert-France).

Paramètres	Valeurs moyennes
Matière sèche	35%
Matière organique	65%
Conductivité	45 mS/m
Capacité de rétention de l'eau	650 mL/l
Engrais NPK 14-16-18	1,2 kg/m^3
pH	6,5

2.3 Culture des souches et préparation des inoculas bactériens

2.3.1 Description des souches

Trois souches ont été utilisées pour la bioaugmentation du mélange PG-terreau. Deux souches isolées à partir de sols collectés aux alentours des terrils des PG en Tunisie dans la région de Sfax (34°10' North 10° 43'East) : *Bacillus cereus* (S3B1) et Md'hilla (34°10' North 8°45' East) : *Bacillus cereus* (M1B4). Les deux souches ont été pré-sélectionnées pour leurs capacités à produire des métabolites jouant un rôle dans la mobilisation des ETM et la promotion de la croissance des plantes (effet PGPR) (Jalali et al. soumis). Une souche de *Pseudomonas xanthamarina* ULPAs1 (Koechler et al., 2015) provenant de sédiments d'origine minière a également été testée, provenant d'une collection de bactéries extraites de sédiments contaminés en ETM, obtenue auprès de Didier Lièvremont, (UMR CNRS 7156 - Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie, Strasbourg).

2.3.2 Préparation des inoculas :

Les trois souche (*Bacillus cereus (*S3B1) et Bacillus *cereus* (M1B4) et *Pseudomonas xanthamarina*), conservées dans du glycérol 20 % à -80 °C, ont été pré-cultivées dans un milieu de TSB (Tryptic Soy Broth) stérile dilué au demi (TSB 1/2) 24 h à 28 °C. 1 ml de chaque pré-culture a ensuite été transféré dans 1000 ml de Milieu Liquide Minimum (MLM) et incubées 48 h à 28 °C.

La biomasse bactérienne a été récoltée par centrifugation à 7690 *g* pendant 10 min et le culot lavé 2 fois avec une solution de KCl stérile (9 g/L). Il a été ensuite repris dans la même solution de

façon à apporter les souches dans un volume de 1 ml avec une densité optique (DO) à 600 nm égale à 5. La DO a été mesurée avec un spectromètre UV-visible VARIAN Cary 50 Scan.

2.4 Expérimentation

2.4.1 Phytoextraction des ETM par *Trifolium pratense* et *Helianthus annuus :* culture en hydroponie

Après 60 jours de pré-culture pour le trèfle et 28 jours pour le tournesol en milieu Hoagland les plants de trèfle et de tournesol ont été exposés à un mélange de 6 ETM (Cd, Ce, La, Nd, Sr, Y) dans un milieu de culture LPP (Low phosphate, low pH : Fischer *et al.* 2014) (composition Tableau 5.1). Les ETM testés ont été apportés sous forme de sels de nitrate. Les concentrations correspondent aux teneurs en ETM extractibles au $CaCl_2$ et à l'EDTA dans les PG (Tableau 5.4). Une modélisation par PHREEC a validé l'absence de précipités aux deux concentrations étudiées. Chaque modalité a été testée en 4 réplicats et un témoin sans apport d'ETM en 3 réplicats. Pour chaque réplicat, un plant de tournesol (3 pour le trèfle) afin d'obtenir assez de biomasse sèche pour la minéralisation finale, a été transféré dans un pot à couvercle en polyéthylène haute densité (HDPE) d'un litre (lavé à l'acide nitrique 2%), rempli avec 1 L de milieu LPP (250 ml, pour le trèfle). Les pots ont été couverts avec du papier aluminium pour les opacifier et éviter le développement de cyanobactéries. Au cours de l'exposition, le niveau du milieu de culture a été ajusté tous les 2 à 3 jours avec du milieu LPP sans ETM et le pH est ajusté à 5. Les plantes ont été récoltées au bout de 14 jours d'exposition au mélange d'ETM.

Tableau 5.4. Concentrations des éléments traces métalliques (ETM) testées pour chaque extractant : A : concentration correspondant à celle de l'extrait au $CaCl_2$ du phosphogypse et B : concentration correspondant à celle de l'extrait à l'EDTA.

ETM	Concentration en métal (mg/L)	
	A	**B**
$Cd(NO_3)_2$	0,5	2
$Sr(NO_3)_2$	20	80
$Ce(NO_3)_3$	0,5	5
$La(NO_3)_3$	0,25	1
$Nd(NO_3)_3$	0,2	2
$Y(NO_3)_3$	0,25	2,5

2.4.2 Phytoextraction couplée à la bioaugmentation des ETM : Culture en pot

Les pots de mélange PG-terreau ont été préparés à raison de 250 g du mélange PG-terreau à 65% de la capacité de rétention en eau. Après la pré-culture en hydroponie dans le milieu Hoagland jusqu'au stade 4 paires de feuilles, soit environ 21 jours pour le tournesol et 45 jours pour le trèfle, les plants les plus développés sont sélectionnés. Un plant pour le tournesol et 4 plants pour trèfle violet ont été repiqués dans chaque pot. Les pots ont été placés ensuite en phytotron avec un cycle 16 h de jour à 20°C/ 8 h de nuit à 18°C ± 3 °C, une humidité de 70 % et un éclairage de 138 µmol photons/m²/s. La masse des pots est maintenue à 65% de la capacité au champ. Après chaque pesée, les pots sont remis aléatoirement dans la chambre de culture afin de tenir compte de l'hétérogénéité (température, éclairement, humidité) au sein de la chambre de culture. La durée de culture des deux plantes est de 4 semaines.

Les suspensions bactériennes ont été ajoutées une fois par semaine après le repiquage des plantes. Elles ont été réparties dans chaque pot à raison de 1 mL par pot. Le mélange PG-terreau a été ensuite homogénéisé manuellement à l'aide d'une spatule stérile. Les pots non inoculés ont été homogénéisés de la même façon après ajout de 1 mL de KCl.

Trois modalités sont testées : i) Mélange PG-terreau non planté inoculé (bioaugmenté) (NPI), afin d'évaluer l'effet de la bioaugmentation sur la spéciation des ETM ; ii) Mélange PG-Terreau planté avec *H. annus* ou *T. pratense* non inoculé (PNI) pour évaluer l'efficacité de la phytoextraction des ETM par ces plantes ; iii) Mélange PG-terreau planté avec *H. annus* ou *T.*

pratense inoculé (PI) avec chacune des souches sélectionnées, afin d'évaluer l'effet de la bioaugmentation sur la phytoextraction.

2.5 Récolte des échantillons

Après 21 jours de culture en hydroponie pour le tournesol et 45 jours pour le trèfle et 4 semaines de culture en pot, les plantes ont été récoltées en séparant parties aériennes (PA) et parties racinaires (PR). Les PA et PR ont été soigneusement rincées plusieurs fois à l'eau du réseau puis à l'eau désionisée et enfin à l'EUP. Les masses fraîches récoltées ont été pesées puis les échantillons ont été séchés à 40°C jusqu'à une masse constante. Le support de culture a été également récolté. Un prélèvement de 40g a été séché à 40 °C jusqu'à une masse constante. Pour les cultures en hydroponie, 10 mL de milieu de culture sont prélevés, filtrés à 0,2 µm et acidifiés avec 30 µL d'HNO3 65 %.

2.6 Analyses

2.6.1 Analyse des Eléments Trace Métalliques totaux dans les supports de culture et les plantes

La teneur totale en ETM a été déterminée selon la norme ISO 11464 (AFNOR 2006), Après séchage et broyage à 250 µm à l'aide d'un boyeur à battoir (A 11 basic et battoir A 11.1 de IKA, Staufen, Germany). Une prise d'essai de 0.50 ± 0,01 g d'échantillon du mélange PG-terreau sec a été introduite dans un réacteur en téflon de 55 mL (CEM µWave, Orsay, France) dans lequel ont été ajoutés 3 mL de HCl 37 % (v/v) et 9 mL de HNO_3 65 % (v/v). La mise en solution par attaque acide a été réalisée dans un four à micro-ondes CEM MARS 6 (Microwave Accelerated Reaction System de CEM µWave, Orsay, France)**.** Une fois l'échantillon refroidi, le minéralisat a été repris dans une fiole jaugée avec de l'eau ultra pure (EUP) dont le volume a été ajusté à 25 mL. Le liquide a été ensuite filtré sur du papier filtre Whatman N° 40 ou Durieux N°111, puis récupéré et conservé dans des tubes en polypropylène (PP) résistants à l'acide (DigiTUBEs de SCP Science, Courtaboeuf, France).

Tous les échantillons végétaux récoltés ont été minéralisés à l'aide d'un four à micro-ondes CEM MARS 6 par attaque acide en ajoutant à une prise d'essai de 0,5 g, 8 ml d'acide nitrique (HNO_3 65 %) et 3 ml d'eau oxygénée (H_2O_2 30 %). Comme pour le mélange PG-terreau, le minéralisât est transféré dans une fiole jaugée où le volume est ajusté à 25 mL avec de l'EUP.

Le liquide est filtré sur du papier filtre Whatman n° 40, puis récupéré dans des tubes en polypropylène résistant à l'acide.

Les analyses des ETM dans les supports de culture et dans les plantes ont été réalisées par ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy) avec un iCAP 6300 DUO Radial associé à un passeur automatique CETAC ASX-520 de Thermo-Fischer SCIENTIFIC (Illkirch, France). Les longueurs d'ondes auxquelles sont analysés les éléments étudiés ont été les suivantes : Cd (226,502 nm) et Sr (346,446), Ce (404,076), La (379,478), Nd (378,425) et Y (242,220 et 371,030). Le standard végétal Mixed Polish Herbs (INCT-MPH-2) a été utilisé pour chaque séance d'analyse afin de valider les résultats obtenus.

2.6.2 Analyse des Eléments Trace Métalliques totaux et des extraits au $CaCl_2$ et EDTA du mélange PG-terreau

L'extraction de la fraction dite mobile du Cd, Sr et des terre rares (Ce, Y, La, Ne) du mélange PG-terreau a été réalisée selon la norme NEN 5704 des Pays Bas qui utilise une solution saline de chlorure de calcium $CaCl_2$ (0,01 M) capable d'extraire les métaux présents dans la solution du sol et les formes facilement échangeables. Une prise d'essai de 1 g (± 0,01 g) du mélange PG-terreau sec broyé et tamisé à 250 µm a été introduite dans un tube de 15 mL auquel est ajouté 10 mL de $CaCl_2$ (0,01 M) (ratio : 1/10 (m/v)). Les tubes ont été ensuite agités pendant 24h à température ambiante. Après agitation, les tubes ont été centrifugés pendant 8 min à 7690 g puis le surnageant de chaque fraction a été récupéré à l'aide d'une seringue de 10 mL, filtré sur membrane acétate de cellulose à 0,22 µm et acidifié avec une goutte (<10µL) de HNO_3 concentré (65%). Chaque extrait a été conservé à 4 °C avant analyse. Tous les réactifs utilisés ont été de qualité analytique et les solutions sont préparées dans de l'eau ultra pure (EUP).

L'extraction de la Fraction potentiellement mobilisable se fait selon la norme NF X 31-120 (1992) qui utilise une solution de 1 M d'acétate d'ammonium (CH_3COONH_4) et 0.01 M de Na_2EDTA (pH= 7) à laquelle est ajouté 1 g du mélange PG-terreau sec broyé et tamisé à 250 µm (ratio : 1/10 (m/v)). L'extraction a été réalisée de la même façon que celle au $CaCl_2$.

2.7 Traitement des résultats

2.7.1 Indices d'accumulation des éléments traces métalliques dans les végétaux

Les facteurs de Bioconcentration (FBC) et de Translocation (FT) ont été calculés ; FBC étant la teneur en ETM dans les parties aériennes de la plante (mg/kg MS) rapportée à la teneur totale du mélange PG-Terreau ou la solution de culture (mg/kg MS) et FT, la teneur en ETM dans les parties aériennes (mg/kg MS) rapportée à celle dans les parties racinaires (mg/kg MS).

2.7.2 Analyse Statistique

Les moyennes et les écart-types sont calculés par modalité.

Les données obtenues sont traitées avec le logiciel Microsoft Excel XLStat. Le test utilisé est l'analyse de variances (ANOVA), permettant une comparaison de plusieurs moyennes au seuil de 5 %. Dans le cas de différences significatives, cette dernière est suivie d'un test de Tukey, test permettant dřidentifier les différences significatives mises en évidence par l'ANOVA. Les groupes homogènes sont représentés sur les figures par les lettres a,b,c…

3 Résultats et discussion

3.1 Evaluation du potentiel d'accumulation des éléments traces métalliques par des plantes commerciales (*Trifolium pratense* et *Helianthus annuus)* en hydroponie

Les plantes commerciales, *Helianthus annuus* (tournesol) *et Trifolium pratense* (trèfle violet), ont été choisies dans cette étude en raison de leur biomasse élevée, de leur croissance rapide et de leur capacité à absorber les ETM ciblés dans notre étude, i.e., Cd et Sr (tournesol) (Turgut et al., 2004, Soudek et al., 2006, Andrade et al., 2008), Ce, La, Nd, et Y (trèfle violet) (Boisselet *et al.*, 2012). Elles sont utilisées dans les régions arides et les graines sont facilement disponibles. L'association de ces deux plantes permet de couvrir le spectre des ETM ciblés. Par ailleurs, la présence d'une légumineuse peut limiter le développement de mauvaises herbes et apporter de l'azote, ce qui pourrait rendre l'association trèfle-tournesol pertinente, à la fois sur le plan agronomique et parce que l'association de ces deux plantes couvre l'ensemble des ETM ciblés. La première partie des expérimentations porte sur l'évaluation du potentiel d'accumulation des ETM par le trèfle et le tournesol. Deux concentrations en ETM ont été

testées : l'une (« A ») correspondant à l'extrait au $CaCl_2$ de PG, i.e. fraction mobile à court terme et l'autre (« B ») à l'extrait à l'EDTA (fraction mobilisable à long terme). L'intérêt de choisir ces deux extractants est d'encadrer les quantités minimales et maximales des éléments étudiés qui peuvent être prélevés plus ou moins facilement par la plante. L'EDTA extrait 4 fois plus de Cd, Sr et La à 10 fois plus de Ce, Nd et Y que le $CaCl_2$ (Tableau 5.4).

Après 14 jours de culture en hydroponie de *H. annuus et T. pratense*, les concentrations des ETM dans les parties racinaires (PR) et les parties aériennes (PA) ont été mesurées (Figure 5.1). Pour chaque modalité, le facteur de translocation (FT), de même que le facteur de bioconcentration (FBC) ont été calculés (Tableau 5.5).

Les résultats de la Figure 5.1 montrent que tous les ETM étudiés pour les deux plantes ont été trouvés à des concentrations inférieures à la limite de quantification dans la solution de la culture sans ETM « T ». En présence du mélange d'ETM, les deux plantes sont capables de les accumuler dans leurs PR et également de les transloquer vers les PA.

Les concentrations en ETM dans les PR de *T. pratense* augmentent (mais moins que proportionnellement) avec celles en solution. Quand la concentration d'exposition est multipliée d'un facteur 4 pour Cd, Sr et La et de 10 pour Ce, Nd et Y dans le milieu (Tableau 5.5), les concentrations moyennes retrouvés dans les PR augmentent significativement d'un facteur 2,40 pour le Cd (de 68,7 à 165,38 mg/kg MS), 2,91 pour le Sr (de 645,86 à 1884,44 mg/kg MS), 2,25 pour le La (de 51,06 à 115,06 mg/kg MS) 3,32 pour le Ce (de 69,8 à 321,82 mg/kg MS), 4 pour le Nd (de 35,18 à 142,21 mg/kg MS) et 1,10 pour l'Y (de 42 à 46,33 mg/kg MS). Les concentrations dans les PA augmentent lorsqu'on passe des concentrations d'exposition A à B mais seulement pour Cd, Ce et Sr. De même pour celles d'*H. annus*, les concentrations en ETM dans les PR augmentent avec la concentration dans le milieu mais moins que proportionnellement : Cd (de 95,45 à 117,46 mg/kg MS), Sr (de 1237,11 à 2066,76 mg/kg MS), La (de 45,74 à 68,13), Ce (61,93 à 157,89), Nd (de 31,27 à 81,02), Y (de 39,81 à 47,51).

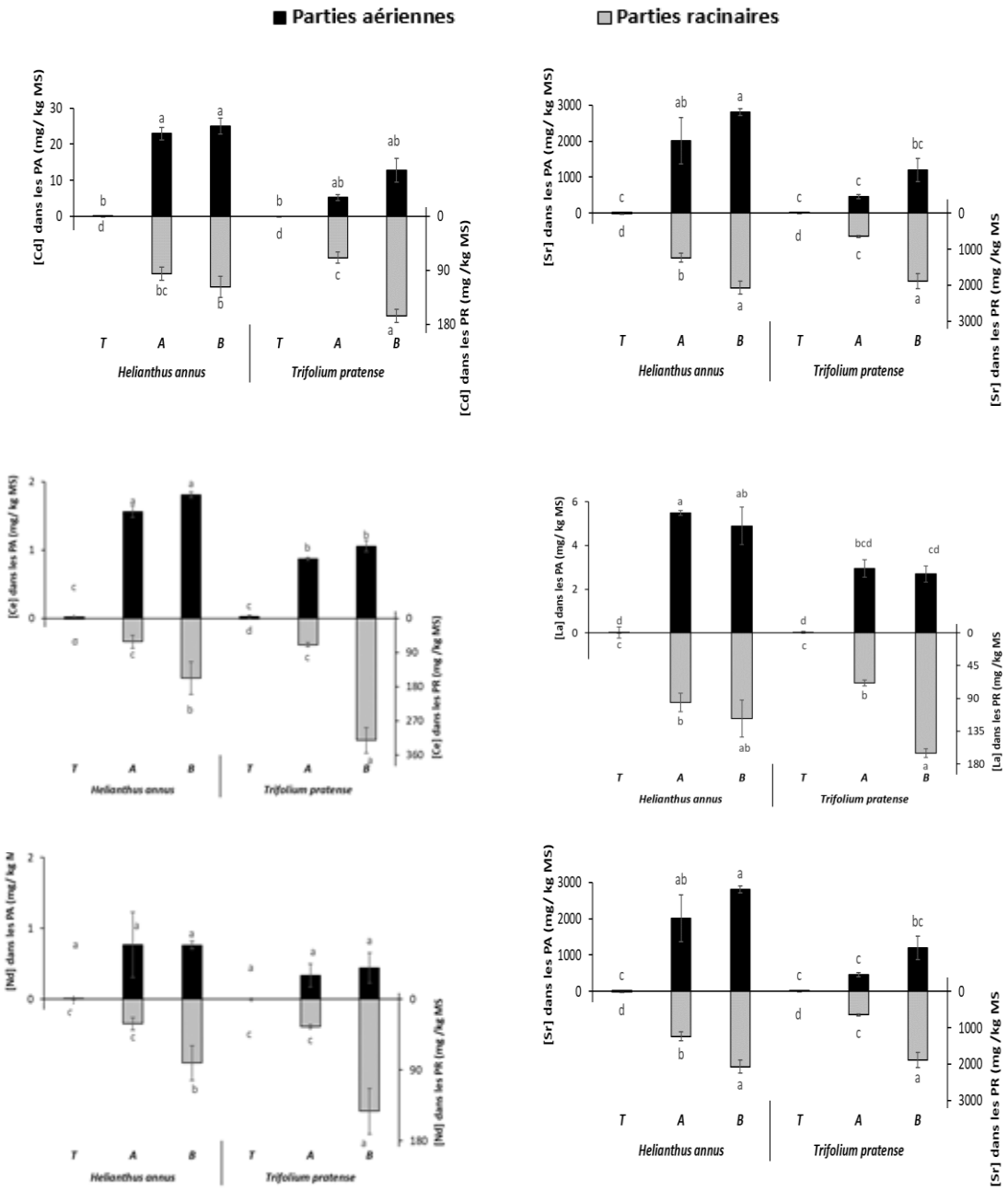


Figure 5.1. Concentrations des éléments traces métalliques (ETM) en mg/Kg MS dans les parties aériennes (PA) et les parties racinaires (PR) chez *Trifolium pratense* et *Helianthus annuus* cultivées en hydroponie en milieu Low phosphate, low pH (LPP).

En revanche, les concentrations dans les PA n'augmentent pas significativement lorsqu'on passe des concentrations d'exposition A à B, ce qui pourrait s'expliquer par la durée d'exposition assez courte (14 jours).

Les FBC sont largement supérieurs à 1 pour Sr, La et Cd (respectivement 22,81 ; 11,80 et 10,37 chez le trèfle et 100,29 ; 21,99 et 74,32 chez le tournesol) en raison de la biodisponibilité totale des ETM en solution. Lorsqu'on passe des concentrations d'exposition A à B, la diminution du FBC est environ 2 fois plus importante avec le tournesol comparé au trèfle, qui accumule par ailleurs quasiment la même quantité d'ETM, quelle que soit la concentration en solution, ce qui tend à démontrer que le tournesol régule l'accumulation des ETM contrairement au trèfle. Le facteur de translocation (FT) est utilisé pour estimer l'efficacité de la phytoextraction (Brooks et al., 1998) puisque seul les ETM des parties récoltables (PA) peuvent être valorisés. Le Tableau 5.5 montre que les facteurs de translocation (FT) du trèfle et du tournesol présentent des valeurs inférieures à 1 pour tous les ETM, sauf pour le Sr accumulé par le tournesol avec la solution A (1,62) et que les valeurs de FT les plus élevée s'observent pour Sr (0,55 et 0,71 pour le Trèfle violet et 1,36 et 1,62 pour le tournesol). Le trèfle et le tournesol ne sont pas réputées être des plantes hyperaccumulatrices ce qui se confirme dans nos conditions d'étude.

H. annus accumule environ 2 à 4 fois plus de Sr dans ses PA (selon la concentration en solution) que *T. pratense.* Pour Ce, La, Nd et Y, *H. annus* en accumule 2 fois plus quelles que soient leurs concentrations en solution.

Tableau 5.5. Concentration (en mg/Kg MS) et quantité (en mg) des éléments traces métalliques (ETM) dans les parties aériennes (PA) et les parties racinaires (PR) et calcul des Facteurs de Bioconcentration (FBC) et de Translocation (FT) et % de dépollution de ces ETM dans (a) *Trifolium pratense* et (b) *Helianthus annuus* cultivées pendant 14 jours en hydroponie en milieu Low phosphate, low pH (LPP), T : solution de culture sans ETM. Chaque valeur est la moyenne arithmétique ± écart-type de 4 réplicas.

(a) *Trifolium pratense*

(a)		ETM (mg/kg)			ETM (mg)				
Modalité	**ETM (mg/kg)**	**PA**	**PR**	**Solution de culture**	**PA**	**PR**	**FT**	**FBC**	**% dépollution**
A	**Cd**	5,19±0,89	68,7±9,33	0,081±0,011	0,01±0,00	0,02±0,00	0,08±0,03	10,37±1,78	2.98±0.6
	Ce	0,87 ±0,22	69,8 ±6,10	0,011±0,001	0,00±0,00	0,02±0,00	0,01	1,74±0,44	3.35±1.08
	La	2,95±0,40	51,06 ±4,25	0,016 ±0,002	0,00±0,00	0,01±0,00	0,06±0,01	11,80±1,60	17.45±3.19
	Nd	0,34 ±0,16	35,18±2,54	0,010 ±0,008	0,01±0,00	0,00±0,00	0,01±0,00	1,63±0,32	1.36±0.63
	Y	0,02 ±0,13	42±3,25	0,010 ±0,003	0,00±0,00	0,01±0,00	0,001±0,00	0,09±0,18	0.12±2.15
	Sr	456,2 ±57	645,86±26,53	6,548±0,438	0,51±0,10	0,15±0,03	0,71±0,11	22,81±2,85	5.56±1.08
B	**Cd**	12,75±3,26	165,38±10,79	0,346±0,021	0,02 ±0,02	0,04±0,01	0,08 ±0,02	6,38 ±5,00	2.39±0.69
	Ce	1,06±0,38	321,82±63,63	0,012±0,001	0,00±0,00	0,07±0,02	0,003±0,01	0,21±0,08	0.44±0.18
	La	2,7±0,37	115,06±6,05	0,016 ±0,001	0,02±0,01	0,00±0,00	0,03±0,01	2,70±0,37	4.90±0.55
	Nd	0,44±0,21	142,21 ±28,92	0,015 ±0,004	0,00±0,00	0,03±0,00	0,003±0,00	0,27±0,11	0.42±0.21
	Y	0,22±0,10	46,33±8,52	0,008 ±0,002	0,00±0,00	0,01±0,00	0,005±0,01	0,09±0,06	0.61±0.41
	Sr	1197,3 ±33,5	1884,44 ±206,42	23,641 ±0,703	1,27±0,43	0,41±0,09	0,55±0,18	12,97±4,01	4.19±1.40

(b) *Helianthus annuus*

(b)		ETM (mg/kg)			ETM (mg)				
Modalité	**ETM (mg/kg)**	**PA**	**PR**	**Solution de culture**	**PA**	**PR**	**FT**	**FBC**	**% dépollution**
A	**Cd**	22,94±1,749	95,45±11,23	0,045±0,019	0,04±0,01	0,05±0,01	0,23±0,07	74,32±7,33	24.95±8.09
	Ce	1,56±0,885	61,93±17,02	0,012 ±0,002	0,00±0,00	0,04±0,00	0,02±0,01	3,12±1,77	3.99±1.59
	La	5,50 ±1,107	45,74±12,52	0,013±0,0007	0,01±0,00	0,03±0,00	0,12±0,02	21,99±4,43	20.62±1.62
	Nd	0,77±0,462	31,27±8,01	0,013±0,006	0,00±0,00	0,02±0,00	0,02±0,01	3,85±2,31	2.58±1.55
	Y	0,55±0,694	39,81±10,55	0,005±0,005	0,00±0,00	0,02±0,00	0,01±0,01	2,21±2,78	3.28±3.77
	Sr	2005,9±639,459	1237,11±120,06	3,577±0,54	3,56±0,58	0,74±0,15	1,62±0,48	100,29±31,79	41.52±6.70
B	**Cd**	25,62±2,239	117,46±17,33	0,074±0,007	0,07 ±0,02	0,07±0,02	0,21±0,07	12,81±6,55	19.44±4.52
	Ce	1,81±1,443	157,89±43,06	0,012±0,003	0,09±0,00	0,09±0,03	0,01±0,01	0,36±0,29	0.80±0.55
	La	4,89±0,860	68,13±25,32	0,013±0,0003	0,01±0,00	0,04±0,02	0,08±0,03	4,89±0,86	13.33±3.53
	Nd	0,76±1,053	81,02±21,89	0,011±0,007	0,00±0,00	0,05±0,02	0,01±0,01	0,38±0,53	0.65±0.81
	Y	0,29±0,579	47,51±14,40	0,010±0,007	0,00±0,00	0,03±0,01	0,00±0,01	3,51±7,51	0.37±0.56
	Sr	2805,7±987,164	2066,76±181,12	7,885±0,718	4,69±0,17	1,32±0,65	1,36±0,45	35,07±12,34	31.59±1.17

Remarque : après 14 jours de culture en hydroponie les concentrations des différents ETM dans la solution de culture sans apports d'ETM (T) sont inférieurs à la limite de détection.

* % dépollution = (quantité en ETM dans les parties aériennes / quantité du métal initiale en solution) ×100

3.2 Phytoextraction couplée à la Bioaugmentation des élements traces métalliques

L'objectif de cette expérimentation est d'évaluer l'effet de la bioaugmentation du mélange de PG-terreau sur l'efficacité de la phytoextraction des ETM par *T. pratense* et *H. annus*. Les deux souches de *Bacillus cereus* (S3B1 et M1B4), précédemment isolées de sols en contrebas de terrils de PG (Jalali et al. soumis), et une souche témoin *Pseudomonas xanthamarina* S11 (Koechler *et al*., 2015) provenant de sédiments d'origine minière ont été inoculées avec ces deux plantes dans des pots de mélange PG-terreau.

Les deux substrats ont été mélangés à raison de 15% de PG et 85% de terreau (v/v) puisque les PG ont une teneur en matière organique inférieure à 1 % et que purs, ils peuvent présenter une toxicité pour les plantes (Khoudi et al., 2013, Ayadi *et al.*, 2014 ; Elloumi et al. 2015). Le pourcentage de PG a été choisi suite à un test de phytotoxicité avec un mélange PG-terreau à deux ratios PG-terreau : 25% PG + 75% Terreau et 15% PG + 85% Terreau. Un témoin sans PG a aussi été préparé. Avec 25 % de PG, les plants ont montré des signes de flétrissement dès la deuxième journée après repiquage. Ces signes sont dus à la toxicité du PG. A une concentration de 15% de PG, les plants ne souffrent pas de toxicité bien que leur croissance soit ralentie.

Après 21 jours de préculture pour le tournesol et 45 jours pour le trèfle en hydroponie et 4 semaines de culture en pot avec le mélange PG-Terreau bioaugmenté (PI) ou non (PNI), les plantes ont été récoltées.

On remarque que les niveaux d'accumulation des ETM par les plantes cultivées sur le mélange PG-terreau (figure 5.2) sont beaucoup plus faibles que lorsqu'elles sont cultivées en hydroponie (concentration A) (figure 5.1) : pour les PA (vs. PR), environ d'un facteur 5,19 (68,70) pour Cd, 2,95 (51,06) pour La, 0,34 (48,19) pour Nd, 6,90 (1,34) pour Sr, 0,02 (42) pour Y. Les niveaux d'accumulation des ETM sont proches pour le tournesol et le trèfle sauf pour Ce avec une concentration dans les PA (vs. PR) du trèfle environ 20 fois (10 fois) supérieure à celle du tournesol. Ces niveaux réduits d'extraction par les plantes, comparés à ceux des cultures en hydroponie, s'expliquent par la faible disponibilité des métaux.

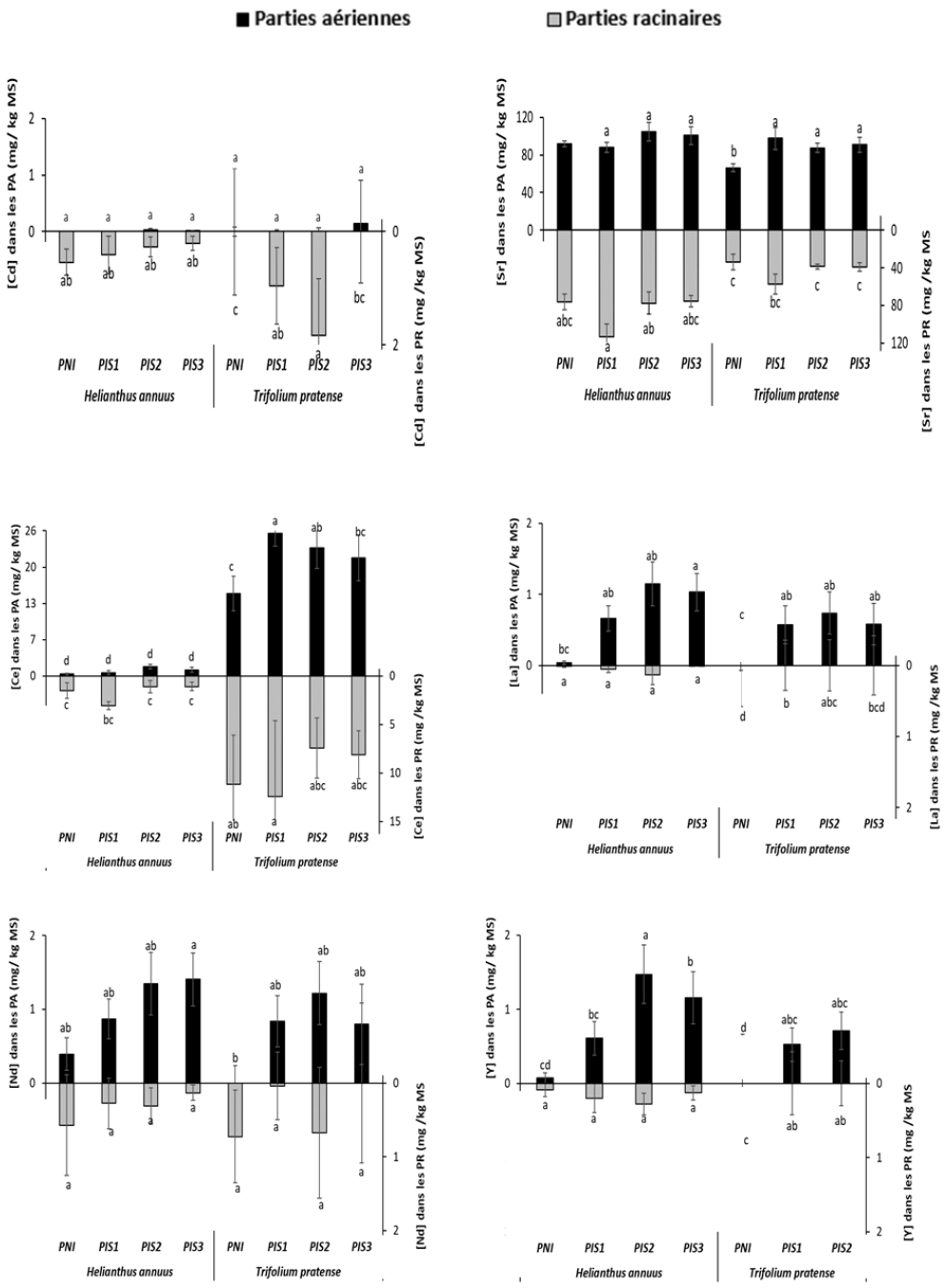


Figure 5.2. Concentration des éléments traces métalliques (ETM) en mg/Kg MS dans les parties aériennes (PA) et les parties racinaires (PR) chez *Trifolium pratense* et *Helianthus annuus* cultivées sur un mélange PG -Terreau bioaugmenté (PI) ou non (PNI) par les 3 souches : *Bacillus cereus* S3B1(PIS1) ; *Bacillus cereus* M1B4 (PIS2) et *Pseudomonas Xanthamarina* (PIS3).

Les teneurs en ETM (Cd, Ce, La, Nd, Sr et Y) extractible au $CaCl_2$ et à l'EDTA après 4 semaines de culture sont présentées dans la Figure 5.3. Les résultats montrent que les ETM ne sont quasiment pas extraits (<LOD) par la solution d'extraction au $CaCl_2$, sauf Sr pour lequel les concentrations avoisinent 200 mg/Kg MS), quelle que soit la plante. L'EDTA extrait une part plus importante d'ETM que le $CaCl_2$, quel que soit l'ETM et la plante considérée. Des études ont montré une augmentation d'absorption des ETM par des plantes cultivées sur les résidus miniers tel que le PG comparé à une culture sur sol : *Cynodon dactylon, Hierochloe repens, Dichanthium ischaemum* and *Elymus (Agropyron) repens* (Komnitsas et al., 1999) et *Elymus repens* (Petrisor et al., 2004) car les résidus contiennent plus de métaux biodisponbiles que le sol.

On ne voit pas d'effet significatif de la bioaugmentation sur les teneurs en ETM extractibles à l'EDTA sauf des tendances pour Cd avec le trèfle : dans les modalités NPI (en absence de trèfle) comparée à NPNI, la bioaugmentation augmente les teneurs moyennes des différents ETM du mélange PG-Terreau. Dans la modalité (PI), la bioaugmentation a légèrement augmenté les concentrations moyennes en métaux extrait à l'EDTA du mélange PG-Terreau. Par exemple, la teneur en Cd extrait à l'EDTA augmente de 0,27 mg/kg dans le mélange PG-Terreau non planté et non bioaugmenté à 0,28 en présence de trèfle et à 0,36 mg/kg en inoculant le mélange par M1B4.

Les souches M1B4 et ULPAS1 augmentent en moyenne les teneurs en Sr dans les PA d'*H. annus* (104, 66 et 100, 63 mg/kg MS comparées à celles du témoin (91,64 mg/kg MS) (Figure 5.2). La souche S3B1 augmente la concentration moyenne en Sr des racines (113,63 mg/Kg contre 76,39 mg/kg pour le témoin non bioaugmenté). Avec *T. pratense*, les trois souches augmentent significativement les teneurs en Sr dans les PA (66,15 mg/kg MS dans le témoin non bioaugmenté à 87,40 pour M1B4 et 90,81 mg/kg MS pour ULPAS1 et 97,65 mg/kg MS pour S3B1). La souche S3B1 augmente par ailleurs les teneurs moyennes en Sr dans les.

L'ajout des souches isolées (S3B1, M1B4) et la souche témoin (ULPAS1) réduisent en moyenne les teneurs en Nd dans les PR de *H. annus*, comparées à celles du témoin, respectivement 0,28 ; 0,31 et 0,13 mg/kg MS contre 0,57 mg/kg MS et de *T. pratense*, respectivement, 0,04 ; 0,68 et <LOD contre 0,73 mg/kg MS.

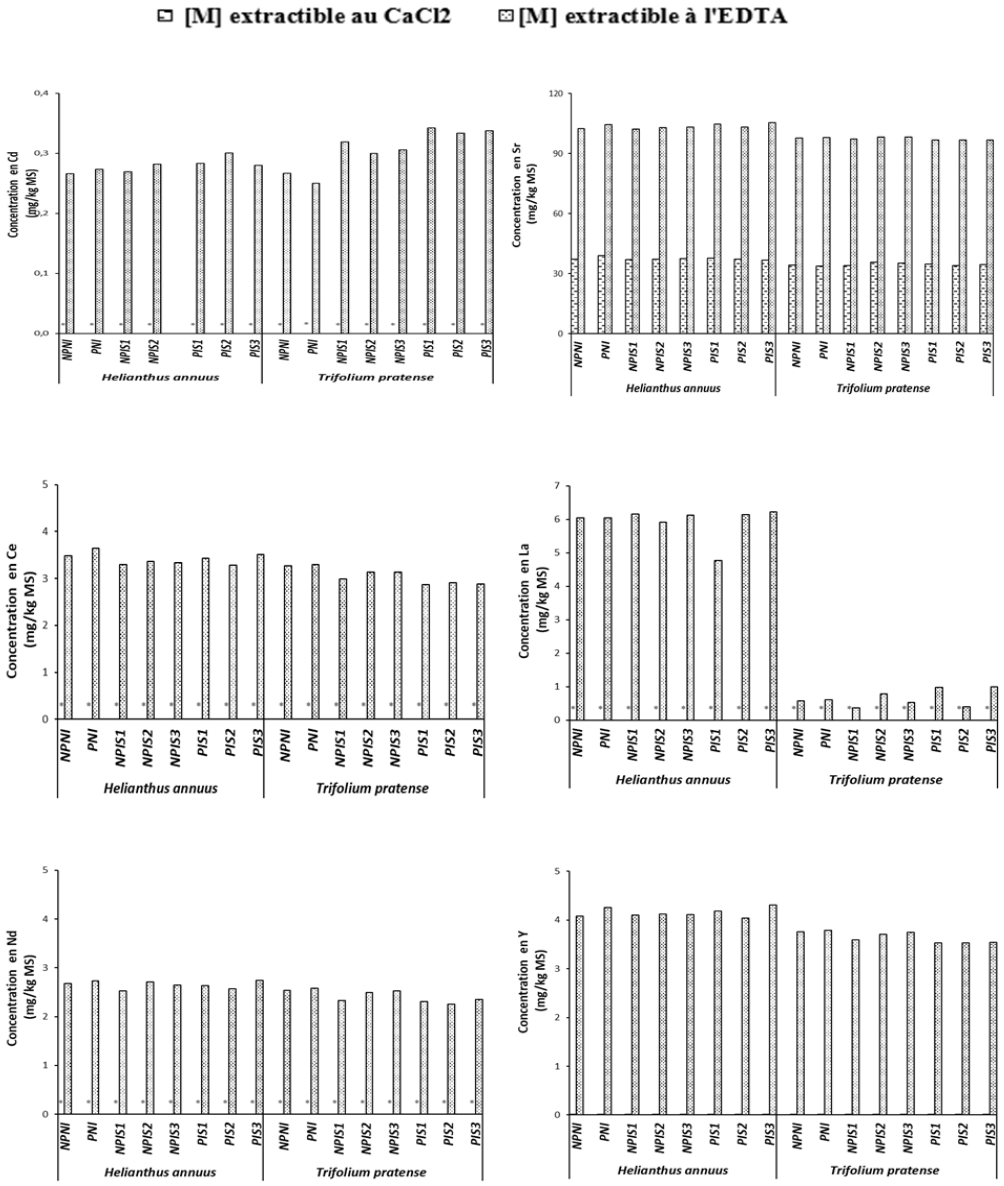


Figure 5.3. Concentration des éléments traces métalliques (ETM) Totaux, extractibles au $CaCl_2$ et à l'EDTA en mg/Kg du mélange PG-Terreau après 4 semaines d'incubation : non planté inoculé (bioaugmenté) avec les 3 souches : *Bacillus cereus* S3B1(NPIS1) ; *Bacillus cereus* M1B4 (NPIS2) et *Pseudomonas xanthamarina* (NPIS3) ; planté avec *Helianthus annus* ou *Trifolium pratense non inoculé (PNI) ; planté* avec *Helianthus annus* ou *Trifolium pratense inoculé avec* les 3 souches : *Bacillus cereus* S3B1(PIS1) ; *Bacillus cereus* M1B4 (PIS2) et *Pseudomonas xanthamarina* (PIS3) plus un témoin non planté non inoculé (NPNI).

A l'inverse, en présence de chacune des 3 souches S3B1, M1B4 et ULPAS, 10,84 ; 1,22 et 0,80 mg Nd/kg de MS sont retrouvés dans les PA du trèfle violet et 0,87 ; 1,34 et 1,40 mg/kg de MS de tournesol comparés aux teneurs dans les témoins non inoculés (0,39 mg/Kg MS pour le tournesol, <LOD pour le trèfle).

La bioaugmentation augmente significativement les teneurs en Cd des PR de trèfle pour la souche S3B1 et M1B4 (0,72 et 1,37 mg/Kg respectivement comparé à < LOD pour PNI). Ces deux mêmes souches plus ULPAS augmentent significativement, pour les deux premières (uniquement en moyenne pour ULPAS) les teneurs en Ce dans les PA du trèfle (25,49 ; 22,97 et 21,13 mg/Kg respectivement comparé à 14,78 pour PNI. Mêmes conclusions pour La et Y absorbés par le tournesol et le trèfle, où les teneurs sont supérieures au témoin PNI avec les trois souches bactériennes (augmentation d'un facteur 0,52 à 1,47 comparé au témoin PNI). En résumé, les concentrations en Ce, Nd, Sr, et surtout La et Y sont plus élevées dans les PA que dans les PR, aussi bien pour le tournesol que pour le trèfle. Les concentrations en La et Y sont très faibles dans les PR de Tournesol et de trèfle, quelle que soit la modalité. On observe le contraire pour Cd (teneurs plus élevées dans les PR). L'ajout des bactéries, en particulier les isolats bactériens S3B1 et M1B4 (tous deux appartenant à l'espèce *Bacillus cereus*) augmente les teneurs dans les PA surtout pour Ce (trèfle) La, Nd, Y. Ces résultats pourraient s'expliquer par l'ajout de bactéries d'un côté capables d'empêcher le prélèvement des ETM phytotoxiques (e.g. Cd) par des mécanismes de biosorption et/ou de bioaccumulation (Zaidi et al, 2006), d'autre part de favoriser l'absorption des métaux essentiels (e.g. terres rares : Ce, La, Nd et Y) par les plantes. Les effets stimulateurs des TR sur la croissance des plantes et la production de biomasse ont été décrits dans la littérature (Maheswaran 2001, Chang et al., 2008). Bien que le Sr ne soit pas un élément essentiel pour les plantes, il est prélevé, mobilisé et accumulé dans les végétaux parallèlement au Ca du fait de la similitude de leur structure chimique. La distribution des différentes formes de Sr dans les plantes est moins connue que celle du Ca.

Les plantes et les micro-organismes qui leur sont associés sont capables de mobiliser ou d'immobiliser les ETM par la production des composés organiques de faible poids moléculaire (e.g. les exsudats racinaires, les phytosidérophores et les acides organiques), qui sont efficaces dans la dissolution des minéraux et la libération d'éléments traces fixés dans les sols afin de les rendre accessibles. Ces composés chimiques sont impliqués par conséquent dans l'augmentation de leur prélèvement par la plante et leur translocation vers les PA (Kabata-Pendias et Pendias,

2001 ; Braud et al., 2009). De façon similaire, plusieurs études menées avec du sol ont montré une augmentation des prélèvements en ETM en présence de bactéries (voir article de synthèse de Lebeau et al, 2008). Braud et al. 2009 ont par exemple mis en évidence que l'inoculation de maïs par *P. aeruginosa* augmentait l'incorporation de Cr et de Pb dans les PA de la plante.

La croissance des plantes sur le mélange PG-Terreau entre l'inoculation (ti) et la récolte (tf ; Figure 5.4) montre un effet significatif des souches *B. cereus* S3B1, M1B4 et *P.* x*anthamarina* sur la production de biomasse pour la PA de trèfle d'un facteur respectivemeent (3,7 ; 2,5 et 2) et la PR (2,9 ; 2,4 ; 1,5) et la croissance verticale d'un facteur (5 ;4,03 ; 3,22) pour la PA et (3,1 ; 2,25 et 1,85) par rapport au témoin non bioaugmenté (biomaase PA et PR respectivement : 1,86 et 0,38 g). Même si non signifiactif les souches testées ont augmenté la biomasse de tournesol qui passe de (PA :9,46 g et PR : 2,3 g) pour le témoin non bioaugmenté à PA :9,97 ; 10,12 et 9,85 g et PR : 2,31 ; 2,47 et 2, 35) respectivement avec les souches STB1, M1B4 et *P. xanthamarina.* Lebeau et al., (2008), ont montré que les bactéries PGPR augmentent dans la plupart des cas la production de biomasse d'un facteur allant de 1,1 à 2,6 pour les racines et de 1,2 à 4 pour les PA.

Le Tableau 5.6. montre que *T. pratense* inoculée par la souche M1B4 présente une augmentation significative de FT qui est > 1 pour le Ce (3,37) comparé au FT du témoin non bioaugmenté (1,72). Les valeurs de FBC obtenues pour tous les ETM étudiés sont inférieures à 1 pour le trèfle, à l'exception du Ce, pour toutes les modalités. Pour le tournesol, les FBC sont inférieurs à ceux du trèfle et sont tous inférieurs à 1. Même résultat pour les FT à l'exception du Sr pour les souches M1B4 (1,45) et ULPAS1 (1,42).

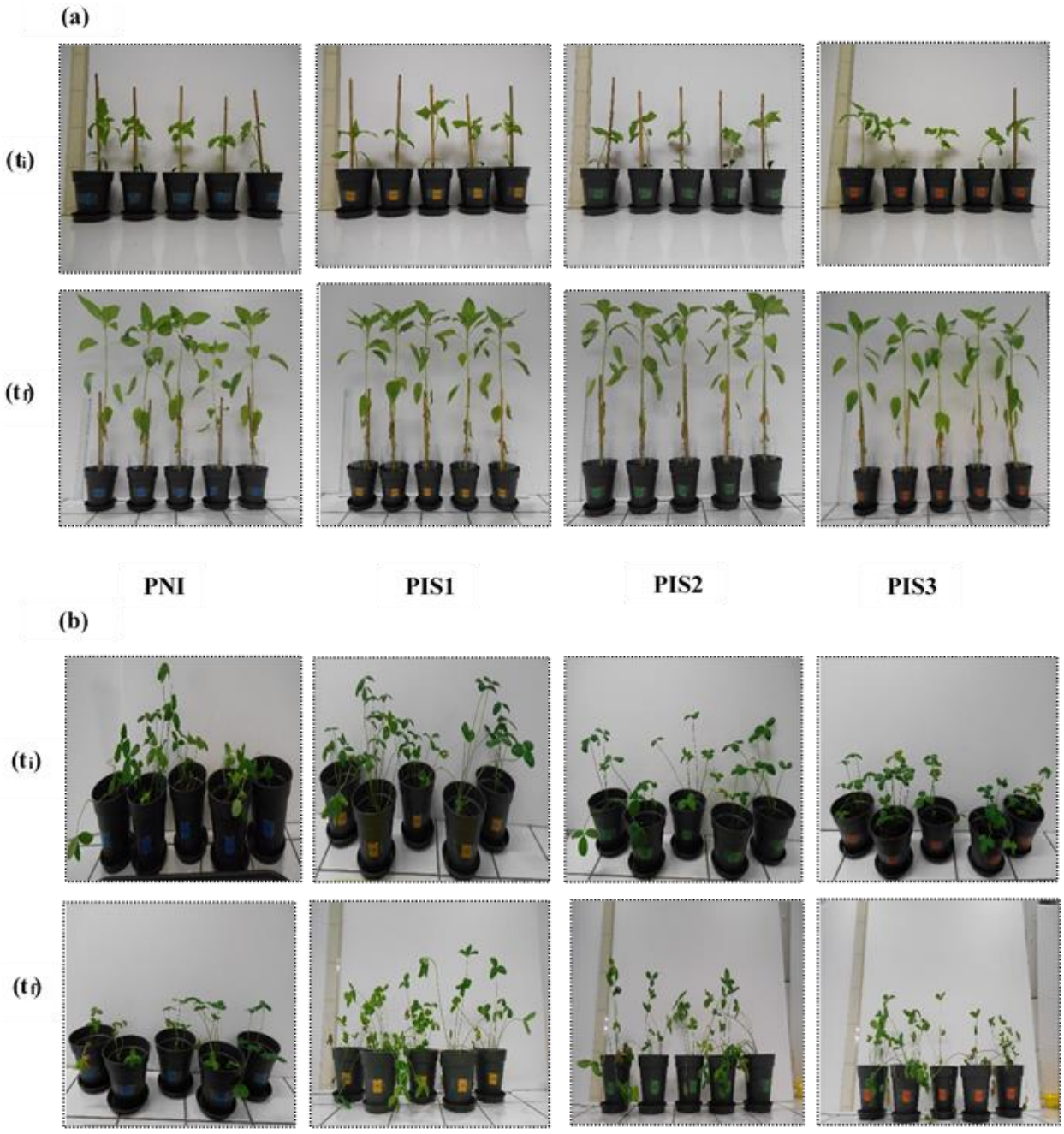


Figure 5.4. Effet des souches S3B1 (PIS1), M1B4 (PISS2) et *Pseudomonas xanthamarina* (PIS3) sur la croissance des plants de (a) tournesol et (b) de trèfle entre l'inoculation (ti) et la récolte après 4 semaines de culture (tf) sur le mélange PG-Terreau. PNI : planté avec *Helianthus annus* ou *Trifolium pratense non inoculé (non bioaugmenté)* ; PI *: planté* avec *Helianthus annus* ou *Trifolium pratense inoculé avec* les 3 souches : *Bacillus cereus* S3B1(PIS1) ; *Bacillus cereus* M1B4 (PIS2) et *Pseudomonas xanthamarina* (PIS3) plus un témoin non planté non inoculé (NPNI).

Tableau 5.6. Concentration des éléments traces métalliques (ETM) en mg/Kg MS dans les parties aériennes (PA) et les parties racinaires (PR) et calcul de Facteurs de Bioconcentration (FBC) et de Translocation (FT) chez *Trifolium pratense* et *Helianthus annuus* cultivées sur un mélange PG -Terreau bioaugmenté (PI) ou non (PNI) par les 3 souches : *Bacillus cereus* S3B1(PIS1) ; *Bacillus cereus* M1B4 (PIS2) et *Pseudomonas Xanthamarina* (PIS3) Chaque valeur est la moyenne arithmétique ± écart-type de 5 réplicas.

Plante		***Trifolium pratense***					***Helianthus annuus***				
Modalité	**ETM (mg/kg)**	**PA**	**PR**	**Mélange PG-Terreau à T0**	**FT**	**FBC**	**PA**	**PR**	**Mélange PG-Terreau à T0**	**FT**	**FBC**
PNI	**Cd**	*	*	0,30±0,05	*	*	0	0,41±0,37	0,59±0,15	*	*
	Ce	14,78±2,21	11,16±5,08	6,61±0,18	1,72±1,05	2,24±0,33	0,38±0,32	1,49±1,71	10,41±1,38	*	0,04±0,03
	La	*	*	6,04±0,08	0,24±0,13	*	0,03±0,05	0,01±0,03	14,01±0,23	*	0
	Nd	*	0,73±3,48	5,80±0,20	*	*	0,39±0,47	0,57±1,46	13,63±0,28	*	0,03±0,03
	Y	*	*	5,95±0,11	*	*	0,07±0,16	0,09±0,19	13,36±1,21	*	0,01±0,01
	Sr	66,15±9,13	34,05±17,51	115,57±1,98	2,43±1,08	0,57±0,08	91,64±6,77	76,39±18,08	229,74±19,18	1,27±0,34	0,40±0,03
PIS1	**Cd**	*	0,72±1,08	0,30±0,05	0,43±1,25	*	0	0,31±0,52	0,59±0,15	*	0
	Ce	25,49±6,24	12,42±7,84	6,61±0,18	2,74±1,29	3,86±0,94	0,64±0,72	3,05±0,87	10,41±1,38	0,20±0,24	0,06±0,07
	La	0,57±0,57	*	6,04±0,08	*	0,10±0,09	0,66±0,39	0,05±0,11	14,01±0,23	*	0,05±0,03
	Nd	0,84±0,74	0,04±0,98	5,80±0,20	*	0,14±0,13	0,87±0,58	0,28±0,74	13,63±0,28	*	0,06±0,04
	Y	0,52±0,48	*	5,95±0,11	*	0,09±0,08	0,61±0,48	0,20±0,41	13,36±1,21	*	0,05±0,04
	Sr	97,65±24,78	57,30±18,99	115,57±1,98	1,93±0,75	0,84±0,21	87,99±11,17	113,63±30,22	229,74±19,18	0,84±0,28	0,38±0,05
PIS2	**Cd**	*	1,37±1,60	0,30±0,05	*	*	0,03±0,06	0,20±0,27	0,59±0,15	*	0,05±0,10
	Ce	22,97±3,80	7,41±3,12	6,61±0,18	3,37±0,82	3,48±0,56	1,66±0,85	1,06±1,35	10,41±1,38	*	0,16±0,08
	La	0,74±0,63	*	6,04±0,08	*	0,12±0,10	1,15±0,67	0,14±0,28	14,01±0,23	*	0,08±0,05
	Nd	1,22±0,92	0,68±1,90	5,80±0,20	0,28±2,04	0,21±0,16	1,34±0,91	0,31±0,52	13,63±0,28	*	0,10±0,07
	Y	0,71±0,54	*	5,95±0,11	*	0,12±0,09	1,47±0,84	0,28±0,31	13,36±1,21	*	0,11±0,06
	Sr	87,40±10,75	38,75±5,42	115,57±1,98	2,28±0,29	0,76±0,09	104,66±21,49	77,36±25,74	229,74±19,18	1,45±0,35	0,46±0,09
PIS3	**Cd**	0,14±1,19	*	0,30±0,05	*	0,45±3,92	0,01±0,02	0,16±0,20	0,59±0,15	*	0,02±0,03
	Ce	21,13±4,12	8,10±2,48	6,61±0,18	2,89±1,08	3,20±0,62	1,15±0,96	1,08±0,94	10,41±1,38	*	0,11±0,09
	La	0,58±0,63	*	6,04±0,08	*	0,10±0,10	1,03±0,56	0	14,01±0,23	*	0,07±0,04
	Nd	0,80±1,17	*	5,80±0,20	*	0,14±0,20	1,40±0,77	0,13±0,22	13,63±0,28	*	0,10±0,06
	Y	0,59±0,62	*	5,95±0,11	*	0,10±0,10	1,16±0,75	0,13±0,20	13,36±1,21	*	0,09±0,05
	Sr	90,81±16,94	38,94±9,75	115,57±1,98	2,55±0,93	0,79±0,15	100,63±20,42	75,44±13,68	229,74±19,18	1,42±0,49	0,44±0,09

* <LOD : inférieur à la limite de détection

4 Conclusion :

La technique de dépollution des sols par couplage bioaugmentation-phytoextraction vise à accélérer la dépollution par les plantes en augmentant la biomasse végétale et/ou en en augmentant la concentration en métaux des plantes accumulatrices. Notre étude a évalué dans un premier temps le potentiel de phytoextraction du Cd, Ce, La, Nd, Sr et Y présents dans les PG par deux plantes commercialisées *Trifolium pratense* et *Helianthus annuus* et leur association dans un deuxième temps avec des isolats bactériens (S3B1et MB4 tous deux appartenant à l'espèce *Bacillus cereus*) capables d'améliorer le rendement de phytoextraction grâce à la production de molécules qui facilitent le transfert des ETM vers la plante et/ou la croissance de la plante. Les résultats ont montré que les niveaux d'accumulation des ETM par les plantes cultivées sur le mélange PG-terreau sont beaucoup plus faibles que lorsqu'elles sont cultivées en hydroponie. La bioaugmentation a permis de stimuler la croissance des plantes et d'augmenter le prélèvement des ETM étudiés, sauf pour Cd.


Conclusion
& Perspectives

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Depuis la création de l'industrie de transformation d'engrais phosphaté, les PG ont été considéré comme des déchets dont l'élimination devait se faire au moindre coût : soit stockés en terril proche de l'usine, soit évacués en mer sans aucun traitement. Toutefois l'intérêt croissant porté aux problèmes environnementaux a amené à prendre en considération les nuisances issues de ces pratiques. Les PG contiennent en effet des teneurs importantes en ETM, incluant les terres rares qui représentent un problème environnemental et en même temps une ressource potentiellement valorisable.

Le rejet des PG continue jusqu'à présent d'être une source de contamination des milieux environnants de différentes zones d'activité de transformation du phosphate en Tunisie malgré les mesures de protection de l'environnement adoptées récemment par la direction administrative du GCT.

Dans le cadre d'une gestion durable de ces sous-produits, mon travail de thèse s'est focalisé sur les deux aspects suivants : le traitement biologique des PG pour l'élimination des impuretés et la récupération des éléments à haute valeur ajoutée comme les terres rares.

Avant de pouvoir envisager tout traitement d'un site pollué, il est nécessaire d'en dresser au préalable un état des lieux. En effet, un traitement ne sera efficace qu'à la condition qu'il soit adapté aux caractéristiques physiques, chimiques, géographiques et géologiques du site à traiter.

Puisqu'on est face à une pollution inorganique par des ETM, le premier chapitre présente une caractérisation environnementale des sites de stockage de PG de différentes zones d'activité de transformation du phosphate en Tunisie, L'évaluation de l'impact environnemental de tous les sites de dépôt des PG en Tunisie a été réalisée, considérant le sol, les communautés bactériennes et les végétaux spontanés trouvés aux alentours des sites de stockage. D'une part afin de déterminer l'impact du dépôt de PG sur l'environnement, d'autre part, pour identifier des plantes et des microorganismes de ces mêmes sites, susceptibles d'être utilisés en dépollution. Pour atteindre cet objectif, ce travail a été décomposé en trois volets. Le premier a consisté à établir les niveaux de contamination, la distribution, la mobilité et la migration des ETM (Cd, Ce, La, Nd, Sr et Y) dans les sols environnant les terrils de PG au niveau de de la zone industrielle de Sfax–Sud, Gafsa et Gabès, où sont installées les usines de transformation du phosphate du Groupe Chimique Tunisien. La spéciation des ETM dans les sols proches du dépôt de PG (zone Gafsa (M'dhilla) et Sfax) a été étudiée en employant

une méthode simple et efficace d'extraction séquentielle adaptée aux terres rares. Le second volet a porté sur l'estimation de l'impact de ces ETM sur les végétaux naturels poussant à proximité des dépôts de PG (*Chenopodium murale, Conyza canadensis, Kochia indica,* and *Suaeda mollis* pour le site de Sfax ; *Arthrocemum inucum, Atriplex halimus, Bassia muricata* et *Zygophyllum album* pour le site de M'dhilla. Le dernier volet a été consacré à une étude d'écologie moléculaire des communités bactériennes locales aux alentours des sites de stockage de PG dans les 3 sites d'étude (Gabès, M'dhilla et Sfax). Cette analyse a été effectuée en employant la PCR-TTGE ciblant l'ARNr 16S.

Différentes campagnes d'échantillonnage de sols, de végétaux et des isolements de microorganismes ont été réalisés aux alentours des sites de stockages des PG dans la zone industrielle de Sfax–Sud, Gafsa et Gabès. Des profils verticaux du sol ont été également réalisés afin de connaître la distribution des ETM dans les PG et le sol sous-jacent ainsi que l'enracinement des plantes.

Les résultats montrent que les PG concentrent de nombreux ETM provenant des impuretés du minerai de phosphate. Sur la base des teneurs de ces différents ETM et de leur toxicité potentielle, les plus problématiques ont été plus particulièrement étudiés : Le Cd et le Sr. Leurs teneurs dépassement largement celles du fond géochimique. Ces deux éléments ont été sélectionnés en raison de leur impact environnemental. Le PG est également riche en terre rares potentiellement d'intérêt économique tels que le Ce, La, Ne, T et Y. Ces éléments ont été sélectionnés pour l'objectif économique (phytomine). Les concentrations des ETM dans les trois sites d'étude sont, en moyenne, plus élevées que celles dans les sols témoins (à 12 Km de dépôt de PG) et suit l'ordre décroissant suivant (en mg/kg de sol sec) : Sr (698 et 528,20)> Ce (112.50 et 12.10) > La (98.50 et 13,50) > Y (87,30 et 13,30), Nd (95,20 et 13,70)> Cd (88,60 et 2,20). La distribution verticale de la concentration en ETM montre des niveaux élevés dans les horizons superficiels comparés aux autres horizons inferieurs. La proportion dominante des ETM a été détectée principalement dans la fraction liée aux carbonates et mobilisées par complexation. Il a été démontré aussi que le site de Gabès semble être le plus contaminé par les ETM.

La concentration des métaux dans les parties aériennes (PA) et les racines (PR) varie d'une espèce végétale à l'autre et est plus élevée que celle dans le les sols témoins. Les concentrations en ETM dans les PA suivent l'ordre décroissante suivant (en mg/kg de matière sèche) : Sr pour *Z. album* (657.56)> Cd pour *Z. album* (14.20)> La pour *Z. album* (11.05)> Ce pour *C. canadensis* (1.11)> Nd pour C. canadensis (0.75)> Y pour *A. indicum* (0.72). Les valeurs de facteur de bioconcentration (FBC) obtenues pour les métaux étudiés sont

inférieures à 1 pour toutes les plantes à l'exception du Cd dans le site de Sfax pour *k. indica* (1,60) et dans le site de Gafsa pour *Z. album* (1,05) ainsi que le Sr pour la même plante avec une valeur égale à 1,10. le facteur de translocation (FT) le plus élevé (6,12) a été calculé pour *Z. album*. La comparaison des différentes plantes montre que *Z. album* possède une capacité plus forte que les autres plantes à accumuler les ETM et pourrait par conséquent être le candidat le plus approprié pour la phytoextraction des ETM.

L'étude d'écologie moléculaire qui cible la communauté bactérienne de sols dans les zones d'étude a montré une faible diversité bactérienne à l'exception de SSP1 et SGP3 qui sont à la fois très différents entre eux et par rapport aux autres échantillons. Ils s'agissent d'échantillons rhisosphériques ce qui a permis de montrer l'effet de la plante sur la diversité bactérienne. En se basant sur les analyses réalisées dans cette étude, il s'avère que les changements de la structure au sein de la communauté bactérienne des sols d'étude n'est pas seulement due à la présence du terril de PG mais aussi à d'autres facteurs environnementaux.

Après un diagnostic et une caractérisation de l'état environnemental des sites environnants le dépôt de PG en Tunisie. L'association de la bioaugmentation à la phytoextraction a été envisagée comme procédé de dépollution des sites contaminés par les PG. Cette technique vise à accélérer le potentiel de dépollution des plantes en augmentant la biomasse végétale et/ou en favorisant la mobilité des métaux et par conséquent leur prélèvement et accumulation par les plantes. Dans un premier temps, la sélection et l'dentification de bactéries d'intérêt a été réalisée.

Aavant d'associer les différents acteurs du système plante-microorganismes, la première phase a porté sur la sélection de bactéries indigènes provenant des sols aux alentours des sites de stockages des PG en Tunisie. Des isolements bactériens ont été effectués à partir de prélèvements réalisés sur les sites de M'dhilla (Gafsa), de Gabès et de Sfax. Les souches isolées ont été présélectionnées en utilisant/développant des tests miniaturisés en microplaques, sur la base des critères suivants : i) capacité des souches à tolérer les ETM sélectionnés dans la partie environnementale (Cd, Ce, La, Nd, Sr et Y), ii) capacité à mobiliser ces ETM grâce aux sidérophores bactériens (dont la pyoverdine), iii) capacité à stimuler la croissance des plantes grâce à la production d'acide indole acétique (AIA) et la dégradation de l'aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) par l'ACC-désaminase. Pour finir, un essai de bioaugmentation de PG a été réalisé pour valider la méthode de sélection.

Les résultats montrent que l'ajout d'un mélange d'ETM (Cd, Sr, Ce, La, Nd et Y) a eu un effet inhibiteur global sur la dégradation d'ACC et sur la croissance des bactéries cultivées avec un milieu de culture enrichi avec l'extrait de PG, alors que les productions spécifiques de

sidérophores, dont la pyoverdine, et d'AIA semblent avoir été stimulées en présence des ETM. Des statistiques descriptives sur les données numériques ont permis de sélectionner deux isolats les plus efficaces qui ont été identifiés comme appartenant tous les deux à l'espèce *Bacillus cereus*.

Afin de valider la méthode de sélection, Ces deux isolats ont servi à la bioaugmentation du mélange PG-Terreau. Les résultats ont révélé que ces deux bactéries n'ont pas démontré d'effet évident sur la mobilisation des ETM étudiés, sauf le Cd. L'absence de survie microbienne et/ou d'activité en lien avec la mobilité des ETM peut expliquer ce résultat. La présence de plante et donc de rhizodépôts potentiellement favorables au développement/activité microbienne est susceptible de modifier les conclusions. L'utilisation d'un système complet (sol-bactéries-plantes), tel que mis en œuvre dans le chapitre 3, apportera une réponse définitive quant à l'intérêt de la phytoextraction bioaugmentée.

Envisager une phytoextraction couplée à la bioaugmentation pour réduire la charge polluante des PG nécessite de choisir judicieusement les couples bactéries-plantes les plus performants. En faisant agir des souches adaptées à la fois aux plantes et à la contamination en PG, elles permettront d'augmenter les performances de traitement des PG par phytoextraction (en abaissant la durée des traitements) et de réduire l'impact des PG sur l'environnement (Cd et Sr) tout en offrant la possibilité de récupérer et valoriser les TR (Ce, La, Nd et Y) accumulés dans la biomasse végétale.

La sélection de couples bactéries-plantes les plus performants se déroule en 3 temps. Dans un premier temps des isolats bactériens (S3B1et MB4) préalablement sélectionnés dans la partie « sélection bactérienne », pour leurs propriétés potentiellement intéressantes en phytoextraction telles que leurs propriétés PGPR et leurs capacités à produire des métabolites (notamment des sidérophores) impliqués dans la mobilisation des ETM (plus particulièrement le Cd, Sr, Ce, La, Nd et Y), sont inoculées avec deux plantes commerciales accumulatrices des métaux : *T. pratense* et *H.* annus, de façon à vérifier que ces souches augmentent le prélèvement des ETM. Une souche de *Pseudomonas Xanthamarina* (référence : ULPAs1 provenant de sédiments d'origine minière est également testée comme témoin a priori positif,

Le potentiel d'accumulation de deux plantes a tout d'abord été évalué en hydroponie, avec des concentrations du mélange des 6 ETM (Cd, Ce, La, Nd, Sr, Y) correspondent aux teneurs extractibles au $CaCl_2$ (fraction facilement biodisponible) et à l'EDTA (potentiellement biodiponibles) dans les PG. L'expérience de couplage bioaugmentation/phytoextraction est réalisée en pot avec un mélange PG-Terreau à raison de 15 % de PG et 85 % de Terreau (v/v) afin de garantir la croissance des plantes et limiter la toxicité des ETM. Le test de culture des

plantes en hydroponie a révélé que pour tous les ETM étudiés, quelle que soit la plante, les quantités en ETM prélevés sont plus importantes dans les PR que dans les PA. Le tournesol se révèle plus efficace en termes de teneurs en ETM dans les PA mais, contrairement au trèfle, il régule l'accumulation des ETM (quasiment la même quantité d'ETM, quelle que soit la concentration en solution. Les facteurs de translocation (FT) du Trèfle et du tournesol présentent des valeurs inférieures à 1 pour tous les ETM, sauf pour le Sr.

Les niveaux d'accumulation des ETM par les plantes cultivées en pots avec le mélange PG-terreau sont beaucoup plus faibles qu'en hydroponie. Les niveaux d'accumulation des ETM pour le tournesol et le trèfle sont proches sauf pour Ce avec une concentration dans les PA du trèfle (vs. PR) environ 20 fois (10 fois) supérieure à celle du tournesol. Les teneurs en ETM (Cd, Ce, La, Nd, Sr et Y) extractibles au $CaCl_2$ et à l'EDTA montre que ce dernier extrait une part plus importante d'ETM que le $CaCl_2$, quels que soient l'ETM et la plante considérée. La bioaugmentation agit non significativement sur la teneur des différents ETM du mélange PG-Terreau extractibles à l'EDTA sauf pour le Cd avec une augmentation de sa teneur.

Même si au moment de l'analyse, les teneurs en ETM extractibles au CaCl2 et EDTA n'augmente pas sensiblement, la bioaugmentation du mélange terreau-PG avec les bactéries préalablement isolées (S3B1et MB4) montre une augmentation de la teneur en ETM (surtout Ce, La, Nd, Y) respectivement de 1,28 ;1,12 ; 0,95 et 1,4 %, au maximum, dans le tournesol et encore plus dans le trèfle. Les bactéries augmentent également la biomasse végétale d'un facteur de 5 pour les PA et 2,9 pour les PR chez le trèfle, en ce qui, *in fine,* augmente l'efficacité de la phytoextraction en termes de quantité d'ETM extraits.

Comme perspectives, plusieurs études complémentaires sur l'impact des PG sur l'environnement, d'une part, et l'amélioration du procède de dépollution, d'autre part, pourraient être envsagées :

- **Impact des PG sur l'environnement**

Les échantillons étudiés dans le présent travail de thèse ont été prélevé sur une distance de 100 mètres aux alentours des terrils de PG, montrant une contamination élevée du sol. Il serait particulièrement intéressant d'évaluer cette contamination sur des distances plus grandes, ce qui permettrait de préciser les gradients de contamination et les environnements impactés par les dépôts atmosphériques (espaces agricoles et urbains).

La concentration totale en ETM dans les échantillons de la zone d'étude montre un apport important au sol et aux sédiments jouxtant l'évacuation des PG en mer, ce qui peut être considéré comme un indicateur de la contamination des sols environnants par les déchets des

industries de phosphate. Ces observations ont été confirmées par d'autres études (El Zrelli et al., 2015, Zmemla et al., 2016). Cependant, l'utilisation d'autres techniques comme les analyses isotopiques pourraient être envisagées pour confirmer l'origine exacte des ETM incluant les TR, en faisant la différence entre ceux provenant du procédé d'extraction des phosphates et ceux du fond pédogéochimique.

Les processus contrôlant la mobilité de ces éléments devront également être mieux identifiés grâce aux mesures du pH, de la capacité d'échange cationique (CEC) ou encore de la matière organique. Le transfert des ETM vers les plantes doit enfin être approfondi, par l'identification et la quantification des espèces chimiques des ETM absorbables par les racines (ions libres en utilisant des méthodes électrochimiques, ETM complexés).

- **Amélioration du procédé de dépollution par bioaugmentation-phytoextraction**

Dans ce travail de thèse, le potentiel de phytoextraction de *Z. album* a été mis en évidence, mais d'un point de vue plus fondamental, l'étude des mécanismes impliqués dans sa tolérance aux ETM pourrait être investiguée. Il serait également intéressant d'étudier plus précisément la mobilisation des ETM par *Bacillus cereus.* Sa capacité de survie, de colonisation du sol, et la conservation de ses activités PGPR et de mobilisation des ETM doivent être précisées.

D'un point de vue applicatif du procédé associant la bioaugmentation à la phytœxtraction, plusieurs études peuvent être envisagées, notamment l'identification d'autres espèces végétales spontanées locale à forte biomasse capables d'accumuler les ETM incluant les TR et mettre en œuvre des itinéraires techniques (de la récupération des graines au semis et à la récolte). Aussi, l'utilisation des co-cultures de *Z. album* avec d'autres plantes couramment employées en phytoextraction des TR, par exemple *Noeceae caerulescens* ou *Brassica juncea*, pourrait permettre d'augmenter l'efficacité de phytoextraction.

Comme, le principal facteur d'échec de la bioaugmentation vient du stress auquel sont soumis les microorganismes inoculés dans le sol ou le substrat de culture, l'optimisation de la survie de ces microorganismes et leur colonisation de la rhizosphère est d'une importance primordiale. Des modalités d'inoculation pourraient être testées telle que la technique d'inoculation (microorganismes libres ou immobilisés), l'ajout de lait écrémé (Braud, 2007) a montré une amélioration de la colonisation et de la survie microbienne ; l'enrobage direct des graines seraient également à tester.

Une dernière perspective serait de développer et d'optimiser des procédés de valorisation de la biomasse végétale collectée et de récupération des TR, à l'image de ce qui a

été développé pour le nickel (phytomine, agromine et récupération de sulfate de Ni) (Van der et al., 2015, Simonnot et al., 2018).

Enfin, comme tout procédé développé en laboratoire, des essais sur le terrain sont essentiels afin de déterminer l'applicabilité du couplage bioaugmentation-phytoextraction.

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A. A. Belimov, N. Hontzeas, V. I. Safronova, S. V. Demchinskaya, G. Piluzza, S. Bullitta, B. R. Glick, Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.), Soil. Biol. Biochem. 37 (2005) 241-250.

A. A. Morsy, K. H. Ali Salama, H. A. Kamel, M. M. Fahim Mansour, Effect of heavy metals on plasma membrane lipids and antioxidant enzymes of Zygophyllum species. Eur Asian Journal of BioSciences, Eurasia. J. Biosci. 6 (2012) 1-10.

A. Ayadi, A. Chorriba, A. Fourati, R. Gargouri-Bouzid, Investigation of the effect of phosphogypsum amendment on two Arabidopsis thaliana ecotype growth and development., Environ. Technol. 36 (2015)1547-1555.

A. Boukhris, I. Laffont-Schwob, I. Mezghani, L. El Kadri, P. Prudent, A. Pricop, T. Tatoni, M. Chaieb, Screening biological traits and fluoride contents of native vegetations in arid environments to select efficiently fluoride-tolerant native plant species for in-situ phytoremediation, Chemosphere. 119 (2015) 217-223.

A. Braud, F. Hoegy, K. Jezequel, T. Lebeau, I. J. Schalk, New insights into the metal specificity of the Pseudomonas aeruginosa pyoverdine-iron uptake pathway, Environ. Microbiol. 11 (2009) 1079-1091.

A. Braud, K. Jézéquel, S. Bazot, T. Lebeau, Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophoreproducing bacteria, Chemosphere. 74 (2009) 280-286.

A. Braud, M. Hubert, P. Gaudin, T. Lebeau, A quick rhizobacterial selection tool to be used in phytoextraction-assisted bioaugmentation of metal contaminated soils, J. Appl. Microbiol,119 (2015) 435-445.

A. Braud, Procédé de phytoextraction couplée à la bioaugmentation d'un sol agricole polycontaminé par du chrome, du mercure et du plomb. Thèse, Université de Haute Alsace. (2007).

B. Buchanan, W. Gruissem, R.L. Jones, Biochemistry & Molecular and Biology of PlantsAmerican Society of Plant Physiologists (distribution through Wiley et Sons) Monona Drive, Rockville, USA. (2002) 224 p.

A. Cébron, T. Beguiristain, P. Faure, M. P. Norini, J. F. Masfaraud, C. Leyval, Influence of vegetation on the in situ bacterial community and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degraders in aged PAH-contaminated or thermal-desorption-treated soil, Appl. Environ. Microbiol. 75 (2009) 6322-6330.

A. C. Agnello, M. Bagard, E. D. van Hullebusch, G. Esposito, D. Huguenot, Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation andbioaugmentation-assisted phytoremediation. Sci. Total. Environ. 564 (2016) 693-703.

ADEME, La microbiologie moléculaire au service du diagnostic environnemental. (2017) p169.

A. Felske, A. D. Akkermans, W. M. De Vos, Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. Appl. Environ. Microbiol. 64 (1998) 4581-7.

A. Hass, P. Fine, Sequential selective extraction procedures for the study of heavy metals in soils, sediments, and waste materials - a critical review, Crit Rev Environ Sci Technol. 40 (2010) 365–399.

A. H. T. Kandil, M. F. Cheira, H. S. Gado, M. H. Soliman, H. M. Akl, Ammonium sulfate preparation from phosphogypsum waste, J. Radiat. Res. Appl. Sci. 10 (2017) 24-33.

A. J. M. Baker, Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals, J. Plant. Nutrit. 3 (1981) 643-654.

A. J. M. Baker, R. R. Brooks, Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements e a review of their distribution, ecology and phytochemistry, Biorecovery. 1 (1989) 81-126.

A. J. M. Baker, S. P. McGrath, R. D. Reeves, J. A. C. Smith, Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Terry, N., Banuelos, G. Eds., Phytoremediation of Contaminated Soil and Water. Lewis Publishers, Boca Raton, FL. (2000) 85-107.

A. Jordens, Y. P. Cheng, K. E. Waters, A review of the beneficiation ofrare earth element bearing minerals. Miner. Eng. 41 (2013) 97-114.

A. Kabata-Pendias, H. Pendias, Trace Elements in Soils and Plants. Boca Raton: CRC Press. (1992) p. 365-534.

A. Khan, P. Singh, A. Srivastava, Synthesis, nature and utility of universal iron chelator-Siderophore: A review, Microbiol. Res. 212-213 (2018) 103-111.

A. Loges, T. Wagner, M. Barth, M. Bau, S. Gob, G. Markl, Negative Ce anomalies in Mn oxides: The role of Ce 4+ mobility during water-mineral interaction, Geochim. Cosmochim. Ac. 86 (2012) 296-317.

A. M. Ibekwe, J. A. Poss, S. R. Grattan, C. M. Grieve, D. Suarez, Bacterial diversity in cucumber (Cucumis sativus) rhizosphere in response to salinity, soil pH, and boron, Soil Biol. Biochem. 42 (2010) 567-575.

A. M. URE, Single extraction schemes for soil analysis and related applications, Sci.Total Environ. 178 (1996) 3-10.

A. Tremel-Schaub, I. Feix, Contaminations des sols : transfert sol-plante des éléments traces. Ed EDP sciences et Ademe, Paris, France. (2005).

A. Sas-Nowosielska, R. Kucharski, E. Malkowski, M. Pogrzeba, J.M. Kuperberg, K. Krynski, Phytoextraction crop disposal--an unsolved problem. Environmental Pollution 128 (2004) 373-379.

A. Sessitch, M. Kuffner, P. Kidd, J. Vangronsveld, W. W. Wenzel, K. Fallmann, M. Puschenreiter, The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils, Soil. Biol. Biochem. 60 (2013) 182-194.

A. Smith, B. Wrench, Aspects of environmental control of phosphogypsum waste disposal, Proceedings of the Eighth Regional Conference for Africa on Soil Mechanics and Foundation Engineering. (1984) p. 487-490.

Association Française de Normalisation (AFNOR) NF ISO 10390, Qualité du sol - Détermination du pH - BODENBESCHAFFENHEIT. BESTIMMUNG DES PH-WERKS. (1994).

Association Française de Normalisation (AFNOR) NF ISO 11464, Qualité des sols -Prétraitement des échantillons pour analyses physico-chimiques. (2006).

Association Française de Normalisation (AFNOR) NF X 31-120, Qualité des sols - Détermination du cuivre, du fer, du manganèse et du zinc - Extraction par l'acétate d'ammonium en présence d'EDTA. (1992).

A. Tessier, P. G. C. Campbell, M. Bisson, Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals, Anal Chem.51 (1979) 844-851.

A. Tremel-Schaub, I. Feix, Contamination des sols : Transfert des sols vers les plantes. Editions ADEME. (2005).

A. Vivas, B. Biró, T. Németh, J. M. Barea, R. Azcón, Nickel-tolerant *Brevibacillus brevis* and arbuscular mycorrhizal fungus can reduce metal acquisition and nickel toxicity effects in plant growing in nickel supplemented soil, Soil. Biol. Biochem. 38 (2006) 2694-2704.

A. Van der Ent, A. J. M, Baker, R. D. Reeves, R. L. Chaney, C. W. N. Anderson, J. A. Meech, P. D. Erksine, M. O. Simonnot, J. Vaughan, J. L. Morel, G. Echevarria, B. Fogliani, R. Qiu, D. R. Mulligan, Agromining: farming for metals in the future? Environ. Sci. Technol. 49 (2015) 4773-4780.

A. Wali, G. Colinet, M. Ksibi, Speciation of heavy metals by modified BCR sequential extraction in soils contaminated by phosphogypsum in Sfax, Tunisia, Environ. Res. Eng. Manage. 4 (2014) 14-26.

B. Agoubi., M. Gzam, Adverse effects of phosphate industry on the environment and groundwater geochemistry in the Ghannouch field, Southeastern Tunisia, Am. J. Geophysics, Geochem. Geosyst. 2 (2016) 51-63.

B. G. S – British Geological Survey, Rare Earth Elements. (2011) p. 53.

B. Nowack, R. Schulin, B. H. Robinson, Critical assessment of chelant-enhanced metal
phytoextraction, Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 5225-5232.

B. R. Glick, Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase, FEMS Microbiol. Lett. 251 (2005) 1-7.

B. R. Glick, Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment, Biotechnol. Adv. 21 (2003) 383-393.

B. Schwyn, J. B. Neilands, Universal chemical assay for the detection and determination of sidérophores, Anal. Biochem. 160 (1987) 47-56.

B. S. Van Gosen, P. L. Verplanck, K. R. Long, Gambogi, Joseph, R. R Seal, The rare-earth elements-Vital to modern technologies and life styles: U.S. Geological Survey Fact Sheet 2014-3078, (2014) p. 4.

B. Volesky, Z. R. Holan, Biosorption of heavy metals, Biotechnol. Progr. 11(1995) 235-250.

B.W. Wood, L.J. Grauke, The rare-earth metallome of pecan and other Carya. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 136 (2011) 389-398.

C. E. Shannon, W. Weaver, The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana. (1949).

C. Heim, K. Simon, D. Ionescu, A. Reimer, D. De Beer, N. V. Quéric, Assessing the utility of trace and rare earth elements as biosignatures in microbial iron oxyhydroxides, Front. Earth Sci. (2015) 1-15.

C. H. Han, Y. H. Park, Y. G. Lee, J. W. Park, Distribution of 90Sr activities in the environmental radiation samples of jeju island, Korea, J. Radiat. Prot. Res. 41 (2016) 418-423.

C. H. Rahman, B. Ahcene, B. Miloud, D. Rachid, Screening and characterization of plant growth promoting traits of phosphate solubilizing bacteria isolated from wheat rhizosphere of Algerian saline soil, M.J.M. 13 (2016) 124-131.

C. Heim, K. Simon, D. Ionescu, A. Reimer, D. De Beer, N.V. Quéric, Assessing the utility of trace andrare earth elements as biosignatures in microbial iron oxyhydroxides. Front. Earth. Sci. (2015)1-15.

C. Juste, Appréciation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments en traces du sol, Sci. Sol.26 (1988) 103-112.

C. Juste, P. Chassin, A. Gomez, M. Linères, B. Mocquot, Les micro-polluants métalliques dans les boues résiduaires des stations d'épuration urbaines, Convention ADEME-INRA, ADEME éd. (1995) p. 209.

C. Laveuf, S. Cornu, A review on the potentiality of Rare Earth Elements to trace pedogenetic processes, Geoderma. 154 (2009) 1-12.

C. L. Patten, B. R. Glick, Role of Pseudomonas putida Indolacetic Acid in Development of Host Plant Root System, Appl. Environ. Micobiol. 68 (2002) 3795-3801.

C.M. Rico, M.I. Morales, A.C. Barrios, R. Mccreary, J. Hong, W.Y. Lee, J. Nunez, J.R. Peralta-Videa, J.L. Gardea-Torresdey, Effect of cerium oxide nanoparticles on the quality of rice (Oryza sativa L.) grains. J. Agric. Food Chem. 61 (2013)11278-11285.

C. O. Dimkpa, D. Merten, A. Svatos, G. Buchel, E. Kothe, Metal-induced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores, Soil. Biol. Biochem. 41(2009) 154-162.

C. Papastefanou, S. Stoulos, A. Ioannidou, M. Manolopoulou, The application of phosphogypsum in agriculture and the radiological impact, J. Environ. Radioact. 89 (2006) 188-198.

C. Turgut, M. K. Pepe, T. J. Cutright, The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cd, Cr, and Ni from soil using Helianthus annuus, Environ. Pollut. 131 (2014)147-154.

C. Zhang, Q. Li, M. Zhang, N. Zhang, M. Li, Effects of rare earth elements on growth and metabolism of medicinal plants REVIEW, Acta. Pharmaceutica. Sinica B. 3 (2013) 20-24.

D. Asker, T. Beppu, K. Ueda, Unique diversity of carotenoid-producing bacteria isolated from Misasa, a radioactive site in Japan, Appl. Microbiol. Biotechnol. 77 (2007) 383-392.

D. Baize, Gamme de valeurs couramment observées dans les sols « ordinaires » de toutes granulométries, résultats généraux du programme ASPITET, (2000). http://www7.inra.fr/lecourrier/assets/C39Baize.pdf.

D. Baize, Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). INRA Editions, Paris. (1997) pp. 408.

D. Bouquet, A. Braud, T. Lebeau, Brassica junceatested on urban soils moderately contaminated by lead: Origin ofcontamination and effect of chelates, Int. J. Phytoremediat. 0(2016) 1-6.

D. C. Adriano, Trace elements in the terrestrial environment: Biochemistry, Bioavaibility and Risk of metals. New York, Springer-Verlag Publisher. (2001) p. 876.

D. Daligand, Plâtre. In Techniques de l'Ingénieur, volume "Traité de Construction", réf. CA (C910). (2002) p. 16.

D. Degeorges, Terres rares *:* enjeu géopolitique du XXIe siècle. Paris : L'Harmattan, coll. Un autre regard. (2012) p. 78.

D. F. Rojas-Tapias, R. R. Bonilla, J. Dussán, Effect of Inoculation with Plant Growth-Promoting Bacteria on Growth and Copper Uptake by Sunflowers, Water Air Soil Pollut. 223 (2012) 643-654.

D. K. Nordstrom, Hydrogeochemical processes governing the origin, transport and fate of major and trace elements from mine wastes and mineralized rock to surface waters, Appl. Geochem. 26 (2011) 1777-1791.

D. Muller, D. Liévremont, D. D. Simeonova, J. C. Hubert, M. C. Lett, Arsenite oxidase aox genes from a metal-resistant beta-proteobacterium, J. Bacteriol. 185 (2003) 135-141.

D.R. Hoagland, D.I. Arnon, The water-culture method for growing plants without soil. Circular. California Agricultural Experiment Station. 347 (1950) 32.

D. R. Reisman, J.W. Mckernan, C. Northeim, Rare earth elements: A review of production, processing, recycling, and associated environmental ISSUES. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, (2013) pp 38.

D. Schüler, M. Buchert, R. Liu, S. Dittich, C. Merz, Study on Rare Earths ansthier recycling, final report for the greens/EFP groupe in the European parliament, 1er édition, Darmastadt. (2011) p. 124.

D. Wang, C. Wang, S. Ye, H. Qi, G. Zhao, Effects of spraying rare earths on contents of rare earth elements and effective components in tea, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 6731-6735.

D. Wolicka, W. Kowalski, Biotransformation of phosphogypsum in petroleum-refining wastewaters, Pol. J. Environ. Stud. 15 (2006) 355-360.

Eawag, Institut de recherche sur l'eau du domaine des EPF, Ecotoxicité des terres rares, Fiche info.(2013) p 2.

E. Diatloff, F.W. Smith, C.J. Asher, Effects of Lanthanum and Cerium on the Growth and Mineral Nutrition of Corn and Mungbean, Ann. Bot. 101 (2008) 971-982.

E. França, EA De Nadai Fernandes, M.A Bacchi, F.S. Tagliaferro, Pathway of rare-earth elements in a Brazilian forestry fragment, J. Alloy. Compd. 344 (2002) 21-26.

E. Islam, P. Sar, Molecular assessment on impact of uranium ore contamination in soil bacterial diversity. Int Biodeterior, Biodegradation. 65 (2011) 1043-1051.

E. Kothe, H. Bergmann, G. Buchel, Molecular mechanisms in biogeointeractions from a case study to general mechanisms, Chem. Erde. Geoche. 6 (2005) 7-27.

E. Pilon-Smits, Phytoremediation. Annu Rev Plant Biol 56 (2005) 15-39.

E. Saadaouia, N. Ghazela, C. Ben Romdhane, N. Massoudic, Phosphogypsum: potential uses and problems – a review, Int. J. Environ. Stud. 74 (2017) 558-567.

E. Salkowski, Ueber das verhalten der SkatolcarbonsäureimOrganismus. (1884) p. 24-33.

E. W. Wilde, C. J. Berry, M. B. Goli, Toxicity of gadolinium to some aquatic microbes, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 68 (2002) 420-7.

F. Ahmad, I. Ahmad, M.S. Khan, Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities, Microbiol. Res. 163 (2008) 173-181.

F. F. Munshower, Practical handbook of disturbed land revegetation. Lewis Publishing, Boca Ratton. (1994) p. 265.

F. R. Bentlin, D. Pozebon, Direct determination of lanthanides in environmental samples using ultrasonic nebulization and ICP OES, J. Brazil. Chem. Soc. 21 (2010) 627-634.

F. V. Stetten, R. Mayr, S. Scherer, Climatic influence on mesophilic *Bacillus cereus* and psychrotolerant*Bacillus weihenstephanensis*populations in tropical, temperateand alpine soil, Environ. Microbiol. 1 (1999)503-515.

F. Zeng, H. Tian, Z. Wang, Y. An, F. Gao, L. Zhang, F. Li, L. Shan, Effect of rare earth element europium on amaranthin synthesis in Amarathus caudatus seedlings, Biol. Trace Elem. Res. 93 (2003) 271–282.

F. Zeng, S. Chen, Y. Miao, F. Wu, G. Zhang, Changes of organic acid exudation and rhizospherepH in rice plants under chromium stress, Environ. Pollut. 155 (2008) 284-9.

G. A. Adediran, B. T. Ngwenya, J. F. W. Mosselmans, K.V. Heal, B. A. Harvie, Mechanisms behind bacteria induced plant growth promotion and Zn accumulation in *Brassica juncea*. J. Hazard. Mater. 283 (2015) 490-499.

G. Haferburg, E, Kothe, Microbes and metals: interactions in the environment, J. Basic. Microbiol. 47 (2007) 453-467.

G. I. Petrisor, S. Dobrota, K. Komnitsas, I. Lazar, J. M. Kuperberg, M. Serban, Artificial Inoculation—Perspectives in TailingsPhytostabilization, Int.J. Phytoremediat. 6 (2004) 1-15.

G. Kongshaug, B. A. Brentnall, K. Chassey, J. H. Gregersen, P. Stokka, B. Persson, N. W. Kolmeijer, A. Conradsen, T. Legard, H. D. Munk, O. Skauli, Phosphate fertilizers. In Elvers B., Hawkins S. and Schulz G., eds., Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. A19 (1991) 421-463.

G. Lear, M. J. Harbottle, G. Sills, C. J. Knowles, K. T. Semple, I. P. Thompson, Impact of electrokinetic remediation on microbial communities within PCP contaminated soil. Environmental Pollution. 146 (2007) 139-146.

G. M. Gadd, Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation, Geoderma. 122 (2004) 109-119.

G. M. Sadiqul Islam, F.H. Chowdhury, M.T. Raihan, S.K.S. M.R. Amit Islam, Effect of phosphogypsum on the properties of Portland cement, Procedia Eng. 171 (2017) 744-751.

G. S. Garcia, A. Cervantes, A. Faz, Heavy metal polluted soil remediation of an autochtonus Mediterranean plant species: *Zygophyllumfabago.* Forschunszentrum Karlsruhe. (2003) 2702-2704.

G. T. Goonan, Rare Earth Elements – End Use and Recyclability, In United States Geological Survey. Scientific Investigations Report 2011-5094 U.S. (2011).

H. Chung, M. Park, M. Madhaiyan, S. Seshadri, J. Song, H. Cho, T. Sa, Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea, Soil. Biol. Biochem. 37 (2005) 1970-1974.

H. J. Rogers, D. S. Plaha, V. E. Woods, Antibacterial effect of the scandium complex of enterochelin on *Pseudomonas aeruginosa*, FEMS. Microbiol. Lett. 24 (1984) 5-8.

H. Kempter, M. Krachler, W. Shotyk, C. Zaccone, Major and trace elements in Sphagnum moss from four southern German bogs, and comparison with available moss monitoring data, Ecol. Indic. 78 (2017) 19–25.

H. Khoudi, Y. Maatar, F. Brini A. Fourati, N.Ammar, K. Masmoudi, Phytoremediation potential of Arabidopsis thaliana, expressing ectopically a vacuolar protonpump, for theindustrial waste phosphogypsum, Environ. Sci. Pollut. Res. 20(2013)270-280.

H. Q. Xiao, Z. Y. Zhang, F. L. Li, Z. F. Chai, Study oncontents and distributioncharacteristics of REE infern by NAA. Nucl. Technol. 26(2003)421-423.

H. R. Motaghian, A. R. Hosseinpur, Zinc desorption kinetics in wheat (*Triticum Aestivum*L.) rhizosphere in some sewage sludge amended soils, J. Soil Sci. Plant Nutr. 13 (2013) 664-678.

H. Sfar Felfoul, Etude du phosphogypse de Sfax (Tunisie) en vue d'une valorisation en Technique routière, Thèse ENIT-Tunis/INSA de Toulouse. (2004) p. 252.

H. Sfar Felfoul, N. Ouertani, P. Clastres, M. Benouezdou, Amélioration des caractéristiques du phosphogypse en vue de son utilisation en technique routière. Déchets, Sciences et Techniques. 28 (2002) 21-25.

H. Sfar Felfoul, P. Clastres, M. Benouezdou, Gestion des sous-produits industriels et developpement durable : cas du phosphogypse de Sfax-Tunisie, Sci. Technol. 23 (2005) 66-81.

H. Tayibi, M. Choura, F. A. López, J. F. Alguacil, A. López-Delgado, Environmental impact and management of phosphogypsum: A review. J. Environ. Manage. 9 (2009) 2377-2386.

H. Trifi, I. Ben Salem, N. Kolsi Benzina, A. Fourati, M. C. Costa, W. Achouak, G. Sghaier, M. Saidi, Effectiveness of the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Pantoea*sp. BRM17 in Enhancing *Brassica napus*Growth in Phosphogypsum- Amended Soil. Pedosphere. (2017).

H. Xie, J. J. Pasternack, B. R. Glick, Isolation and characterization of mutants of plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indole acetic acid, Curr. Microbiol. 32 (1996) 67-71.

H. Xu, Y. Liu, D-amino acid mitigated membrane biofouling and promoted biofilm detachment, J. Membrane. Sci. 376 (2011) 266-274.

H. Zouch, F. Karray, F. Armougom, S. Chifflet, A. Hirschler-Réa, H. Kharrat, L. Kamoun, W. Ben Hania, B. Ollivier, S. Sayadi, M. Quéméneur, Microbial Diversity in Sulfate-Reducing Marine Sediment Enrichment Cultures Associated with Anaerobic Biotransformation of Coastal Stockpiled Phosphogypsum (Sfax, Tunisia), Front. Microbiol. 8 (2017) 1583.

I. A. E. A, Radiation Protection and Management of NORM Residues in the Phosphate Industry. Safety Reports Series. No.78 (2013).

Iamgold, Notion de bases sur les éléments de terres rares : Avril 2012, In Imgold, Eléments de terres rares, ETR 10 (2012).

I. A. Ştefănescu, L. Gavrilă, R. Mocanu, Evaluation of the solubilization ability of two strains of *Bacillus megaterium* for heavy metals from residual phosphogypsum, Rom. Biotechnol. Lett. 16 (2011) 6513- 6522.

I. A. Stefanescu, The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on mobility of toxic elements from phosphogypsum and implication on human exposure. J.E.S.R. 20 (2014) p70.

I. Ben Salem, H. Sghaier, H. Trifi, S. Héni, K. Khwaldia, M. Saidi, A. Landoulsi, Isolation and characterization of a novel *Micrococcus* strain for bioremediation of strontium in radioactive residues, Afr. J. Microbiol. Res. 6 (2012) 851- 858.

I. D. Pulford, C. Watson, Phytoremediation of heavy metal-contamined land by trees a review, Environ Int. 29 (2003) 529-540.

I. Galfati, E. Bilal, A. Sassi, H. Abdallah, A. Zaïer, Accumulation of heavy metals in native plants growing near the phosphate treatment industry, Tunisia, Carpath. J. Earth. Env. 6 (2011) 85-100.

I. Hammas, K.H. Naifer, M. Férid, Solubility study and valorization ofphosphogypsum salt solution, Int. J. Miner. Process. 123 (2013) 87-93.

I. Hammas-Nasri, K. Horchani-Naifer, M. Férid, D. Barca, Rare earths concentration from phosphogypsum waste by two-step leaching method, Int. J. Miner. Process. 149 (2016) 78-83.

I. Lefevre, E. Correal, S. Lutts, Cadmium tolerance and accumulation in the noxious weed *Zygophyllum fabago*, Can. J. Bot. 8 (2005) 1655-1662.

I. Mezghani, N. Elloumi, F. Ben Abdallah, M. Chaieb, M. Boukhris, Fluoride accumulation by vegetation in the vicinity of a phosphate fertiliser plant, Fluoride. 38 (2005) 69-75.

I. M. O. C. A, **La Portail Français des ressources minérale non Energétique**. (2017) http://www.mineralinfo.fr/ecomine/archives/2018.

INERIS, Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques : Cadmium et ses dérivés. INERIS-DRC-01-25590-00DF249.doc. Version N°2-3 (2005) p. 60.

J. Barceló, C. Poschenrieder, Phytoremediation: principles and perspectives, Contrib sci. 3 (2003) 333-344.

J. Berthelin, C. Leyval, Contamination des milieux par les éléments en traces. Les conséquences sur les sols les eaux superficielles. Compte-rendus de l'Académie d'Agriculture de France. 86(2000) 25-37.

J. Labbé, G. Lefebvre, Panorama du marché des Terres Rares, Présentation de l'étude menéefin 2014 et 2015 au BRGM,avec quelques mises à jour. Séminaire du COMES, 15 juin (2016) p 43.

J. Godt, F. Scheidig, C. Grosse-Siestrup, V. Esche, P. Brandenburg, A. Reich, The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. J Occup Med Toxicol. 1 (2006) 22–7.

J. Harmsen, Measuring biovailability: from a scientific approach to standard methods, J. Environ. Qual. 36 (2007) 1420-1428.

J. Jalali, S. Magdich, R. Jarboui, M. Loungou, E. Ammar, Phosphogypsum biotransformation by aerobic bacterial flora andisolated Trichoderma asperellum from Tunisian storage piles, J. Hazar. Mat. 308 (2016) 362-373.

J. Jalali, P. Gaudin, H. Capiaux, M. Neji Saidi, E. Ammar, T. Lebeau, Rapid screening of bacterial isolates in the mobilization of trace elements by means of phosphogypsum bioaugmentation. Soumis à J. Hazar. Mat.

J. Kulczycka, Z. Kowalski, M. Smol, H. Wirth, Evaluation of the recovery of Rare Earth Elements (REE) from phosphogypsum waste e case study of the WIZ_OW Chemical Plant (Poland), J. Clean. Prod. 113 (2015) 345-354.

J. L. Morel, Bioavvailibility of Trace Elements to Terrestrial Plants. In: Tarradellas J, Bitton G., Rossel D. (eds). Soil Ecotoxicology. CRC, Lewis Publishers, Boca Raton, Etats-Unis. 6 (1997) 141-175.

J. Maheswaran, Rural Industries Research and Development Corporation (Australia), et Rural Industries Research and Development Corporation (Australia). Resilient Agricultural Systems (Program). Impact of rare earth elements on plant physiology and productivity: a report for the Rural Industries Research and Development. (2001).

J. M. Meyer, Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* specie, Arch. Microbiol. 174(2000) 135-142.

J. O. Nriagu, A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals, Nature. 338 (1989) 47- 49.

J. P. Bolivar, R. Garcia-Tenorio, F. Vaca, Radioecological study of an estuarine system located in the south of Spain, Wat. Res. 34 (2000) 2941-2950.

J. P. Guiraud, Microbiologie alimentaire. Technique et Ingénierie. Série Agro-Alimentaire. Dunod Ed., Paris. (1998) pp. 249, 265, 268-271, 549, 521, 572, 583.

J. Saatz, D. Vetterlein, J. Mattusch, M. Otto, B. Daus, The influence of gadolinium and yttrium on biomass production and nutrient balance of maize plants, Environ. Pollut. 204 (2015) 32–38.

J. Zhou, H. Gao, Z. Shu, Y. Wang, C. Yan, Utilization of waste phosphogypsum to prepare non-fired bricks by a novel Hydration–Recrystallization process, Constr. Build. Mater. 34 (2012) 114-119.

K. Bru, P. Christmann, J.F. Labbé, G. Lefebvre, Panorama mondial 2014 du marché desTerres Rares. Rapport public. BRGM/RP-65330-FR. (2015) p. 194.

K.E. Giller, E. Witter, S.P. McGrath, Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agriculture soils : a review, Soil. Biol. Biochem. 30 (1998) 1389-1414.

K. Grabas, A. Pawełczyk, A. Ostrowski, S. Stre˛k, W. Stre˛k, D. Hreniak, Cz. Mora, Cz, A. Dyonizy, P. Nowak, September. Recovery of lanthanides from apatite phosphogypsum. In: COM 2014-Conference of Metallurgists Proceedings. (2014).

K. Komnitsas, I. Lazar, I. G. Petrisor, Application of a vegetative cover on phosphogypsum stacks, Miner. Eng. 12 (1999) 175-185.

K. Pazand, A.R. Javanshir, Rare earth element geochemistry of spring water, north western Bam, NE Iran, Appl. Water Sci. 4 (2014) 1-9.

K. Schrödter, G. Bettermann, T. Staffel, T. Hofmann, Phosphoric acids and phosphates. In Elvers B., Hawkins S., Schulz G., eds., Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. VCH: New York (USA). A19 (1991) 465-503.

K. T. Semple, K. J. Doick, P. Burauel, A. Craven, K. C. Jones, H. Harms, Defining bioavailability and bioaccessibility for the risk assessment and remediation of soils and
sediments is complicated, Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 209-212.

K. V. B. R. Tilak, N. Rauganayaki, C. Manoharachari, Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and Rhizobium on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (Cajanuscajan), Europ J Soil Sci. 57 (2006) 67-71.

L. Ajam, M. Ben Ouezdou, H. SfarFelfoul, Characterization of the Tunisian phosphogypsum and its valorization in clay bricks, Constr. Build, Mater. 23 (2009) 3240-3247.

L. Citeau, A. Bispo, M. Bardy, D. King, (coordinateurs), Gestion durable des sols. Edition Quae. (2008).

L. D. Aquino, M.C.D. Pinto, M. Morgana, F. Tommasi, Effect of some light rare earth elements on seed germination, seedling growth and antioxidant metabolism in Triticum durum, Chemosphere.75 (2009) 900-905.

L. D. Aquino, M. Morgana, M. A. Carboni, M. Staiano, M. V. Antisari, M. Re, M. Lorito, A. J. M. Baker, Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals, J. Plant. Nutrit. 3 (1981) 643-654.

L. Denaix, Transfert sol-eau-planted'éléments traces dans les écosystèmescultivés contaminés. Mémoire d'Habilitation àDiriger des Recherches. Université de Pau et des Pays de l'Adour. (2007).

L. Diels, S. Van Roy, S. Taghavi, R. Van Houdt, From industrial sites to environmental applications with *Cupriavidus metallidurans*, Antonie Van Leeuwenhoek.96 (2009) 247-258.

L. E. De-Bashan, J.P. Hernandez, Y. Bashan, The potential contribution of plant growthpromoting bacteria to reduce environmental degradation - A comprehensive evaluation, Appl. Soil Ecol. 61 (2012) 171–89.

L. J. Evans, Chemistry of metal retention by soils. Environ Sci Technol. 23 (1989) 1046-1056.

L. Gandois, Y. Agnan, S. Leblond, N. Séjalon-Delmas, G. Le Roux, A. Probst, Use of geochemical signatures, including rare earth elements, in mosses and lichens to assess spatial integration and the influence of forest environment. Atmos. Environ. 95 (2014) 96–104.

L. M. Shuman, Fractionation method for soil micro elements, Soil Sci. 140 (1985) 11 – 22.

L. Prochnow, E. Caires, E. C. Rodrigues, Phosphogypsum use to improve subsoil acidity: the Brazilian experience, Better Crops. 100 (2016) 13-15.

L. Rabaoui, R. Balti, R. El Zrelli, S. Tlig-Zouari, Assessment of heavy metals pollution in the gulf of Gabès (Tunisia) using four mollusk species, Mediterr. Mar. Sci. 15 (2014) 45-58.

L. Xiangsheng, W. Jiachen, Y. Jun, F. Yubin, W. Yanping, Z. He, Application of rare earth phosphate fertilizer in Western Area of China, J. Rare Earths. 24 (2006) 423–426.

L. Y. Ping, W. Boland, Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis, Trends Plant Sci.9 (2004)263-266.

M. A. Barakat, New trends in removing heavy metals from industrial wastewater: review, Arabian J. Chem. 4 (2011) 361-377.

M. Ahemad, M. Kibret, Mechanisms and applications of plant growthpromoting rhizobacteria: current perspective, J. King Saud Univ. Sci. 26 (2014)1-20.

M. Bride, Reactions controlling heavy metal solubility in soils, Adv. Soil Sci. 10 (1989) 1-56.

M. Camps, A. Rigol, S. Hillier, M. Vidal, G. Rauret, Quantitative assessment of the effects of agricultural practices designed to reduce 137Cs and 90Sr soil-plant transfer in meadows, Sci. Total Environ. 332 (2004) 23-38.

M. Chaieb, M. Boukhris, Flore des zones arides et Sahariennes de Tunisie. Ed L'Or du Temps, Tunis. (1998).

M. Choura, Evaluation environnementale de l'activité de transformation de phosphate dans la zone côtière Sud du grand Sfax : Perspective d'aménagement et de réhabilitation (Rapport provisoire dans le cadre du projet SMAP III-Tunisie : Stratégie de gestion intégré de la zone côtière sud du grand Sfax). (2008).

M. Corniou, La ruée vers les terres rares. Québec Science. Août-Septembre. (2012) pp. 17-21.

M. Cote, G. Caudron, J. Tanguay, Orbite : Un producteur stratégique de terres rares, en ligne. (2012).

M. E. Díaz de Villegas, P. Villa, A. Frías, Evaluation of the siderophores production by *Pseudomonas aeruginosa* PSS, Rev. Latinoam. Microbiol.44 (2002) 112-117.

M. Ghosh, S.P. Singh, A comparative study of cadmium phytoextraction by accumulator and weed species, Environ. Pollut. 133 (2004) 365–371.

M. Honma, T. Shimomura, Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, Agric. Biol. Chem. 42 (1978). 1825-1831.

M. Humphries, Rare Earth Elements: The Global Supply Chain. Enligne. (2013) p. 27.

M. J. McLaughlin, E. Smolders, R. Merckx, Soil-root interface: physicochemical processes. Dans: Soil Chemistry and Ecosystem Health. Special publication n°52: 233-277. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA. (1998).

M. Liebeke, V. S. Brozel, M. Hecker, M. Lalk, Chemical characterization of soil extract as growth media for the ecophysiological study of bacteria, Appl. Microbiol. Biotechnol. 83 (2009) 161-73.

M. Liu, K. H. Hasenstein, Cerium: A chemical tracer for paleo-oceanic redox conditions. La 3+ uptake and its effect on the cytoskeleton in root protoplasts of Zea mays L, Planta. 220 (2005) 658–666.

M. Miransari, Hyperaccumulators, arbuscular mycorrhizal fungi and stress of heavy metals, Biotechnol. Adv. 29 (2011) 645-653.

M. Mittermüller, J. Saatz, B. Daus, A sequential extraction procedure to evaluate the mobilization behavior of rare earth elements in soils and tailings materials, Chemosphere. 147 (2016) 155-162.

M. Mleczek, P. Niedzielski, P. Kalač, M. Siwulski, P. Rzymski, M. Gąsecka, Levels of platinum group elements and rare-earth elements in wild mushroom species growing in Poland, Food Addit. Contam. 33 (2016) 86–94.

M.S.W. Mirza. Ahmad, F. Latif, J. Haurat, R. Bally, P. Normand, K. A. Malik, Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-romoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro, Plant Soil. 237 (2001) 47-54.

M. O. Mendez, R. M. Maier, Phytoremediation of mine tailings in temperate and arid environments, Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 7 (2008) 47-59.

M. Ponthieu, Spéciation des éléments traces métalliques dans les sols et les solutions des sols : du modèle au terrain. Thèse de l'Université d'Aix-Marseille III. (2003).

M. Rajkumar, N. Ae, M. N. V. Prasad, H. Freitas, Potential of siderophore-producingbacteria for improvingheavymetalphytoextraction, Trends Biotechnol. 28 (2010) 142-149.

M.R. Bruins, S. Kapil, F.W. Oehme, Microbial resistance to metals in the environment, Ecotoxicol. Environ. Saf. 45 (2000) 198-207.

M.S. Al-Hwaiti, J.F. Ranville, P.E. Ross, Bioavailability and mobility of trace metals in phosphogypsum from Aqaba and Eshidiya, Jordan. Chem. Erde. 70 (2010) 283-291.

M.S. Al-Masri, Y. Amin, S. Ibrahim, F. Al-Bich, Distribution of some traces metals in Syrian phosphogypsum, Appl. Geochem. 19 (2004) 747-753.

Agreste, 2006. http://www.agreste.agriculture.gouv.fr.

M. S. Arif, M. Riaz, S. M. Shahzad, T. Yasmeen, S. Ali, M. J. Akhtar, Phosphorus Mobilizing Plant Growth Promoting Rhizobacteria *Bacillus cereus* GS6 Improved Symbiotic Efficiency of Soybean (*Glycine max*, L.) in Compost Amended Aridisol, Pedosphere (2017).

M. Singh, Influence of blended gypsum on the properties of Portland cement and Portland slag cement, Cem. Concr. Res. 30 (2000) 1185-1188.

M. Zairi, M. J. Rouis, Impact environnementaux du stockage du phosphogypse à Sfax. Bulletin des laboratoires des ponts et chaussées. 219 (1999) 29-37.

N. Campbell, J. Reece, Transport in vascular plants. Pearson education Inc publishing as BenjaminCummings (2005).

N. Durães, E. F. da Silva, I. Bobos, P. Ávila, Rare Earth Elements fractionation innative vegetation from the Moncorvo iron mines, NE Portugal. Proced, Earth Planet. Sci. 10 (2014) 376-382.

N. Elloumi, M. Zouari, L. Chaari, F. B. Abdallah, S. Woodward, M. Kallel, Effect of phosphogypsum on growth, physiology, and the antioxidative defense system in sunflowerseedlings, Environ.Sci. Pollut. Res. 22 (2015) 14829-40.

N. Reguigui, H. Sfar Felfoul, M. Ben Ouezdou, P. Clastres, Radionuclide levels and temporal variation in phosphogypsum, J. Radioanal. Nucl. Chem. 264 (2005) 719 – 722.

O. B. D. Thabet, M. Gtari, Sghaier, Microbial diversity in phosphate rock and phosphogypsum. Waste Biomass Valor.1-11. (2016).

O. Hentati, N. Abrantes, A. L. Caetano, S. Bouguerra, F. Gonc¸ l. JörgRömbke, R. Pereira, Phosphogypsum as a soil fertilizer: ecotoxicity of amended soil andelutriates to bacteria, invertebrates, algae and plants, J. Hazard. Mater. 294 (2015) 80-89.

O. M. Finkel, G. Castrillo, S. H. Paredes, I. S. Gonzàlez, J. L. Dangl, Understanding and exploiting plant beneficial microbes, Curr. Opin. Plant Biol. 38 (2017) 155-163.

O. Wiche, H. Heilmeier, Germanium (Ge) and rare earth element (REE) accumulation in selected energy crops cultivated on two different soils, Miner. Eng. 92 (2016) 208–215.

P. Babula, V. Adam, R. Opatrilova, Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity, Environ. Chem. Lett. 6 (2008) 189-213.

P. Bois, D. Huguenot, M. P. Norini, M. F. Ul Haque, S. Vuilleumier, T. Lebeau, Herbicide degradation and copper complexation by bacterial mixed cultures from a vineyard stormwater basin, J. Soils Sediments. 11 (2011) 860-873.

P.C. Abhilash, J.R.Powell, H.B.Singh, B.K.Singh, Plant-microbe interactions: novel applications for exploitation in multipurpose remediation technologies.Trends Biotechnol. 30 (2012) 416-420.

P.C. Nagajyoti, K.D. Lee, T.V.M. Sreekanth, Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review, Environ. Chem. Lett. 8 (2010) 199-216.

P. D'Odorico, K. Caylor, G.S Okin, T.M. Scanlon, On soil moisture-vegetation feedbacks and their possible effects on the dynamics of dryland ecosystems, J. Geophys. Res. 112 (2007) G04010.

P. Garbeva, J.A. van Veen, J.D. van Elsas, Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness, Ann. Rev. Phytopathol. 42 (2004) 243-270.

P. Gyaneshwar, G.N. Kumar, L.J. Parekh, P.S. Poole, Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants, Plant Soil. 245 (2002) 83-93.

P.H. Bourrelier, J. Berthelin J. Contamination des sols par les éléments en traces : lesrisques et leur gestion. Rapport n°42 à l'Académie des Sciences. Paris, France : Lavoisier Tec &Do. (2008) p. 440.

P. Hinsinger, A. Schneider, J.E. Dufey, Le sol : ressource en nutriments et biodisponibilité. Dans: Sols *et Environnement*, Dunod (ed), Paris. (2005) 285-305.

P. Hinsinger, C. Plassard, C. Tang, B. Jaillard, Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review, Plant. Soil. 248 (2003) 43-59.

P.J. Thomas, D. Carpenter, C. Boutin, J.E. Allison, Rare earth elements (REEs): effects on germination and growth of selected crop and native plant species, Chemosphere. 96 (2014) 57-66.

P. Lemanceau, D. Expert, F. Gaymard, P.A.H.M. Bakker, J.F. Briat, Role of iron in plant-microbe interactions, Adv. Bot. Res. 51 (2009) 491-549.

P. Mikolajczak, K. Borowiak, P. Niedzielski, Phytoextraction of rare earth elements in herbaceous plant species growing close to roads, Environ. Sci. Pollut. Res. 24 (2017) 1–13.

P.M. Rutherford, M.J. Dudas, J.M. Arocena, Heterogeneous distribution of radionuclides, barium ans strontium in phosphogypse by product, Sci Total Environ. 180 (1996) 201-209.

P.M. Rutherford, M.J. Dudas, R.A. Samek, Environmental impacts of phosphogypsu, Sci. Total Environ. 149 (1994) 1-38.

P. Quevauviller, G. Rauret, J.F. LopezSanchez, R. Rubio, A.M. Ure, H. Muntau, Certification of trace metal extractable contents in a sediment reference material (CRM 601) following a three-step sequential extraction procedure, Sci. Total Environ. 205 (1997) 223–34.

P. Quevauviller, R. Rauret, G. Rubio, J.F. Lopezsanchez, A.M. Ure, J.R. Bacon, H. Muntau, Certified reference materials for the quality control of EDTA- and acetic acidextractable contents of trace elements in sewage sludge amended soils (CRMs 483 and 484), Fresen. J. Anal. Chem. 357 (1997) 611–618.

P. Ryan, E. Delhaize, D. Jones, Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52(2001) 527-560.

P. Soudek, S. Valenova, Z. Vavříková**, T.** Vaněk**,** ^{137}Cs and ^{90}Sr uptake by sunflower cultivated under hydroponic conditions, J. Environ. Radioact.88 (2006) 236-250.

R. Barzanti, F. Ozino, M. Bazzicalupo, R. Gabbrielli, F. Galardi, C. Gonnelli, A. Mengoni, Isolation and characterization of endophytic bacteria from the nickel hyperaccumulator plant Alyssum bertolonii, Microb. Ecol. 53 (2007) 306-316.

R. Boyd, M. Davis, K. Balkwill, Elemental patterns in Ni hyper accumulating and non-hyper accumulating ultramafic soil populations of *Seneciocoronatus*, S. Afr. J. Bot. 74 (2008) 158-162.

R. Calvet, Le sol : propriétés et fonctions, Volumes 1 et 2. Editions France Agricole, Dunod. Paris, France. (2003).

R.D.R. Gonçalves, L.S. Francisconi, P.S. da Silva, Rare earth elements determination in medicinal plants by Neutron Activation Analysis. International Nuclear Atlantic Conference, Recife, PE, Brazil. (2013).

R. El Zrelli, P. Courjault-Radé, L. Rabaoui, S. Castet, S. Michel, N. Bejaoui, Heavy metal contamination and ecological risk assessment in the surface sediments of the coastal area surrounding the industrial complex of Gabès city, Gulf of Gabès, SE Tunisia, Mar. Pollut. Bull. 101 (20015) 922-929.

R. Howe, R.L. Evans, S.W. Ketteridge, Copper-binding proteins in ectomycorrhizal fungi, New Phytol. 135 (1997) 123-131.

R.J. Hijmans, S. E. Cameron, J.L Parra, P.G. Jones, A. Jarvis, Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas, Int. J. Climatol. 25 (2005) 1965-1978.

R.L. Rudnick, S. Gao, Composition of the continental crust, Treatise Geochem. 3 (2003) 1-64.

R. Nascimento, J.A. Souza, A. Moreira, L.A.C. Moraes, Phosphogypsum and vinasse application: soil chemical properties and alfalfa productivity and nutritional characteristics, Rev. Caatinga. 30 (2017) 213-219.

R. Pérez-López, A. Álvarez-Valero, J.M. Nieto, Changes in mobility of toxic elements during the production of phosphoric acid in the fertilizer industry of Huelva (SW Spain) and environmental impact of phosphogypsum wastes, J. Hazard. Mater. 148 (2007) 745-750.

R. Pérez-López, J.M. Nieto, I. López-Coto, J.L. Aguado, J.P. Bolívar JP, M. Santisteban, Dynamics of contaminants in phosphogypsum of the fertilizer industry of Huelva (SW Spain): from phosphate rock ore to the environment, Appl. Geochem. 25 (2010) 705–15.

R.P. Bharti, A.S. Vastava, N. Soni, A. Tiwari, S. More, J.R. Choudhary, Phytoremediation of heavy metal toxicity and role of soil in rhizobacteria. IJSR. 4 (2014) 1-5.

R.R. Brooks, M.F. Chambers, L.J. Nicks, B.H. Robinson, Phytomining, Trends Plant
Sci. 3 (1998) 359-362.

R.R. Brooks, Plants that hyperaccumulate heavy metals: their role in phytoremediation, microbiology, archaeology. (1998) p. 380.

R. Salminen, M.J. Batista, M. Bidovec, Demetriades, 2005.Geochemical Atlas of Europe. Part 1 - Background Information, Methodology and Maps.

R. Zmemla, P. Chaurand, M. Benjdidia, B Elleuch, J.Y. Bottero, Characterization and pH dependent leaching behavior of Tunisian phosphogypsum. Am. Sci. Res. J. Eng. Technol. Sci. 24 (2016) 230-244.

S. Azabou, T. Mechichi, S. Sayadi, Zinc precipitation by heavy-metal tolerantsulfate-reducing bacteria enriched on phosphogypsum as a sulfate source, Miner. Eng. 20 (2007) 173-178.

S.A.L. Andrade, A.P.D. Silveira, R.A. Jorge, M.F DeAbreu, Cadmium accumulation in sunflower plants influenced by arbuscular mycorrhiza. International Journal of Phytoremediation. 10 (2008) 1-13.

S. Cornu, B. Clozel, Extractions séquentielles et spéciation des éléments trace métalliques dans les sols naturels. Etude et Gestion des Sols. 7 (2000) 179-189.

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

S. Ding, T. Liang, C. Zhang, J. Yan, Z. Zhang, Q. Sun, Role of ligands in accumulation and fractionation of rare earth elements in plants. Biol. Trace Elem. Res. 107 (2005) 73–86.

S. Dorjey, D. Dolkar, R. Sharma, Plant Growth Promoting Rhizobacteria *Pseudomonas*: A Review, Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 6 (2017) 1335-1344.

S. Eapen, S.F. D'Souza, Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals, Biotechnol Adv. 23 (2005) 97-114.

S. Fischer, T. Kühnlenz, M. Thieme, H. Schmidt, S. Clemens, Analysis of plant Pb tolerance at realistic submicromolar concentrations demonstrates the role of phytochelatin synthesis for Pb detoxification. Environ. Sci. Technol. 48 (2014) 7552-7559.

S. Jemai, M. Ellouze, B. Agoubi, A. Habib, Drought intensity and spatial variability in Gabes Watershed, south-eastern Tunisia. J. Water Land Dev. 31 (2016) 63-72.

S.K. Kazy, S.K. Das, P. Sar, Lanthanum biosorption by a *Pseudomonas* sp.: Equilibrium studies and chemical characterization, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 33 (2006) 773-783.

S. Koechler, F. Arsène-Ploetze, C. Brochier-Armanet, F. Goulhen-Chollet, A. Heinrich-Salmeron, B. Jost,Constitutive arsenite oxidase expression detected in arsenic-hypertolerant *Pseudomonas xanthomarina* S11, Res. Microbiol.166 (2015) 205-214.

S. Mangin, Généralités. In LCPC, ed., Bulletin de Liaison des Laboratoires des Ponts et Chaussées, numéro spécial VII "Le phosphogypse ; utilisation d'un sous-produit indutriel en technique routière", Chapitre I, (1978). pp. 7-13.

S. Massari, M. Ruberti, Rare Earth Elements as Critical Raw Materials: Focus on International Markets and Future Strategies, Resour. Policy. 38 (2013) 36-43.

S. Nayak, C.S. Mishra, B.C. Guru, M. Rath, Effects of phosphogypsum amendment on soil physico-chemical properties, microbial and soil enzyme activities, J. Environ. Biol. 32, 613-617.

S.N.C. Lavalin, Etude de l'impact sur l'environnement des rejets de phosphogypse des unités SIAPE et SAEPA à Gabès (Tunisie). Phase 1 : étude préliminaire. Rapport technique, Société Industrielle d'Acide Phosphorique et d'Engrais, Société Arabe des Engrais Phosphatés et Azotés: Tunis (Tunisie), vol. 1 "Texte". (1993).

S.N. Whiting, R.D. Reeves, D. Richards, M.S. Johnson, J.A. Cooke, F. Malaisse, Research priorities for conservation of metallophyte biodiversity and their potential for restoration and site remediation, Restor. Ecol. 12 (2004) 106-116.

S.P. McGrath, F.J. Zhao, E. Lombi, Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides, Adv. Agron. 75 (2002) 1-56.

S. Simon, Commission chargée de contrôler l'évolution de la pollution en estuaire et en baie de Seine. Brochure, Cellule de Suivi du Littoral Haut-Normand: Le Havre. (1990) p. 36.

S. Sikdar, M. Kundu, A Review on detection and abatement of heavy metals, Chem.Bio.Eng. Rev. 5 (2018) 18-29.

S. Spaepen, J. Vanderleyden, R. Remans, Indole- 3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling, FEMS. Microbiol. Rev. 31 (2007) 425-448.

S. Taghavi, C. Garafola, S. Monchy, L. Newman, A. Hoffman, N. Weyens, T. Barac, J. Vangronsvel, D. van der Lelie, Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and gevelopment of poplar trees, App. Environ. Microbiol. 75 (2009) 748-757.

Statista, Principaux pays extracteurs de terres rares dans le monde de 2010 à 2018 (en tonnes d'OTR). (2018).https://fr.statista.com/statistiques/570471/principaux-pays-producteurs-de-terres-rares-2010--/

S. VonTucher, C. Goy, U. Schmidhalter, Effect of lanthanum on growth and composition of mineral nutrients of Phaseolus vulgaris L var. nanus and Zea mays L. conv. Saccharate, J. Plant.Nutr. Soil Sci. (2001) 524-525.

S. VonTucher, U. Schmidhalter, Lanthanum from soil and nutrient solution and effects on plant growth, J. Plant. Nutr. Soil Sci. 168 (2005),574-580.

S. Zaidi, S. Usmani, B.R. Singh, J. Musarrat, Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in Brassica juncea, Chemosphere. 64 (2006) 991-997.

T. Boisselet, D. Merten, G. Büchel, Chemical and biological factors influencing heavy
metal mobilisation in the rhizosphere: implications for phytoremediation. Thèse de doctorat en biologie, Institute for Geosciences, Friedrich Schiller University, Burgweg, Germany, (2012) pp. 106-126.

T.E. Clevenger, Use of sequential extraction to evaluate the metals in mining wastes, Water Air Soil Pollut. 50 (1990) 241-254.

T. Guo, R.F. Malone, K. Rusch, Stabilized phosphogypsum: Class C fly ash: Portland II cement composites for potential marine applications. Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 3967-3973.

T. Lebeau, A. Braud, K. Jézéquel, Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: a review, Environ. Pollut. 153 (2008) 497-522.

USGS – United States Geological Survey, Mineral Commodity Summaries 2014, U.S. Geological Survey. (2014) p. 196.

V. Chin, S. Fan, B. Hill, M. Kiyota, M. Magassouba, M. Saha, C. Sun, J. Voorhees, F. Wang, Politics & economics of rare earths. (2012) pp. 1-1/9-35.

V. Gonzalez, D. Vignati, C. Leyval, L. Giamberini, Environmental fate and ecotoxicity of lanthanides: Are they a uniform group beyond chemistry? Environ. Int. 71 (2014) 148-157.

V. Laperche, M. C. Dictor, B. Clozel-Leloup, and Ph. Baranger. Guide méthodologique du plomb, appliqué à la gestion des sites et sols pollués. BRGM/RP-52881-FR, juin 2004. Étude réalisée dans le cadre des actions de Service public du BRGM 2003-POLA06.

W.A Thomas, Accumulation of rare earths and circulation of cerium by mockernut hickory trees, Can. J. Bot 53 (2011) 1159-1165.

W.E. Rauser, Phytochelatins and related peptides (structure, biosynthesis, and function), Plant Physiol. 109 (1995) 1141-1149.

W.J. Bullied, T.J. Buss, JK. Vessey, *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes: field studies, Canadian J. Plant Sci. 82 (2002) 291-298.

W.J. Fitz, W.W. Wenzel, Arsenic transformation in the soil–rhizosphere–plant system, fundamentals and potential application of phytoremediation, J. Biotechnol. 99 (2002) 259-78.

W. Peer, I. Baxter, E. Richards, J. Freeman, A. Murphy, Phytoremediation and hyperaccumulator plants. In Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification. (2006) 299-340.

W.S. Wang, W.Q. Shan, B. Wen, Z.S. Zhang, Relationship between the extractable metals from soils and metals taken up by maize roots and shoots, Chemosphere. 53 (2003) 523-30.

W. Weeger, D. Lièvremont, M. Perret, F. Lagarde, J.C. Hubert1, M. Leroy, M.C. Lett, Oxidation of arsenite to arsenate by a bacterium isolated from an aquatic environment, BioMetals. 12 (1999) 141-149.

X.D. Cao, X.R. Wang, G.W. Zhao, Assessment of the bioavailability of rare earth elements in soils by chemical fractionation and multiple regression analysis, Chemosphere. 40 (2000) 23-28.

X. Shan, H. Wang, X. Zhang, H. Zhou, Y. Zheng, H. Yu, B. Wen, 2003, Accumulation and uptake of light rare earth elements in a hyperaccumulator Dicropteris dichotoma, Plant Science. 165(2003)1343-1353.

X.F. Sheng, J.J. Xia, C.Y. Jiang, L.Y. He, M. Qian, Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape, Environ. Pollut. 156 (2008) 1164-1170.

X.F. Huang, J.M. Chaparro, K.F. Reardon, R. Zhang, Q. Shen, J.M. Vivanco, Rhizosphereinteractions: root exudates, microbes, and microbial communities 1. Botany 92 (2004) 267-275.

X. Hu, Z. Ding, X. Wang, Y. Chen, L. Dai, Effects of Lanthanum and Cerium on the Vegetable Growth of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Seedlings, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 69 (2002) 727-733.

X. Liang, C-Q. He, G. Ni, G.E. Etang, X.P. Chen, Y.R. Lei, Growth and Cd Accumulation of *Orychophragmus violaceus* as Affected by Inoculation of Cd-Tolerant Bacterial Strains, Pedosphere. 24 (2014) 322-329.

X.N. Tang, B. Zhang, G. Xie, X.S. Xia, Study on antibacterial mechanism of Ag-inorganic antibacterial material containing lanthanum. Adv Mat Res, 79-82 (2009) 1799-1802.

X. Shan, H. Wang, S. Zhang, H. Zhou, Y. Zheng, H. Yu, B. Wen, Accumulation and uptake of light rare earth elements in a hyperaccumulator Dicropteris dichotoma, Plant Sci. 165 (2003) 1343-1353.

X. Wang, Y. Lin, D. Liu, H. XU, T. Liu, F. Zhao, Cerium toxicity, uptake andtranslocation in *Arabidopsis thaliana*seedlings, J. rare earth. 30 (2012) 579-585.

X. Xu, W. Zhu, Z. Wang, G. Witkamp, Distributions of rare earths and heavy metals in field-grown maize after application of rare earth-containing fertilizer, Sci Total Environ 293 (2002) 97–105.

X. Zhuang, Z. Han, Z. Bai, G. Zhuang, H. Shim, Progress in decontamination by halophilic microorganisms in saline wastewater and soil, Environ. Pollut. 158 (2010) 1119-1126.

Y. F. Zhang, L.Y. He, Z.J. Chen, W.H. Zhang, Q.Y. Wang, M. Qian, X.F. Sheng, Characterization of lead-resistant and ACC deaminase-producing endophytic bacteria and their potential in promoting lead accumulation of rape, J. Hazard. Mater. 186 (2011) 1720-1725.

Y. Fu, F. Li, T.Xu, Q. Xu, Bioaccumulation, subcellular, and molecular localization and damage to physiology and ultrastructure in Nymphoides peltata (Gmel.) O. Kuntze exposed to yttrium, Environ. Sci. Pollut. Res. 21 (2014) 2935-2942.

Y.Q. Wang, J.X. Sun, H.M. Chen, F.Q. Guo, Determination of the contents and distribution characteristicsof REE in natural plants by NAA. J Radioanal. Nucl. Chem. 219(1997) 99-103.

Z.G. Wei, H.J. Zhang, H.X. Li, F. Hu, Research trendson rare earth element hyperaccumulator. J Chin RareEarth Soc 24 (2006) 1-11.

Y. Harlavan, Y. Erel, J.D. Blum, The coupled release of REE and Pb to the soil labile pool with time by weathering of accessory phases, Wind River Mountains, WY, Geochim. Cosmochim. Ac.73 (2009) 320-336.

Y. Lai, Q.Q. Wang, W.W. Yan, L.M. Yang, B.L. Huang, Preliminary study of the enrichment and fractionationof REEs in a newly discovered REE hyperaccumulator Pronephrium simplex by SEC-ICP-MS and MALDITOF/ESI-MS. J Anal At Spectrom20(2005)751-753.

Y. Ma, M.N.V. Prasad, M. Rajkumar, H. Freitas, Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils, Biotechnol. Adv. 29 (2011) 248-258.

Y. Sun, Q. Zhou, W. Liu, J. An, Z. Xu, L. Wang, Joint effects of arsenic and cadmium on plant growth and metal bioaccumulation: a potential Cd hyperaccumulator and As-excluder *Bidenspilosa* L, J. Hazard. Mater. 165 (2009) 1023-1028.

Y.W. He, C.S. Loh. Cerium and lanthanum promote floral initiation and reproductive growth of *Arabidopsis thaliana,* Plant Sci. 159 (2000) 117-124.

Y. Xue, L. Yang, Q. Wang, Hyperaccumulation ability of pronephrium simplex to rare earth elements and corresponding REE binding peptides (2009).

Y. Xue, Studies of the hyperaccumulation ability of Pronephrium simplex and Pronephrium triphyllum torare earth elements and their binding peptides. Xiamen University, BSc.Thesis. (2009) pp. 99.

Z. Chen, Global rare earth resources and scenarios of future rare earth industry, J. Rare Earth. 29 (2011) 1-6.

Z. Fiket, G. Medunić, M.F. Turk, M. Ivanić, G. Kniewald, Influence of soil characteristics on rare earth fingerprints in mosses and mushrooms: example of a pristine temperate rainforest (Slavonia, Croatia), Chemosphere. 179 (2017) 92–100.

Z. Kardanpour, O.S. Jacobsen, K.H. Esbensen, Local versus field scale soil heterogeneity characterization - A challenge for representative sampling in pollution studies. 2 (2015) 695-705.

Z.M. Migaszewski, A. Gałuszka, S. Dołe¸gowska, S, Hałas, K. Krzciuk, B. Gebus, Assessing the impact of Serwis mine tailings site on farmers' wells using element and isotope signatures (Holy Cross Mountains, south-central Poland), Environ. Earth Sci. 74 (2015) 629-647.

Z.S. Cetiner, S.A. Wood, C.H. Gammons, The aqueous geochemistry of the rare earth elements. Part XIV. The solubility of rare earth element phosphates from 23 to 150 degrees C, Chem. Geol. 217 (2005) 147-169.

Z. Tohidi, A. Baghizadeh, S. Enteshari, The effect of aluminum and phosphorus on Brassica napus. American European Agriculture and Environmental Sciences. 6 (2009) 137-142.

Z. Yanqun, L. Yuan, C. Jianjun, C. Haiyan, Q. Li, C. Schvartz, Hyperaccumulation of Pb, Zn and Cd in herbaceous grown on lead-zinc mining area in Yunnan, China, Environ. Int. 31 (2005) 755-762.

ANNEXES

Composition des milieux de culture bactérienne

Milieu TSB

- Tryptone…… 17 g
- Soytone/Peptone…… 3 g
- Glucose…….. 2,5 g
- NaCl……...5 g
- K_2HPO_4……2,5g

Qsp 1 L ED ; autoclavage (121 °C, 20 min)

Milieu CAA : Test productions des sidérophores

- Casamino acids (Difco)……. 5 g
- K_2HPO_4……..1,18 g
- $MgSO_4$, $7H_2O$…… 0,25 g

Qsp 1 L EUP ; ajuster le pH à 7 avant autoclavage (121 °C, 20 min)

Milieu à l'extrait de phosphogypse à chaud :

- Phosphogypse pur……10 g
- Milieu Liquide Minimum ……2 L

Autoclavage (121 °C, 20 min) ensuite filtration à chaud (filtre sans cendre en papiers Durieux N°113, puis filtre en fibre de verre 698, seuil de rétention de 0,7 µm)

Milieu Liquide Minimum :

- Saccharose...……. 10 g
- K_2HPO…….. 2,5 g
- KH_2PO_4 …… 2,5 g
- $(NH_4)_2SO_4$ ……...…...…….. 1 g
- $MgSO_4.7H_2O$ ....…… 0,2 g
- $FeSO_4.7H_2O$ ....……. 0,001 g
- $MnSO_4.7H_2O$ ....…… 0,007 g
- Eau Ultra Pure q.s.p…….. 1 L

Ajustement du pH à 7 avant autoclavage à 121 °C pendant 20 minutes

Milieu minimum DF (Dworkin Foster) :

- KH_2PO_4……..4 g
- Na_2HPO_4……6 g
- $(NH_4)_2SO_4$……..2 g
- $MgSO_4$, $7H_2O$…… 0,2 g
- Solution 1……...0,1 ml
- Solution 2……...0,1 ml (Remarque : Pas de solution 2 pour le test sidérophores) Qsp 1L EUP ; autoclavage (121 °C, 20 min)

Solution 1 : Eléments trace

- H_3BO_3…… 10 mg
- $MnSO_4$, H_2O…….. 11,2 mg
- $ZnSO_4$, $7H_2O$……. 124,6 mg
- $CuSO_4$, $5H_2O$……. 78,2 mg
- MoO_3……10 mg

Qsp 100 ml EUP stérile

Solution 2 : Sulfates de Fe

- $FeSO_4$,$7H_2O$……100mg

Qsp 10 ml EUP stérile

Milieu DF sans source d'azote : Test biodégradation de l'ACC

Solution mère

- KH_2PO_4…… 4 g
- Na_2HPO_4…….. 6 g
- $MgSO_4$, $7H_2O$…….. 0,2 g
- Solution 1…….. 0,1 ml
- Solution 2…….. 0,1 ml

Qsp 800 ml EUP ; ajuster le pH de cette solution à 7,2 avant autoclavage (121 °C, 20 min)

Solution de sucres

- Glucose ……. 2 g
- Acide gluconique ……..2 g
- Acide citrique ……2 g

Qsp 200 ml EUP ; autoclavage (121 °C, 20 min)

Mélange des solutions mères et de sucres (volume final de 1 L)

Préparation du réactif CAS (Test productions des sidérophores)

Dans une fiole jaugée de 100 mL, 6 mL de CTAB (Bromure d'héxadécyltriméthylammonium) 10 mM et 10 mL d'EUP sont mélangés. Une solution de 1,5 mL de Fe(III) (1 mM FeCl3, 6H2O ; 10 mM HCl) et 7,5 mL de la solution de CAS à 2 mM sont ajoutés lentement au mélange précédent. Une solution tampon composée de 4,307 g de pipérazine anhydre sont ajoutés au mélange. La solution CAS-shuttle est obtenue en rajoutant 0,1g d'acide 5-sulfosalicylique puis en ajustant le volume final à 100 mL avec de l'EUP.

Composition du réactif Salkowsky (Test production d'AIA)

D'après Patten et Glick (2002),

- 150 mL H2SO4 concentré,
- 250 mL d'eau distillée,
- 7,5 mL de FeCl3.6H2O 0.5M
- Stockage à 4°C

ED : eau distillée
EUP : eau ultra pure

Composition des milieux de culture des plantes

Tableau 1. Composition des milieux de culture pour plantes : Hoagland (Hoagland et Arnon, 1950) et Low Phosphate Low pH (LPP ; Fischer et al., 2014).

	Hoagland Mmol/L	**LPP µmol/L**
$MgSO_4$, $4H_2O$	2,0	200
$Ca(NO_3)_2$, $4H_2O$	4,0	280
KNO_3	6,5	600
KH_2PO_4	1,0	-
Fe-citrate	0,05	-
	µmol/L	
H_3BO_3	46,3	-
$MnCl_2$, $4H_2O$	9,1	-
$ZnSO_4$, $7H_2O$	0,87	-
$CuSO_4$, 5 H_2O	0,32	-
Na_2MoO_4, 2 H_2O	1,03	-
$(NH_4)_2HPO_4$	-	10
NH_4NO_3	-	90
Fe-NaEDTA	-	5

TABLE DES ABREVIATIONS

ACC :	1-aminocyclopropane-1-carboxylate
ACP :	Analyse en Composantes Principales
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AFNOR :	Association française de normalisation
AIA :	Acide indole acétique
ARNr :	Acide ribonucléique ribosomique
AIA :	Acide indole acétique
ANOVA :	Analyse de la variance
°C :	Degré celsius
CAA :	Casaminoacids
$CaCl_2$:	Chlorure de calcium
Cd :	Cadmium
CDM :	Milieu chimiquement défini
Ce :	Cérium
CH_3COONH_4 :	D'acétate d'ammonium
cm	Centimètre
CPG :	Compagnie des phosphates de Gafsa
CR :	Capacité de rétention d'eau
DAP :	Di-ammonium du phosphate
DF :	Dworkin foster
DFOM :	Déféroxiamine M
DNPH :	2,4-dinitrophenylhydrazine
DO :	Densité optique
ED :	Eau désionisée
EDTA :	Ethylènediamino tétra acétique
ET :	Eléments traces
ETM :	Eléments traces métalliques
EUP :	Eau ultra-pure
FBC :	Facteur de bioconcentration
FT :	Facteur de translocation
g :	Gramme
GCT :	Groupe chimique tunisien
GES :	Gaz à effet de serres
h :	Heure
H' :	Indice de biodiversité de Shannon
H_2O_2 :	Eau oxygénée
ha :	Hectar
HCl	Chlorure d'hydrogène
HDPE	Polyéthylène haute densité
HNO_3	L'acide nitrique
$HONH_3^+$, Cl^-	Chlorure d'hydroxylammonium,
HR	Humidité relative
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry

ISO	Organisation internationale de normalisation
Kg :	Kilogramme
La :	Lanthane
m :	Mètre
Mg :	Milligramme
M :	Métal
min :	Minute
MLM :	Milieu liquide minimum
mm :	Millimètre
MS :	Matière séche
Na_2EDTA :	Acide Ethylène diaminotétraacétique
NaOH2M :	Soude
Nd :	Neodymium
NF :	Norme française
nm :	Nanomètre
NPNI :	Non inoculé non planté
P :	Phosphore
PA :	Parties aériennes
PAAS	Post Archean Australian Shales
PCA :	Plat counting agar PCA
pH :	Potential d'hydrogène
P_2O_5 :	Pentoxyde de phosphore
PCR :	Polymerase chain reaction
PG :	Phosphogypse
PGPB:	Plant growth promoting bacteria
PGPR:	Plant growth promoting rhizobacteria
Pi :	Phosphate inorganique
PP :	Polypropylène
PR :	Parties racinaires
PSM	Poste de sécurité microbilogique
PSS :	Production spécifique des sidérophores
rpm :	Rotation par minute (centrifugation)
s :	Seconde
SIAPE :	Société industrielle d'acide phosphorique et d'engrais
Sr :	Strontium
T :	Témoin
tpm :	Tour par minute (agitation)
TR :	Terres rares
TSB :	Tryptone soy broth
TSP :	Triple super phosphate
TTGE :	Electrophorèse temporelle sur gel à gradient thermique
UPGMA:	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
UV :	Ultra-violet
W :	Watt
Y :	Yttrium
µL :	Microlitre

TABLE DES ACRONYMES

ANOVA	Analyse de la variance
ASPITET	Apports d'une Stratification Pédologique pour l'Interprétation des Teneurs en Éléments Traces
BCR	Bureau Communautaire de Référence
BGS:	British Geological Survey
BRGM	Bureau de Recherches Géologiques et Minières
EPA	Environmental Protection Agency
GCT	Groupa Chimique Tunisien
IMOCA	Industrial Minerals Company of Australia
INERIS	Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
LPG Nantes	Laboratoire de Planétologie et Géodynamique Nantes
SIAPE	Société Industrielle d'Acide Phosphorique et d'Engrais
STEP	Stations d'Epuration des eaux usées
USEPA	United States Environmental Protection Agency
USGS	United States Geological Survey - Institut d'études géologiques des États-Unis

VALORISATION SCIENTIFIQUE

- Publications scientifiques :

1. Jalali J., Gaudin P., Capiaux H., Neji Saidi M., Ammar E., Lebeau T. Fate and transport of metal trace elements from phosphogypsum piles in Tunisia and their impact on soil bacteria and wild plants. Accepté à *Environmental Ecotoxicological Safety*.
2. Jalali J., Gaudin P., Capiaux H., M., Ammar E., Lebeau T. Rapid screening of indigenous bacterial isolates for their plant growth promoting activities and trace elements mobilization from soils contaminated by phosphogypsum Soumis à *Journal of Hazardous Materials*.
3. Jalali J., Gaudin P., Ammar E., Lebeau T. Procédé de phytoextraction couplé à la bioaugmentation pour le traitement du Cd, Sr et la valorisation de terres rares dans des phosphogypses. A soumettre à *Journal of Hazardous Materials*

- Cmmunications scientifiques :

1. Jalali J., Gaudin P., Capiaux H., Emna A., Lebeau T. Environmental impact of phosphogypsum piles in Tunisia. Goldschmidt 2017, 13-18 august 2017, Paris, France.

2. Jalali J., Gaudin P., Ammar Emna, Lebeau T. Phytoextraction of rare earth elements from phosphogypsum piles in Tunisia. 14th International Phytotechnologies Conference, 25-29 september 2017, Montréal, Canada.

UNIVERSITE ECOLOGIE BRETAGNE GEOSCIENCES LOIRE AGRONOMIE ALIMENTATION

ENIS

G C T

UNIVERSITÉ DE NANTES

Titre : Contribution à la gestion environnementale des zones de stockage des phosphogypses en Tunisie – Traitement par association bioaugmentation / phytoextraction.

Mots clés : Bioaugmentation, Eléments traces métalliques, Impact environnemental, Phosphogypse, Phytoextraction, Terre rare

Résumé : Ce travail contribue à la résolution du problème environnemental posé par les phosphogypses (PG), grâce à une approche potentiellement peu invasive et peu coûteuse qui repose sur l'utilisation d'organismes vivants (plantes et microorganismes). Deux objectifs ont été poursuivis : i) extraire les contaminants des PG pour réduire le risque environnemental et ii) valoriser les terres rares. La méthode de phytoextraction associée à la bioaugmentation a été appliquée au Cd et Sr (objectif environnemental) et au Ce, La, Nd et Y (objectif économique). Dans un premier temps, une évaluation de l'impact environnemental de tous les sites de dépôts des PG en Tunisie a été réalisée, avec l'analyse physico-chimique des sols jouxtant les dépôts de PG ainsi que les communautés bactériennes et végétales colonisant naturellement les sites. Parmi les espèces végétales présentes, *Zygophylum album* accumule le plus les éléments traces métalliques (ETM). Dans un deuxième temps, l'aptitude des bactéries isolées à partir de prélèvements effectués sur sites, à tolérer les ETM étudiés a été évaluée. Leurs capacités à les mobiliser grâce à la production de sidérophores, dont la pyoverdine, et à stimuler la croissance des plantes grâce à la production d'acide indole acétique (AIA) et la dégradation d'ACC désaminase ont été investiguées. Les isolats les plus performants ont été associés à des plantes commerciales (*Trifolium pratense* et *Helianthus annuus*) cultivées sur un mélange PG-Terreau. Les deux plantes ont surtout accumulé le Sr et dans une moindre mesure les Ce, La et Nd. Le couplage bactéries-plantes a permis de stimuler la croissance des plantes et d'augmenter la biodisponibilité de ces ETM, sauf le Cd.

Title: Contribution to environmental management of phosphogypsum storage areas in Tunisia - Bioaugmentation treatment associated to phytoextraction process.

Keywords : Bioaugmentation, Environmental impact, Metal trace elements, Phosphogypsum, Phytoextraction, Rare earth element.

Abstract: The present work aims at solving the environmental problem raised by phosphogypsum (PG), thanks to a potentially invasive and cheap approach which relies on the use of living organisms (plants and microorganisms). Two objectives are pursued: i) extracting contaminants from PG to reduce the environmental risk and ii) valuing rare earths. The phytoextraction method associated with bioaugmentation are applied to Cd and Sr (environmental objective) and Ce, La, Nd and Y (economic objective). As a first step, an assessment of the environmental impact of all PG depository sites in Tunisia is carried out, with the physico-chemical analysis of soils adjoining PG deposits, as well as the bacterial and plant communities which naturally colonize sites. Among the present plant species, The *Zygophylum album* accumulates the most metal trace elements (MTE). As a second step, the isolated bacteria from on-site samples are evaluated for their ability to tolerate the studied MTE, their ability to mobilize MTE through the production of siderophores, including pyoverdine, and to stimulate the plants growth through the production of indole acetic acid (AIA) and degradation of the ACC deaminase. The most successful bacteria are associated with commercial plants (*Trifolium pratense* and *Helianthus annus*) which are grown on a PG-Compost mixture. Both plants mainly accumulated Sr and to a lesser extent Ce, La and Nd. The coupling of Bacteria-plant help stimulate plant growth and increase the bioavailability of the studied MTE, except for Cd.