

ÉCOLE DOCTORALE
ENERGIE, MATERIAUX, SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

Institut des Sciences de la Terre d'Orléans

THÈSE présentée par :
Romain NANDILLON

soutenue le : **29 Mars 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Science de la Terre et de l'Univers

**Phytostabilisation des éléments métalliques
d'un technosol minier végétalisé par le genre *Salix*
assistée par du biochar**

THÈSE dirigée par :

Fabienne BATTAGLIA-BRUNET

Chercheur, BRGM Orléans

RAPPORTEURS :

Thierry LEBEAU

Professeur, Université de Nantes

Michel CHALOT

Professeur, Université de Bourgogne
Franche-Comté

JURY :

Alexandra COURTIN-NOMADE

Professeur, Université de Limoges

Michel BACCHI

Dirigeant de la société RIVE

Fatima LAGGOUN-DEFARGE

DR CNRS, ISTO Orléans

Fabienne BATTAGLIA-BRUNET

Chercheur, BRGM Orléans

Domenico MORABITO

Maître de conférences, Université d'Orléans

Marie GAILLARD

Directrice de l'ingénierie IDDEA

ÉCOLE DOCTORALE
ENERGIE, MATERIAUX, SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

Institut des Sciences de la Terre d'Orléans

THÈSE présentée par :
Romain NANDILLON

soutenue le : **29 Mars 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Science de la Terre et de l'Univers

**Phytostabilisation des éléments métalliques
d'un technosol minier végétalisé par le genre *Salix*
assistée par du biochar**

THÈSE dirigée par :

Fabienne BATTAGLIA-BRUNET

Chercheur, BRGM Orléans

Co-encadrée par :

Domenico MORABITO

Maître de conférences, Université d'Orléans

Marie GAILLARD

Directrice de l'ingénierie IDDEA



Remerciements

Ma thèse se termine et une page se tourne. Cependant, durant cette courte période à l'échelle d'une vie, j'ai eu l'occasion de faire la connaissance de moult personnes entre le bureau d'étude en environnement (IDDEA), le Bureau de Recherche Géologique et Minière (BRGM), l'Institut des Sciences de la Terre d'Orléans (ISTO) et le Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Culture (LBLGC). Il sera difficile de n'oublier personne...

Les personnes que je tiens à remercier en premier lieu sont les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ces travaux. Merci aux rapporteurs Thierry Lebeau, Professeur à l'université de Nantes et Michel Chalot, Professeur à l'université de Bourgogne Franche-Comté. Je remercie également Alexandra Courtin-Nomade, Professeur à l'université de Limoges, Michel Bacchi, dirigeant de la société RIVE, Fatima Laggoun-Defarge Directrice de recherche au CNRS à l'ISTO à Orléans, d'avoir examiné cette thèse.

Je remercie, IDDEA et l'ANRT pour avoir financé cette thèse, mais aussi le DPSM pour nous avoir permis de travailler sur le site de Roure-les-Rosiers.

Bien entendu, je tiens à remercier tous mes encadrants. Je remercie tout d'abord Fabienne Battaglia-Brunet qui par ses qualités scientifiques et humaines a réussi à diriger ses travaux et m'accompagner durant ces trois années de merveilleuses manières. Un grand Merci.

Je remercie également Domenico Morabito qui m'a encadré durant cette thèse en m'apportant ses connaissances scientifiques et son aide lorsqu'il le fallait. Grazie mille per questi tre anni !

Je tiens également à remercier Marie Gaillard qui a été ma responsable scientifique au sein d'IDDEA durant cette thèse, pour sa gentillesse et sa rigueur scientifique et professionnelle. Et à Stéphane Sabatier qui m'a fait confiance en m'embauchant pour réaliser ces recherches durant ces trois années. Merci à vous deux !

Enfin, je dis un grand merci à Sylvain Bourgerie qui, même s'il n'était pas encadrant officiel de cette thèse, m'a accompagné scientifiquement et humainement durant ces trois années. Mais aussi à Florie Miard qui m'a énormément aidé sur les différentes expériences que j'ai pu réaliser, profite bien de ton congés maternité ! Et à Manhattan Lebrun, avec qui j'ai collaboré depuis le début de cette thèse sur de nombreuses expériences mais aussi, en remplissant et vidant la chambre froide par les nombreux échantillons que nous avons accumulé. Attention c'est toi la prochaine !

Je remercie tous les membres de l'ISTO qui ont contribué à ces travaux. Particulièrement Philippe Penhoud, Marielle Hatton et Rachel Boscardin qui m'ont permis d'avoir de beaux résultats.

Je remercie également les membres du LBLGC et plus particulièrement Xavier Pineau pour nos nombreuses discussions et Nour Hattab pour ton aide lors des derniers mois de la thèse.

Je souhaite aussi remercier tous les collaborateurs d'IDDEA et plus spécialement l'agence d'Olivet Martin, Paul, Audrey, Aurélie, Céline, David, France, Jennifer, Mélanie, et Franck (même si tu n'es plus vraiment à Olivet), mais aussi à tous ceux que j'ai pu croiser entre ces murs, merci pour toutes les discussions que nous avons pu avoir à la pause-café ou ailleurs !

Un grand merci à toutes les personnes avec qui j'ai collaboré, Marc Villard (Directeur de recherche INRA Val de Loire) de m'avoir fourni des graines de peupliers pour l'une de mes expériences. Mais également Maryline Soubrand et Emmanuel Joussein, (maîtres de conférences à l'université de Limoges) merci de m'avoir donné une chance de réaliser mon stage de master avec vous, de m'avoir aidé à trouver cette thèse et de m'avoir accueilli au GRESE pour mener à bien mes manipulations. Merci beaucoup, je vous en suis très reconnaissant !

Merci à tous les copains, copines qui m'ont permis de faire passer ces années plus facilement. Merci aux creusois Antho, Dudu, Alexis (Micouuuuuraud !!!), Flo, Djo et mon ptit Val, mais aussi aux anciens Creusois ou Indriens Jérémy, Ingrid, Julien, M. Thierry, Florian et Flavie. Merci pour toutes ces soirées passées ensemble ! C'est bon j'ai enfin terminé mes études ;-). Et non ! je ne t'ai pas oublié, merci à toi mon Rom et à Célia pour sa gentillesse et parce qu'il faut bien te supporter. Merci pour tes messages quotidiens, les soirées qu'on a pu passer ensemble et les futures, merci de m'avoir accueilli pendant mon très bref séjour à Lyon, j'espère y retourner rapidement !

Je tiens à remercier tout particulièrement ma famille. Vous m'avez toujours soutenu et supporté et je sais ça n'a pas toujours été facile il faut le reconnaître. Je remercie mes deux « grandes » sœurs Aurélie et Amandine j'espère pouvoir vous apporter autant que vous m'avez apporté. Merci pour vos soirées Trivial poursuit en compagnie de Ben et Nico et d'un peu de rhum ou de whisky. Merci à ma nièce Alice et mes deux neveux Martin et Auguste pour votre joie de vivre et les séances de « sport » que vous me faites subir bien malgré moi. Enfin merci à mes parents, pour tout ce que vous avez fait pour moi, pour m'avoir soutenu pendant toutes ces années !

Enfin je réserve une mention spéciale à Ana, qui m'a accompagné et supporté dans tous les moments. Je vais m'essayer un peu à l'espagnol. ¡Gracias por todo! Por estos cuatro magníficos años a tu lado, por tu alegría de vivir, por los viajes a Murcia y a otros lugares que fueron

escapadas perfectas y que me permitieron ver el sol en invierno, algo raro en Orleans. También quiero agradecer a tu padres por su amabilidad (y su jamón ;-)). Lo mejor está por delante de nosotros, ¡estoy seguro!

Bonne lecture.

Table des matières

1. Introduction générale	1
Chapitre I. Synthèse bibliographique.....	5
1. Les sols.....	6
1.1. Les sols anthropisés	6
1.2. Caractéristiques des technosols miniers et processus pédogénétiques	7
1.3. L'eau interstitielle du sol.....	9
2. Caractérisation des éléments métalliques et métalloïdes en contexte miniers 10	
2.1. Les éléments métalliques et métalloïdes en contexte minier	10
2.2. Spéciation, mobilité des éléments métalliques et métalloïdes	13
2.2.1. Méthodes de détermination de la spéciation.....	14
2.2.2. La bioaccessibilité.....	16
2.3. L'interaction des éléments métalliques et métalloïdes avec les constituants du sol	19
2.3.1. Adsorption	19
2.3.2. Complexation.....	21
2.3.3. Précipitation	21
2.3.4. Méthylation.....	21
2.4. Propriétés physico-chimiques et comportement du Pb et de l'As	22
2.4.1. Le plomb (Pb)	22
2.4.2. L'arsenic (As).....	24
3. Phytomanagement.....	26
3.1. Définitions et approches.....	26
3.2. Les amendements pour la remédiation des sols	30
3.2.1. Généralités	30
3.2.2. Les amendements utilisés au cours de la présente thèse	33
3.2.3. Tests d'écotoxicité	43
3.3. Les plantes en phytomanagement	44
3.3.1. Généralités	44
3.3.2. Les métaux et métalloïdes dans le système sol-plante.....	46
3.3.3. Les mécanismes d'absorption, de translocation et de tolérance des métaux et métalloïdes chez les végétaux	54
3.3.4. Le genre <i>Salix</i>	56
3.3.5. Le genre <i>Trifolium</i>	58
3.3.6. Intérêt de l'association d'espèces en phytomanagement	59
3.4. Les essais sur site	60
4. Objectifs de la thèse	63
Chapitre II. Présentation du site d'étude et caractérisation initiale de la parcelle expérimentale	67
1. Présentation du site d'étude	68
1.1. Historique du site d'étude	68
1.2. Contexte hydrogéologique	72
1.3. Informations sur le fond géochimique naturel	72

Table des matières

1.4.	Résidus de traitement de minerai de plomb argentifère.....	73
2.	Caractérisation initiale de la parcelle expérimentale	73
2.1.	Présentation de la parcelle.....	73
2.2.	Matériel et méthodes	74
2.3.	Résultats	78
2.3.1.	Descriptions topographiques de la parcelle et mesures du niveau de l'eau hypodermique	78
2.3.2.	Caractérisation agronomique de la parcelle expérimentale	79
2.3.3.	Caractérisation minéralogique	81
2.3.4.	Répartition et comportement géochimiques des métaux et métalloïdes dans le technosol.....	82
2.3.5.	Inventaire floristique de la lagune.....	86
	Conclusion au chapitre II	87
	Chapitre III : Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé <i>in situ</i> : expériences en mésocosme.....	88
	Introduction au chapitre III	89
1.	Matériel et Méthodes	90
1.1.	Concentrations pseudo-totales et phytodisponibles de l'As et du Pb dans le technosol de Pontgibaud	90
1.2.	Analyse de l'eau interstitielle du sol	90
1.3.	Analyses des végétaux	91
2.	Effet de différents amendements sur la phytotoxicité et la phytodisponibilité du Pb et de l'As dans le technosol de Pontgibaud	91
2.1.	Résumé de l'article.....	91
2.2.	Introduction.....	92
2.3.	Materials and Methods.....	94
2.3.1.	Soil physicochemical analysis	94
2.3.2.	Amendments	95
2.3.3.	Soil mixture preparation	95
2.3.4.	Germination tests	96
2.3.5.	Soil pore water analysis	96
2.3.6.	Plant analysis	96
2.3.7.	Statistical analysis.....	97
2.4.	Results and discussion	97
2.4.1.	Effects of amendments and plants on soil and SPW properties	97
2.4.2.	Effects of amendments on soil and SPW physico-chemical characteristics	100
2.4.3.	Plant dry weight and metal(loid) uptake	104
2.5.	Conclusion	110
3.	Capacité de différents amendements associés à une culture de trèfle pour favoriser la stabilisation de l'As et du Pb dans le technosol de Pontgibaud 111	
3.1.	Résumé.....	111
3.2.	Introduction.....	112
3.3.	Materials and methods	114
3.3.1.	Preparation of amended soils - Seed sowing and plant biomass.....	114
3.3.2.	Soil pore water (SPW) sampling and analysis	115
3.3.3.	Metal(loid) bioaccessibility test for soil samples (SBET) and plant organs	115

Table des matières

3.3.4.	Data processing and statistical analysis	115
3.4.	Results and discussions	116
3.4.1.	Effect of amendments on soil characteristics.....	116
3.4.2.	Effect of amendments and clover plants on SPW characteristics	117
3.4.3.	SPW metal(loid) concentrations and phytoavailable metal(loid)s.....	119
3.4.4.	Metal(loid) bioaccessibility in soil	121
3.4.5.	Plant growth and metal(loid) uptake.....	122
3.5.	Conclusion	127
4.	Etude l'association du saule et du trèfle	127
4.1.	Résumé.....	127
4.2.	Introduction.....	128
4.3.	Materials and methods	130
4.3.1.	Experimental design	130
4.3.2.	Mobility of metal(loids).....	130
4.3.3.	Percolation test.....	131
4.3.4.	Plants growth conditions.....	131
4.3.5.	Statistical analysis.....	132
4.4.	Results.....	132
4.4.1.	SPW physico-chemical characteristics	132
4.4.2.	Percolation water physico-chemical characteristics	134
4.4.3.	Plant growth and dry biomass measurements.....	135
4.4.4.	Plants metal(loid)s accumulation and distribution.....	136
4.5.	Discussion	139
4.5.1.	SPW physico-chemical characteristics	139
4.5.2.	Percolation water physico-chemical characteristics	141
4.5.3.	Plant growth and metal(loid)s uptake	142
4.6.	Conclusions.....	143
5.	Expérience complémentaire d'amendement à l'aide de sulfate de fer	144
5.1.	Matériels et méthodes	144
5.2.	Résultats et discussion	145
5.3.	Conclusion	147
Conclusion du chapitre III.....		147
Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud		149
Introduction au chapitre IV		150
1.	La parcelle expérimentale	151
1.1.	Présentation du dispositif.....	151
1.2.	Les amendements	154
1.3.	Obtention des boutures enracinées de saule.....	155
1.4.	Mise en place de la végétation	156
2.	Caractérisation géochimique de la parcelle expérimentale lors de la première année.....	157
2.1.	Caractérisation agronomique de la parcelle expérimentale	157
2.2.	Comportement géochimique des métaux et métalloïdes dans le sol.....	163
2.2.1.	Répartition spatiale du plomb et de l'arsenic sur la parcelle expérimentale.....	163

Table des matières

2.2.2.	Fractions phytodisponibles du plomb et de l'arsenic pour les différents blocs	165
2.2.3.	Répartition chimique du plomb et de l'arsenic sur les différents blocs : extractions séquentielles (BCR)	167
2.2.4.	Bioaccessibilité du plomb et de l'arsenic pour les différents blocs	173
3.	Suivi de l'eau hypodermique.....	178
4.	Suivi de la végétation	183
4.1.	Evaluation de la concentration en plomb dans les feuilles de saule et les parties aériennes du trèfle.....	183
4.2.	Mesures des concentrations en arsenic dans les feuilles des saules et les parties aériennes du trèfle.....	188
4.3.	Evaluation du recouvrement du trèfle et de la production de biomasse fraîche des saules	191
5.	Evaluation de l'abondance et de la diversité microbienne de la parcelle expérimentale.....	194
5.1.	Matériel et méthodes.....	195
5.2.	Evaluation de la diversité de la communauté microbienne de la parcelle expérimentale	196
	Conclusion du chapitre IV	209
	Conclusion générale et Perspective.....	211
	Références bibliographiques	221
I.	ANNEXE 1	251
II.	ANNEXE 2	270

Liste des Figures

Figure 1.1 : répartition des sites et sols pollués par région, source BASOL (consultation au 5/10/2018).....	7
Figure 1.2 : Représentation schématique de l'eau interstitielle du sol (Shaw, 1993).	10
Figure 1.3 : voies d'exposition possibles pour la biosphère à partir d'un déchet minier (adapté de Schaider <i>et al.</i> , 2007)	12
Figure 1.4 : Estimation de la mobilité potentielle des métaux et métalloïdes en fonction des réactifs utilisés : extractions séquentielles.....	16
Figure 1.5 : schéma de la notion de bioaccessibilité (RECORD, 2012).	17
Figure 1.6 : Différentes formes et mécanismes de rétention des éléments métalliques et métalloïdes dans le sol (Qasim 2015).	19
Figure 1.7 : Fraction de métaux et métalloïdes adsorbés (cations et anions) sur une surface d'hydroxyde de fer (III) en fonction du pH (d'après Sigg <i>et al.</i> 2001)	20
Figure 1.8 : Diagramme de Pourbaix (ou diagramme potentiel-pH (ou Eh-pH)) du plomb du système Pb-O-H. $\Sigma \text{Pb} = 10^{-10} \text{ mol.kg}^{-1}$, 298.15 K, 105 Pa (d'après Takeno, 2005). Indique les domaines d'existence ou de prédominance des différentes formes (ions, complexe, précipité, métal) d'un élément.....	23
Figure 1.9 : Diagramme de Pourbaix ou diagramme potentiel-pH (ou Eh-pH)) de l'arsenic du système As-O-H. $\Sigma \text{As} = 10^{-10} \text{ mol.kg}^{-1}$, 298.15 K, 105 Pa (d'après Takeno, 2005). Indique les domaines d'existence ou de prédominance des différentes formes (ions, complexe, précipité, métal) d'un élément.....	25
Figure 1.10 : Représentation schématique de l'approche de phytomanagement adapté de Burges <i>et al.</i> , 2018.	26
Figure 1.11 : Diagramme schématique illustrant les effets de la phytostabilisation assistée sur le sol et ses contaminants par l'action combinée des amendements et des végétaux (source : Bolan <i>et al.</i> , 2014).....	29
Figure 1.12 : nature interdisciplinaire des recherches menées en phytoremédiation (adapté de Ali <i>et al.</i> , 2013).....	29
Figure 1.13 : Schéma du procédé de fabrication du biochar (source biogreen®).....	33
Figure 1.14 : Mécanismes proposés (adaptés de Ahmad <i>et al.</i> , (2014)) des interactions du biochar avec les contaminants inorganiques (ions métalliques). Les cercles sur les particules de biochar montrent une adsorption physique. I - échange d'ions entre le métal cible et le métal échangeable dans le biochar, II - attraction électrostatique du métal anionique, III - précipitation du métal cible, et IV - attraction électrostatique du métal cationique.....	38
Figure 1.15 : Relations entre les caractères fonctionnels des plantes, les processus écosystémiques. Les caractéristiques fonctionnelles des plantes sont choisies en fonction du climat, de la géologie et des conditions du sol (tiré de Faucon <i>et al.</i> , 2017).....	45
Figure 1.16 : Courbe de croissance des plantes en fonction de la teneur en éléments essentiels : carence, déficience, toxicité. CCD : concentration critique de déficience, CCS : concentration critique de suffisance, CCT : concentration critique de toxicité (source : Bertoni 2006).	47
Figure 1.17 : Contribution des micro-organismes à la phytoremédiation des déchets miniers (adapté de Wang <i>et al.</i> , 2017)	49
Figure 1.18 : Schéma d'un processus de phytoremédiation dans les sols contaminés par les métaux en améliorant la mobilisation/immobilisation des métaux et métalloïdes. (a) Les microbes améliorent l'assimilation des métaux par les végétaux en produisant des chélateurs mobilisateurs de métaux. Les microbes associés aux plantes réduisent l'absorption et/ou la translocation des métaux végétaux par (b) la production de métabolites immobilisants métalliques, (c) la réduction des métaux et/ou (d) la biosorption des métaux. Abréviations : substances polymères extracellulaires (EPS) (tiré de Rajkumar <i>et al.</i> , 2012).....	50
Figure 1.19 : Schéma (adapté de Antoniadis <i>et al.</i> , 2017) montrant les mécanismes qui opèrent dans	

Liste des figures

l'interface plante-sol, en particulier dans la rhizosphère, impliquant la croissance des plantes et les processus métaboliques favorables à la santé de la plante, à travers les consortiums microbiens de la rhizosphère. Par exemple, les bactéries solubilisant le phosphate qui favorisent la croissance et la santé des plantes en inactivant les espèces réactives de l'oxygène [ROS], en activant la voie métabolique de la désaminase ACC [ACC1-Aminocyclopropane-1-carboxylate] en dégradant la ACC en ammoniac (NH ₃) et en régulant la production d'auxines qui régulent la croissance végétale. Ces processus impliquent la disponibilité des nutriments (N et P) et mobilisent et immobilisent les métaux et métalloïdes toxiques et essentiels.	53
Figure 1.20 : Différents modèles de transports des métaux dans la plante (source : Clemens et al., 2002).....	55
Figure 1.21 : Logigrammes de l'enchaînement des différentes tâches à accomplir pour la mise en place d'un procédé de phytostabilisation assistée.	65
Figure 2.1 : localisation de l'ancienne mine de Roure-les-Rosiers. (a) localisation au niveau national, (b) localisation du district de Pontgibaud avec les différents stocks et (c) localisation au niveau local du stock de Roure-les-Rosiers (source Géoportail).....	68
Figure 2.2 : localisation de la zone naturelle d'intérêt écologique faunistique et floristique de type I en vert et de la zone Natura 2000 ZSC « Gîtes de la Sioule » en jaune (source Géoportail)...	70
Figure 2.3 : Vue aérienne, datant de 2016, des dépôts de résidus de traitement de minerai de plomb argentifère de Roure-les-Rosiers (source : Géoportail).....	71
Figure 2.4 : Plan de l'ancien site minier de Roure-les-Rosiers (a) avec un zoom sur le plan des trois lagunes (b), une photo aérienne de la lagune 2 et emplacement de la parcelle expérimentale source Géoportail (c) et photo de la partie non végétalisée de la lagune 2 avec l'emplacement de la parcelle et le prélèvement d'échantillon (d).....	74
Figure 2.5 : schéma représentant les différentes mesures réalisées pour déterminer le niveau topographique relatif de la surface de la nappe d'eau hypodermique. H : hauteur du piézomètre, h : hauteur du technosol, P profondeur de la nappe, p : niveau relatif de la nappe.	75
Figure 2.6 : Schéma du déroulement d'un test UBM (BARGE) via deux étapes d'extraction, correspondant à gauche à la phase gastrique et à droite à la phase gastro-intestinale.....	77
Figure 2.7 : Localisation et disposition de de la parcelle expérimentale au sein de la lagune 2, avec sa localisation sur la lagune. Relevé topographique du technosol (a) et de la surface de la nappe d'eau hypodermique (b).....	79
Figure 2.8 : Répartition spatiale, au niveau de la parcelle expérimentale, des valeurs de pH (a), de la conductivité électrique (µS.cm ⁻¹) à l'aide du logiciel surfer 8	80
Figure 2.9 : Analyse DRX du technosol de Pontgibaud. Musc : muscovite ; Alb : albite ; Qtz : quartz ; Fds : feldspath ; Beu : beudantite ; Ang : anglesite et estimation de l'abondance relative des minéraux présents. (+++ très abondant, 0 : peu abondant)	82
Figure 2.10 : Répartition spatiale, au niveau de la parcelle expérimentale, des valeurs de concentrations du plomb (mg.kg ⁻¹) (a) et de concentrations de l'arsenic (mg.kg ⁻¹) (b) à l'aide du logiciel surfer 8.....	83
Figure 3.1 : Dry weight (mg) of dwarf beans organs (aerial parts (white column), roots (black column)) at the end of the experiment period (13 days).....	104
Figure 3.2 : Arsenic concentrations (mg.kg ⁻¹) in dwarf bean organs (aerial parts (white column), roots (black column)) at the end of the experiment period (13 days).....	106
Figure 3.3 : Lead concentrations (g.kg ⁻¹) in dwarf bean organs (aerial parts (white column), roots (black column)) at the end of the experiment period (13 days).....	107
Figure 3.4 : <i>Trifolium repens</i> dry weight (DW) (g) of organs collected at the end of the experiment (30 days); white columns: aerial parts, black columns: roots. Results are obtained from 500 seeds sown on tested soils.	123
Figure 3.5 : Arsenic (a), iron (b) and lead (c) concentration (mg.kg ⁻¹) in the different <i>Trifolium repens</i> organs collected at the end of the experiment (30 days); white columns: aerial parts, black columns: roots. Results are obtained from 500 seeds sown on tested soils.....	124

Liste des figures

Figure 3.6 : SPW physical and chemical characteristics (pH (a) and EC (b)) and metal(loid) concentrations (As (c) and Pb (d)) of Pontgibaud soil amended with biochar for 4 modalities.	133
Figure 3.7 : Dry weight of <i>Salix viminalis</i> (a) leaves (white columns), stem (grey columns) and roots (black columns), dry weight of <i>Trifolium repens</i> (b) aerial parts (leaves and stems) (white columns) and roots (black columns) obtained from 500 seeds placed on the Pontgibaud soil amended with biochar for 3 modalities at the end of the experiment (T105).	136
Figure 3.8 : Arsenic concentration (a) and lead concentration (b) (mg.kg^{-1}) in the different <i>Salix</i> organs: leaves (whites columns, stems (greys columns) and roots (blocks columns) placed on the Pontgibaud soil amended with biochar for 3 modalities at the end of the experiment (T105).	137
Figure 3.9 : Arsenic concentration (a) and lead concentration (b) (mg.kg^{-1}) in the different <i>Trifolium repens</i> organs: aerial parts (leaves, stems) (whites columns) and roots (blacks columns) obtained from 500 seeds placed on the Pontgibaud soil amended with biochar for 3 modalities at the end of the experiment (T105).	138
Figure 3.10 : Biomasses sèches (mg) des organes des haricots nains (parties aériennes (colonne blanche), racines (colonne noire)) à la fin de la période expérimentale (13 jours).	146
Figure 4.1 : Schéma conceptuel de la parcelle expérimentale avec séparation en 4 blocs amendés..	151
Figure 4.2 : Schéma conceptuel de la parcelle expérimentale avec emplacement des piézomètres (étoiles en noir) sur les différents blocs amendés et emplacement des piézomètres.	152
Figure 4.3 : Schéma conceptuel de la parcelle expérimentale avec emplacement des espèces de saules (<i>Salix purpurea</i> , <i>Salix alba</i> , <i>Salix triandra</i> , <i>Salix viminalis</i> , <i>Salix</i> sp autochtone et <i>Salix atrocinerea</i>) sur les différents blocs amendés et emplacement des piézomètres.	153
Figure 4.4 : Chronologie de la mise en place et de suivi du procédé de phytostabilisation assistée sur la parcelle expérimentale de Pontgibaud	154
Figure 4.5 : Photos des différentes étapes de la mise en place de la stratégie de phytomanagement sur la parcelle expérimentale. (a) photo de la parcelle à l'état initial, (b) photo de de la parcelle en février 2017 après labour du technosol, (c) photo du 31 mars 2017 de la parcelle expérimentale en cours d'amendement bloc PBC et (d) photo du 31 mars 2017 de la parcelle expérimentale après implantation des saules.	156
Figure 4.6 : Photos de l'évolution de la végétation de la parcelle expérimentale (a) photo lors du prélèvement de feuilles de saule en juin 2017 (T2), (b) photo lors du prélèvement de feuilles de saule en octobre 2017 (T6), (c) photo du 15 mars 2018 et (d) photo du bloc PBC lors du prélèvement de feuilles de saule en octobre 2018 (T20).	157
Figure 4.7 : répartition spatiale, au niveau de la parcelle expérimentale après apport d'amendements, des valeurs de concentration du plomb (mg.kg^{-1}) (a) et de concentration de l'arsenic (mg.kg^{-1}) (b) pour les différents blocs.	164
Figure 4.8 : fraction de plomb (%) selon le protocole d'extraction séquentielle (BCR) au moment de l'incorporation des amendements (T0) et 6,5 mois après l'apport d'amendements (T6) pour les différents blocs.	168
Figure 4.9 : fraction d'arsenic (%) selon le protocole d'extraction séquentielle (BCR) au moment de l'incorporation des amendements (T0) et 6,5 mois après l'apport d'amendements (T6) pour les différents blocs.	169
Figure 4.10 : valeurs du code d'évaluation des risques (RAC) de Pb et As au moment de l'incorporation des amendements (T0), et à 6,5 mois après amendement et végétalisation (T6) pour différents traitements.	172
Figure 4.11 : Fraction bioaccessible (%) du plomb, après ajout d'amendements (T0) et 6,5 mois après l'apport d'amendements (T6) pour les différents blocs.	174
Figure 4.12 : Fraction bioaccessible (%) du plomb, après ajout d'amendements (T0) et 6,5 mois après l'apport d'amendements (T6) pour les différents blocs.	175
Figure 4.13 : Représentation sous forme d'ACP des données d'extractions séquentielles et de	

Liste des figures

bioaccessibilité après ajout d'amendements (T0) et 6,5 mois après l'apport d'amendements (T6) pour les différents blocs.....	177
Figure 4.14 : Suivi de la concentration en plomb (mg.L^{-1}) dans l'eau hypodermique de la parcelle durant deux années de croissances (a) sur les sous-blocs non végétalisés, (b) sur les sous-blocs végétalisés avec du trèfle (c) sur les sous-blocs végétalisés avec du saule et du trèfle.....	179
Figure 4.15 : Suivi de la concentration en arsenic (mg.L^{-1}) dans l'eau hypodermique durant deux années de croissances (a) sur les sous-blocs non végétalisés, (b) sur les sous-blocs végétalisés avec du trèfle (c) sur les sous-blocs végétalisés avec du saule et du trèfle.	180
Figure 4.16 : Biplot des données de pH et de concentrations de plomb, d'arsenic des 7 prélèvements réalisés au cours de la période juin 2017-août 2018 (réalisé avec ExcelStat)..	181
Figure 4.17 : Biplot des données de pH et de concentrations de plomb, d'arsenic total, d'arsenic(V) et d'arsenic(III) en août 2018 (réalisé avec ExcelStat).....	182
Figure 4.18 : Suivi de la concentration en plomb (mg.kg^{-1}) dans les feuilles des quatre espèces de saules durant deux années de croissances T2, T6, T14 et T20 sur les différents blocs de la parcelle expérimentale.	185
Figure 4.19 : Suivi de la concentration en plomb (mg.kg^{-1}) (a) dans les parties aériennes de trèfle durant deux années de croissances, à T6, T14 et T20 et (b) analyse de la significativité de l'évolution des concentrations du temps entre T6 et T20 et entre T14 et T20 sur les différents blocs de la parcelle expérimentale.	187
Figure 4.20 : Suivi de la concentration en arsenic (mg.kg^{-1}) dans les feuilles des quatre espèces de saules durant deux années de croissance aux printemps 2017, automne 2017, printemps 2018 et automne 2018 sur les différents blocs de la parcelle expérimentale.....	188
Figure 4.21 : Suivi de la concentration en arsenic (mg.kg^{-1}) (a) dans les parties aériennes de trèfle durant deux années de croissances, à T6, T14 et T20 et (b) comparaison de la concentration au cours du temps entre T6 et T20 et entre T14 et T20 sur les différents blocs de la parcelle expérimentale.....	189
Figure 4.22 : Représentation par ACP des données d'extractions séquentielles, de bioaccessibilité et de concentrations dans les feuilles de saules en plomb et en arsenic 6,5 mois après l'apport d'amendements (T6).....	190
Figure 4.23 : Photos de la couverture de trèfle au 12 juillet 2018 sur les différents sous-blocs végétalisés avec le trèfle. (a) bloc PB, (b) bloc PC, (c) bloc PBC et (d) bloc PBCS.	192
Figure 4.24 : Biomasses fraîches (kg) des tiges par individus des quatre espèces de saules après 24 mois de croissances T24, sur les différents blocs de la parcelle expérimentale.	194
Figure 4.25 : Courbes de raréfaction (nombre cumulé d'OTU bactériennes) pour les différents sous-blocs un an après végétalisation de la parcelle expérimentale.	197
Figure 4.26 : Phyla de bactéries les plus abondants dans les différents sous-blocs de la parcelle expérimentale.....	199
Figure 4.27 : Courbes d'accumulation des archées pour les différents sous-blocs un an après végétalisation de la parcelle expérimentale.	205
Figure 4.28 : Phyla d'archées les plus abondants dans les différents sous-blocs de la parcelle expérimentale.....	206
Figure 4.29 : Genres d'archées les plus abondants dans les différents sous-blocs de la parcelle expérimentale.....	207
Figure 4.30 : Représentation par ACP des paramètres de diversité et des proportions des 7 phyla majeurs de bactéries dans les sols prélevés sur la parcelle.....	208
Figure 5.1 : Outils d'aide à la décision en vue de la mise en place d'une stratégie de phyomanagement par phytostabilisation de sites pollués par des métaux et métalloïdes assisté par des amendements.....	220
Figure I.1 : Comparaison de la structure de la diversité bactérienne au niveau phylum. Les échantillons sont comparés en fonction de l'abondance de leur phylum (en pourcentage). L'intensité de la couleur dans chaque panneau indique le pourcentage d'un phylum dans un échantillon, en se référant à la clé de couleur en haut à gauche.	266

Liste des figures

Figure I.2 : Comparaison de la structure de la diversité archée au niveau phylum. Les échantillons sont comparés en fonction de l'abondance de leur phylum (en pourcentage). L'intensité de la couleur dans chaque panneau indique le pourcentage d'un phylum dans un échantillon, en se référant à la clé de couleur en haut à gauche.	267
Figure I.3 : Cumul des précipitations mensuel en mm récupérées sur trois stations à proximité de la parcelle expérimentale (stations de Gelle, Olby et Pontgibaud) sur la période juillet 2017 décembre 2018.	268

Liste des Tables et Tableaux

Tableau 1.1 : Quelques exemples courants de phases porteuses des métaux et métalloïdes rencontrés dans les déchets miniers.....	14
Tableau 1.2 : Récapitulatif des protocoles avec les compartiments simulés, les produits utilisés et les voies d'entrées visées (adapté de RECORD 2012).....	18
Tableau 1.3 : Techniques possibles pour un système de phytoremédiation.....	27
Tableau 1.4 : Différents types d'amendements utilisés dans un procédé de phytostabilisation pour leur potentiel dans l'immobilisation des métaux et métalloïdes dans le sol (adapté de Bolan <i>et al.</i> , 2014).....	31
Tableau 1.5 : Récapitulatif de quelques études menées sur le saule sur des sols pollués au plomb et/ou l'arsenic en phytoremédiation	57
Tableau 1.6 : Etudes de terrain de procédé de phytostabilisation menées entre 2010 et 2018, classées par ordre chronologique. Une brève description est donnée pour chaque étude en annexe 1 (adapté de Gerhardt <i>et al.</i> , 2017 et mis à jour).....	60
Tableau 2.1 : Paramètres agronomiques du technosol : mesures de la capacité d'échange cationique (CEC), du carbone organique total (C_{org}), de la matière organique (MO), de l'azote total (N_{tot}), du ratio C_{org}/N_{tot} de la capacité au champ, et des éléments majeurs P et K (n= 3).....	80
Tableau 2.2 : Concentrations de plomb et d'arsenic dans l'eau porale ($mg.L^{-1}$) et leurs fractions phytodisponibles (%) obtenues par extraction simple au NH_4NO_3 , fractions du plomb et de l'arsenic (%) obtenues par extraction séquentielle (BCR) et leurs risques environnementaux (RAC) dans le technosol de la parcelle expérimentale.....	83
Tableau 2.3 : Inventaire floristique de la lagune avec les concentrations de plomb et d'arsenic dans les parties aériennes des végétaux, et le facteur de bioaccumulation (BAC) (rapport entre la concentration dans la plante et la concentration dans le technosol).....	86
Tableau 3.1 : Caractéristiques physico-chimiques de l'eau porale : pH, concentrations en plomb et arsenic ($mg.L^{-1}$) dans les différents traitements.....	145
Tableau 4.1 : propriétés physico-chimiques des amendements. Mesures de la capacité d'échange cationique (CEC), du carbone organique total (C_{org}), de l'azote total (N_{tot}), calcul du rapport C_{org}/N_{tot} , concentrations phytodisponibles ($mg.kg^{-1}$) du phosphore, du potassium, de plomb, de l'arsenic et du fer.....	155
Tableau 4.2 : Paramètres agronomiques du technosol : mesures de la capacité d'échange cationique (CEC), du carbone organique total (C_{org}), de la matière organique (MO), de l'azote total (N_{tot}) et du rapport C_{org}/N_{tot} après ajout d'amendements (T0) et 6,5 mois après l'apport d'amendements (T6) pour les différents blocs.....	158
Tableau 4.3 : concentrations phytodisponibles de P, P_2O_5 , K et K_2O ($mg.kg^{-1}$), après ajout d'amendements (T0) et 6,5 mois après l'apport d'amendements (T6) pour les différents blocs.....	161
Tableau 4.4 : concentrations totales ($mg.kg^{-1}$) et fraction phytodisponible (%) du plomb et de l'arsenic, après ajout d'amendements (T0) et 6,5 mois après l'apport d'amendements (T6) pour les différents blocs.....	165
Tableau 4.5 : Nombre d'OTU et indices de biodiversité bactérienne sur la parcelle de Pontgibaud, après un an d'expérience	197
Tableau 4.6 : Moyenne de l'abondance des séquences de genres (%) des différents sous-blocs de la parcelle expérimentale affiliées à leur embranchement.....	200
Tableau 4.7 : Récapitulatif des espèces présentes dont l'abondance de séquences dépasse 1 % sur les différents sous-blocs de la parcelle expérimentale.....	202
Tableau 4.8 : Indices de biodiversité des archées sur la parcelle de Pontgibaud, après un an d'expérience.....	205
Tableau 5.1 : Apport des différentes étapes de la méthodologie d'optimisation développée dans le cadre de la présente thèse, nécessaires au développement du procédé de phytomanagement de	

Liste des tableaux

technosol minier	218
Tableau I.1 : Etudes de terrain de procédé de phytostabilisation menées entre 2010 et 2018, classées par ordre chronologique. Une brève description est donnée pour chaque étude en annexe 1 (adapté de Gerhardt et al., 2017 et mis à jour).	252
Tableau I.2 : bilan des conditions optimales pour la croissance des espèces de saules étudiées (source : Tela Botanica).....	256
Tableau I.3 : Statistiques de la distribution du plomb selon le protocole d'extraction séquentielle (BCR) sélectionné au moment de l'incorporation des amendements (T0) et à T6 sur les blocs non végétalisés pour les différents traitements.	257
Tableau I.4 : Statistiques de la distribution du plomb selon le protocole d'extraction séquentielle (BCR) sélectionné à T6 sur les blocs non végétalisés et végétalisé pour les différents traitements.	257
Tableau I.5 : Statistiques de la distribution du plomb selon le protocole d'extraction séquentielle (BCR) sélectionné au moment de l'incorporation des amendements (T0) et à T6 sur les blocs non végétalisés pour les différents traitements.....	258
Tableau I.6 : Statistiques de la distribution de l'arsenic selon le protocole d'extraction séquentielle (BCR) sélectionné à T6 sur les blocs non végétalisés et végétalisé pour les différents traitements.	258
Tableau I.7 : Fraction bioaccessible (%) du plomb et de l'arsenic, après ajout d'amendements (T0) et 6,5 mois après l'apport d'amendements (T6) pour les différents blocs.....	259
Tableau I.8 : Suivi de la concentration en plomb (mg.kg ⁻¹) dans les feuilles des quatre espèces de saules durant deux années de croissance aux printemps 2017 (T2), automne 2017 (T6), printemps 2018 (T14) et automne 2018 (T20) sur les différents blocs de la parcelle expérimentale.....	260
Tableau I.9 : Suivi de la concentration en plomb dans les feuilles des quatre espèces de saules durant deux années de croissance aux printemps 2017 (T2), automne 2017 (T6), printemps 2018 (T14) et automne 2018 (T20) sur les différents blocs de la parcelle expérimentale.	261
Tableau I.10 : Facteurs de bioconcentration (FBC) de plomb pour les quatre espèces de saules et pour le trèfle durant deux années de croissances, à T2, T6, T14 et T20, sur les différents blocs de la parcelle expérimentale. T2 : prélèvements 2 mois après amendement, T6 : prélèvements six mois après amendement, T14 : prélèvements 14 mois après amendement, T20 : prélèvements 20 mois après amendement..	262
Tableau I.11 : Suivi de la concentration en arsenic (mg.kg ⁻¹) dans les feuilles des quatre espèces de saules durant deux années de croissance aux printemps 2017 (T2), automne 2017 (T6), printemps 2018 (T14) et automne 2018 (T20) sur les différents blocs de la parcelle expérimentale.....	263
Tableau I.12 : Suivi de la concentration en arsenic (mg.kg ⁻¹) dans les feuilles des quatre espèces de saules durant deux années de croissance aux printemps 2017 (T2), automne 2017 (T6), printemps 2018 (T14) et automne 2018 (T20) sur les différents blocs de la parcelle expérimentale. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%.....	264
Tableau I.13 : Facteurs de bioconcentration (FBC) de l'arsenic pour les quatre espèces de saules et pour le trèfle durant deux années de croissances, à T2, T6, T14 et T20, sur les différents blocs de la parcelle expérimentale. T2 : prélèvements 2 mois après amendement, T6 : prélèvements six mois après amendement, T14 : prélèvements 14 mois après amendement, T20 : prélèvements 20 mois après amendement.	265
Tableau I.14 : Vraition mensuelle de la profondeur de l'eau hypodermique sur la période juillet 2017 octobre 2018 sur les différents sous-blocs de la parcelle expérimentale.....	269

Table 3.1: Amendments physico-chemical properties. Electrical Conductivity (EC) (μS.cm ⁻¹), WHC
--

Liste des tableaux

= water holding capacity (% mass).....	95
Table 3.2: Treatment designations and percentage of different amendments per treatment.	96
Table 3.3: SPW physico-chemical characteristics (pH, EC and DOC) in the different treatments, at the beginning (T0) and at the end of the experiment (TF)	97
Table 3.4: Total Organic Carbon (TOC).....	99
Table 3.5: As and Pb concentrations in SPW (at the beginning (T0) and at the end of the experiment (TF)) and As and Pb phyto-availability using selective extractants (CaCl ₂ or NH ₄ NO ₃).	100
Table 3.6: Correlations between pH, EC, DOC, As concentration, Pb concentration, As CaCl ₂ or NH ₄ NO ₃ selective extractant, Pb CaCl ₂ or NH ₄ NO ₃ selective extractant, organs dry weight and organs metal(loid)s concentrations.	109
Table 3.7: Physico-chemical properties of amendments. EC: Electrical Conductivity (μS.cm ⁻¹), Water holding capacity (WHC) (% mass).	116
Table 3.8: Physico-chemical characteristics of tested soils at the beginning of the experiment (T0). WHC: water holding capacity (% mass), TOC: total organic carbon (% mass) and soil As, Fe and Pb concentrations (mg.kg ⁻¹) and CaCl ₂ -extractable fraction (%).	117
Table 3.9: Physico-chemical characteristics of the soil pore water of tested soils at the beginning of the experiment (T0) and after 30 days (TF).	117
Table 3.10: As, Fe and Pb bioaccessible fractions (%) in tested soils using SBET (Simplified Bioaccessibility Extraction Test).	121
Table 3.11: As, Fe and Pb bioaccessible fractions (%) in <i>Trifolium repens</i> aerial parts collected at the end of the experiment (30 days) on amended soils.....	126
Table 3.12: Amendments physico-chemical properties.	130
Table 3.13: Physico-chemical characteristics (pH and EC), concentrations of dissolved metals (As and Pb), suspended solids (SM) and metal particles (loid) (As and Pb) of Pontgibaud soil percolation water amended with biochar for 4 modalities.	134
Table 3.14 : Bioconcentration factor (BF) and translocation factor (TF) for <i>Salix</i> and <i>Trifolium repens</i> placed on the Pontgibaud soil amended with biochar for 3 modalities.....	138

Introduction générale

Depuis l'antiquité, et à travers le monde, l'exploitation des ressources minières a accompagné le développement des sociétés. Mais ce fût à partir de la révolution industrielle au XIX^{ème} siècle, et jusqu'au XX^{ème} siècle, que cette dernière s'est faite de manière intensive, et notamment en France, pays qui a connu une croissance industrielle, économique et technologique fulgurante. L'activité extractive a été, d'une part, une source de richesse et de développement, et d'autre part, une grande productrice de déchets. Ces matériaux proviennent de l'excavation des ressources minérales, ainsi que des procédés de traitement. Après l'arrêt des exploitations, les déchets miniers sont souvent laissés à l'abandon bien qu'ils contiennent la plupart du temps des éléments métalliques et métalloïdes en teneurs non négligeables. Les caractéristiques de ces anciens dépôts de déchets miniers permettent de les assimiler à des technosols. Sachant que la réhabilitation des anciens sites miniers n'est pas systématique (coût élevé, site orphelin...), la dispersion des éléments métalliques et métalloïdes présents dans ces technosols peut engendrer des risques sanitaires non négligeables. Dans ce type de technosols, les principaux métaux et métalloïdes trouvés sont : As, Cd, Cu, Hg, Pb, Sb, Zn. Cependant, parmi ces éléments métalliques et métalloïdes, certains sont essentiels au bon fonctionnement des processus physiologiques des organismes vivants, comme le zinc ou le cuivre, mais lorsqu'ils sont présents en forte concentration ils peuvent se révéler toxiques (*Hänsch et Mendel, 2009*). D'autres, tels l'As et le Hg, ne sont pas essentiels à la vie et se trouvent être toxiques à des concentrations très faibles (*Mendoza-Cózatl et Moreno-Sánchez, 2005*). Ainsi la présence de ces éléments métalliques et métalloïdes généralement en forte concentration peut causer la perte de certaines fonctions du sol, dont celle d'être un support à la biodiversité et l'implantation d'espèces végétales (*Gardea-Torresdey et al., 2005*).

Cependant, certaines plantes ont développé des stratégies afin d'être capables de s'adapter, de tolérer et de se développer sur des sols contaminés en métaux et métalloïdes. Ces différentes stratégies mises en place par les plantes sont aujourd'hui exploitées dans le domaine du phytomanagement des sites et sols pollués. Cette stratégie consiste à combiner à long terme la production d'une biomasse végétale rentable sur un site pollué tout en limitant le transfert des polluants vers l'environnement et favoriser le rétablissement des fonctions écologiques sources de services écosystémiques « méthode douce de remédiation de sites pollués ».

Le phytomanagement se développe de plus en plus sur les marchés de traitement et de gestion des sites pollués, en se posant comme techniques alternatives et/ou en compléments plus économiques et écologiques des techniques classiques. En ce qui concerne les éléments métalliques et métalloïdes, un procédé de phytomanagement nommé phytostabilisation utilise certaines espèces

végétales pour immobiliser les polluants du sol dans la rhizosphère. Ainsi, l'utilisation d'espèces ligneuses en phytoremédiation des sols contaminés aux métaux et métalloïdes est envisagée depuis plusieurs années (*Gonzalez-Oreja et al., 2008*) avec notamment la mise en œuvre d'espèces qui présentent une croissance rapide et une importante production de biomasse dépendante d'une forte consommation en eau comme le saule (*Malá et al., 2010*). Il a été montré que ces espèces ont la capacité à tolérer et accumuler les métaux et métalloïdes, du fait de leurs caractéristiques morphologiques, physiologiques et génétiques qui en font de bons candidats en phytomanagement (*Mleczek et al. 2010 ; Lebrun et al., 2017, 2018a*). Ainsi, ces plantes présentent un développement racinaire important en termes de densité et de profondeur explorée, ce qui permet une bonne absorption et stabilisation des éléments métalliques (*Marmioli et al. 2011*). Par ailleurs, ces espèces et en particulier le saule présentent un fort potentiel d'amélioration génétique par croisement naturel des géotypes les plus performants. La végétalisation de sols pollués peut être favorisée par l'incorporation au sol d'amendements qui vont permettre une amélioration de cette technique de manière directe ou indirecte, ce sera alors de la phytostabilisation assistée. En effet, les amendements utilisés peuvent directement stabiliser les éléments polluants de manière physico-chimique, mais également indirectement en améliorant la croissance des plantes. Cette amélioration permet de diminuer le risque de lixiviation en réduisant la quantité d'eau percolée car elle se retrouve alors évapotranspirée, mais va également diminuer le risque de ruissellement et d'érosion par une meilleure couverture du sol. Ainsi, des amendements organiques tels que le biochar ou le compost sont maintenant proposés dans un contexte de phytostabilisation assistée. Le biochar, qui est un produit solide issu de la pyrolyse d'une grande variété de matières organiques (biomasse végétale, boues, ...), permet d'améliorer la fertilité du sol (*Rees 2014*). De plus, ses caractéristiques particulières, comme sa surface spécifique et son pH élevé, lui confèrent des propriétés favorables pour immobiliser les éléments métalliques et métalloïdes dans le sol.

L'objectif général de ce projet de thèse est de définir une méthodologie de mise en œuvre et de suivi d'un procédé de phytostabilisation assistée faisant appel principalement à une salicacée, le saule associé au trèfle, pour une application, à terme, sur un ancien site minier, choisi en collaboration avec le BRGM, et présentant des dépôts de déchets contenant des métaux et métalloïdes.

Les travaux de recherche associés à ce projet doivent permettre de répondre aux questions scientifiques suivantes :

- De quelle façon la mobilité de deux polluants majeurs présentant des comportements chimiques contrastés, le plomb et l'arsenic, est-elle influencée par l'apport d'amendements destinés à permettre la croissance des plantes sur le technosol ? Cette question scientifique du domaine de la biogéochimie englobe la répartition et la

spéciation de ces composés dans le sol et le transfert des polluants dans les organes des plantes et celui de leur mobilité dans l'eau porale.

- La croissance des plantes, sous forme d'espèce unique ou d'association d'espèces, a-t-elle un effet sur le transfert des polluants ?
- Comment le changement d'échelle, du laboratoire au site, influence-t-il les processus biogéochimiques associés à la méthode de phytostabilisation assistée ?

Afin de répondre à ces différentes questions, le présent sujet de thèse consiste en une phase de recherche expérimentale au laboratoire, en mésocosme, suivie d'un test à petite échelle sur une parcelle expérimentale du site minier. La végétalisation de la parcelle expérimentale a pour objectif de limiter les transferts d'éléments métalliques et métalloïdes vers les différents compartiments de l'environnement et de stabiliser le technosol d'un point de vue mécanique. De plus, afin de limiter la remobilisation des métaux et métalloïdes au sein de la biomasse végétale, la sélection des espèces de saules se fera sur des géotypes qui n'accumulent pas ou très peu ces polluants.

Pour répondre à l'objectif général de ce projet qui est basé sur une double approche expérimentale, mettant en œuvre parallèlement des expériences en mésocosme et des expériences sur une parcelle expérimentale sur site, le programme de travail a été organisé en plusieurs tâches, afin de répondre à trois sous-objectifs :

Objectif 1. Maîtriser la connaissance du matériau à stabiliser,

Objectif 2. Optimiser au laboratoire les paramètres de mise en œuvre sur site du procédé de phytostabilisation,

Objectif 3. Optimiser la mise en œuvre et la méthode de suivi sur site

La réalisation de ces tâches et les résultats obtenus sont détaillés dans le présent manuscrit de thèse, organisé en quatre chapitres et une partie présentant les conclusions générales et les perspectives de ces travaux.

Le premier chapitre décrit tout d'abord l'état de l'art concernant les sols dans un contexte de sites et sols pollués, et dans un second temps le comportement des contaminants inorganiques dans ce type de sols. La bibliographie concernant les techniques de phytoremédiation est ensuite développée de façon plus étendue, notamment avec un volet spécifique sur les amendements et leur impact, mais également une compilation sur les essais sur site décrits dans la littérature. Le rôle des plantes et des microorganismes dans un contexte de phytoremédiation est également décrit dans ce chapitre.

Introduction générale

Le deuxième chapitre (Objectif 1) détaille la caractérisation de l'ancien site minier de Roure les Rosiers (Pontgibaud). Dans un premier temps, il présente l'histoire du site. Ensuite, la partie principale de ce chapitre décrit la caractérisation physico-chimique de la parcelle expérimentale tant d'un point de vue agronomique que de sa toxicité.

Le troisième chapitre (Objectif 2) présente les données obtenues au cours de la réalisation de plusieurs expériences en mésocosme, nécessaires à la mise en place du procédé de phytostabilisation assistée sur la parcelle expérimentale. Ce chapitre est constitué de trois parties rédigées sous formes d'articles scientifiques et qui correspondent aux différentes expériences menées en laboratoire. Ainsi, la première partie repose sur le choix des amendements à incorporer au technosol de Pontgibaud. La deuxième décrit le comportement du trèfle sur le technosol de Pontgibaud. Enfin, la troisième partie développe le comportement du saule associé au trèfle. Ces résultats sont valorisés sous formes de 3 articles scientifiques, un article est publié dans *clean soil, air, water* (2019), et les deux autres manuscrits sont soumis ou à soumettre aux journaux *Ecotoxicologie*, *Environmental Safety* et *Plant and Soil*.

Le quatrième chapitre (Objectif 3) expose la mise en œuvre et les résultats du suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur la parcelle expérimentale, au cours de deux années de croissance des saules et du trèfle. L'évolution de la géochimie du technosol, de la concentration dans les feuilles des saules, ainsi que la communauté microbienne sont détaillées dans cette partie.

Enfin, la dernière partie de ce manuscrit présente **les conclusions générales et perspectives** de ces travaux.

Chapitre I. Synthèse bibliographique

1. Les sols

Le sol est la couche superficielle, meuble de la croûte terrestre. Il peut être considéré comme une matière naturelle et vivante, composée de phases minérales et organiques. Il se situe à l'interface entre la lithosphère, l'atmosphère, l'hydrosphère et la biosphère à l'état solide, liquide ou gazeux. Il est source de biodiversité, pouvant contenir des milliers d'espèces animales et plusieurs centaines de milliers d'espèces bactériennes et fongiques. Il joue le rôle de support de notre alimentation par la production agricole et enfin, il structure notre paysage. Il intervient dans de nombreux cycles comme celui du carbone et de l'eau. Cependant, le sol est considéré comme une ressource peu renouvelable et l'impact de l'activité humaine se fait de plus en plus intense, le dégradant à la fois d'une façon qualitative et quantitative, ce qui produit des sols fortement anthropisés.

1.1. Les sols anthropisés

Les sols anthropisés ou anthroposols sont le fruit de processus tels que la compaction, l'excavation ou l'apport (volontaire ou non) de matériaux issus de la présence ou de l'action de l'être humain. Ils se différencient des sols « naturels » par (i) leurs compositions hétérogènes, (ii) la présence de matériaux grossiers et anthropiques (brique, béton, asphalte) et (iii) la présence potentielle de contaminants (*Morel et al. 2014*). Les sites et sols pollués sont décrits par le ministère de l'environnement, l'ADEME, ainsi que le BRGM comme faisant référence à des zones soumises à l'impact d'anciennes activités industrielles. Généralement d'origine industrielle, les pollutions résultent de rejets dans l'air, d'accidents de manutention, ou de mauvais confinements de produits toxiques.

Le Ministère de la transition écologique et solidaire, dans la base de données BASOL, inventorie en France plus de 6611 sites et sols pollués ayant accueilli une activité industrielle polluante, susceptibles de présenter un risque pour la santé de la population locale (Figure 1.1).

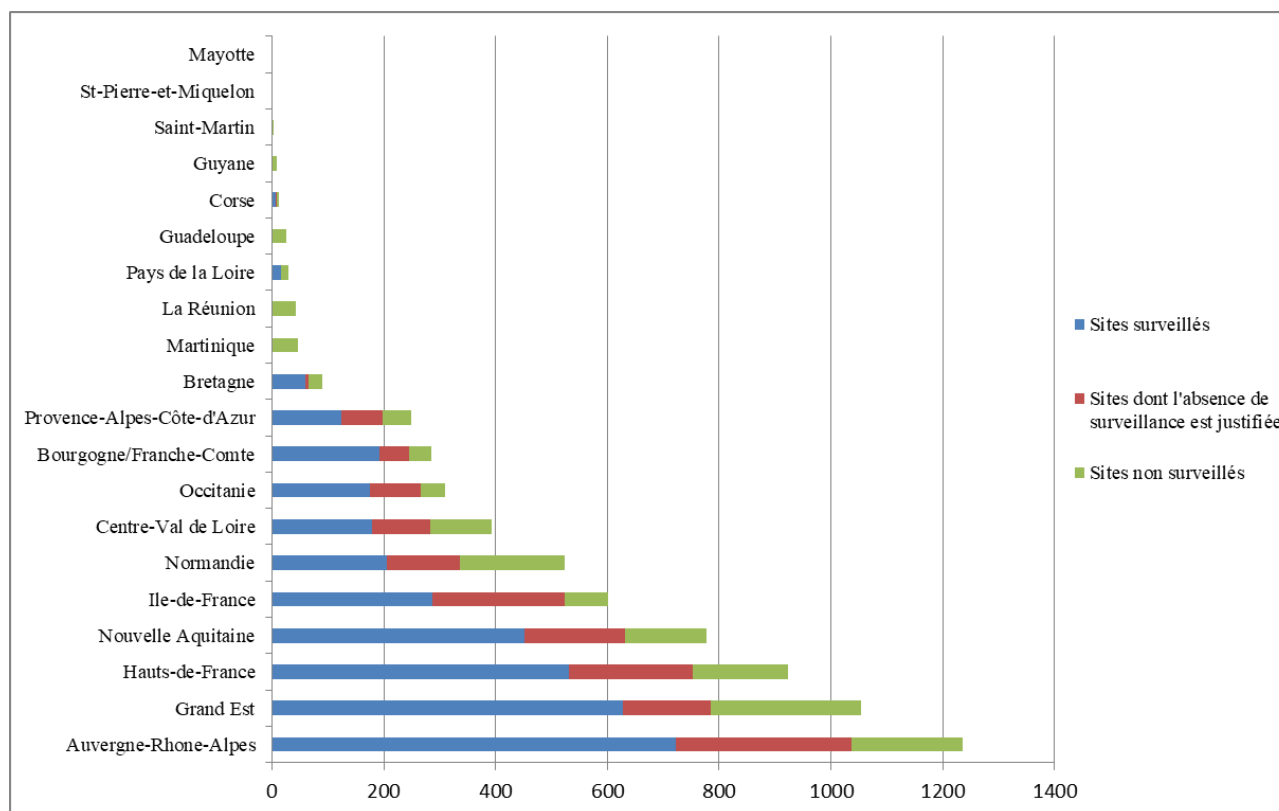


Figure 1.1 : répartition des sites et sols pollués par région, source BASOL (consultation au 5/10/2018)

De par leurs superficies et la présence d'activités industrielles, certaines régions possèdent un grand nombre de sites et sols pollués comme c'est le cas des régions comme Auvergne Rhône-Alpes, Grand Est ou la Nouvelle Aquitaine. Leur localisation est bien sûr liée au passé industriel de chaque région : sidérurgie en Lorraine, extraction d'uranium dans le Limousin, dépôts d'hydrocarbures sur les côtes du Languedoc. De plus il est à noter qu'un grand nombre de ces sites ne font l'objet d'aucune surveillance et que leur proportion est relativement stable d'une région à l'autre. Enfin, de nombreux anciens sites miniers ne sont pas répertoriés dans la base de données BASOL, dont le site objet de la présente thèse

1.2.Caractéristiques des technosols miniers et processus pédogénétiques

Les technosols sont des sols anthropisés. Cependant, la notion de technosol fait référence à des caractéristiques pédologiques alors que la notion de sol anthropisé se réfère au fonctionnement d'un écosystème donné (*Morel et al., 2014*). Ainsi le terme technosol concentre l'ensemble des sols dont les propriétés dépendent en partie ou en totalité de l'activité humaine et dont les matériaux sont d'origine technogénique (*IUSS Working Group WRB, 2014 ; Grard 2017*). De ce fait, les résidus miniers peuvent être qualifiés de technosols miniers.

Les déchets miniers, de la même façon que les matériaux naturels, peuvent subir divers processus pédogénétiques liés à des altérations physico-chimiques et biologiques dont le degré

dépend du climat, des activités biologiques, de la topographie et du temps. Les caractéristiques structurales et la nature du matériau parental (constituants, granulométrie, porosité, ...) vont permettre d'appréhender les processus qu'il subit, les cinétiques d'altération, le type de réactions chimiques régi par le régime hydrique, et aussi sa capacité à accueillir des écosystèmes (Duchaufour 1991).

Il est à noter que, dans le cas de la pédogénèse de technosol minier, l'étape de fragmentation de la roche mère habituellement décrite pour la pédogénèse des sols naturels (Pascaud 2015) est déjà réalisée.

Le régime hydrique va jouer sur la formation de minéraux. En effet, dans le cas de circulation abondante d'eau, les anions siliceux, les alcalins et alcalinoterreux sont lixiviés. Dans le cas contraire, du fait de faibles circulations hydriques ne permettant pas le transport rapide des éléments, il peut y avoir accumulation de certains éléments comme Al^{3+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , SiO_4^{4-} , ce qui favorisera la formation de minéraux par précipitation. De plus, le lessivage de particules fines peut être observé dans certains technosols comme les stériles miniers (Néel et al., 2003).

Les paramètres qui contrôlent la libération des éléments majeurs et traces des phases minérales primaires sont multiples et font intervenir différents processus physico-chimiques comme :

- L'hydrolyse qui résulte de la diffusion et de la dissolution totale ou non des minéraux au sein du réseau cristallin de protons présents en solution acide ou d'une simple autoprotolyse (Da Silva et al., 2005 ; Bhuiyan et al., 2010 ; Asensio et al., 2013).
- La complexation de l'aluminium avec des ligands organiques tels que les acides oxaliques, citriques et les composés phénoliques, qui provoquent la déstructuration du réseau cristallin des aluminosilicates (Calvet, 2003).
- L'échange cationique, qui a été mis en évidence par Badreddine et al. (2002) et Calvet (2003) montrant l'altération de la muscovite qui produit de la vermiculite en milieu alcalin par l'échange entre les cations K^+ et les cations Ca^{2+} . En milieu acide, cette transformation n'a pas lieu.
- L'oxydoréduction, qui provoque la déstructuration des minéraux contenant du fer (González-Alcaraz et Álvarez-Rogel, 2013). La réduction des oxydes de fer concerne par exemple (i) d'anciens bassins de décantation au sein desquels l'eau peut être retenue pendant des périodes longues (Néel et al. 2003) ou (ii) des terrils dont la texture est si fine qu'elle affecte le régime hydrique (Shackelford et al., 2010). En conditions aérées, l'oxydation des sulfures riches en fer tels que la pyrite induit une acidification du milieu et la mobilisation des métaux et métalloïdes (Nordstrom 2009).

Les paramètres spécifiques rencontrés dans les technosols (acidité, régime hydrique en particulier) permettent la mise en place de minéraux néoformés de type kaolinite, smectite, ainsi que des oxydes de fer et/ou des oxyhydroxydes comme la goethite ou l'hématite, généralement observés dans les sols très évolués (*Ndayiragije & Delvaux 2003; Vingiani et al. 2004 ; Pascaud 2015*).

Cependant, les phases minérales ne sont pas les seules à intervenir dans les technosols ; en effet, la phase organique joue un rôle important. Comme souvent dans le cas des technosols, trois processus différents et simultanés peuvent avoir lieu : i) incorporation de matière organique d'origine biologique, ii) transformation et minéralisation de matières organiques d'origines biologique et anthropique, et iii) stabilisation de matières organiques (essentiellement) d'origine anthropique. La similitude avec la pédogenèse des sols naturels apparaît à nouveau clairement.

Toutefois, les technosols présentent des teneurs plus faibles en carbone organique que les sols non anthropisés. Ce résultat est potentiellement lié à l'absence d'espèces végétales, du fait d'une forte toxicité et d'un manque de nutriments, ce qui va occasionner une faible incorporation de matière organique (*Parraga-Aguado et al., 2015*) mais aussi du fait d'un déficit d'activités microbiologiques ou fongiques (*Chodak et al., 2015*). Enfin, dans un certain nombre de cas, la « jeunesse » des technosols miniers (quelques dizaines d'années) par rapport à un sol naturel n'a pas encore permis l'accumulation et le transfert de carbone vers les horizons profonds (*Fu et al., 2010*). Ainsi, comme pour les sols naturels et même si la présence d'organismes vivants est très faible, une structure grumeleuse et l'augmentation de la microporosité peuvent être obtenues de manière progressive sur des technosols (*Grünewald et al., 2007, Arocena et al., 2010*), comme sur des sites réhabilités (*Pini et al., 2009 ; Zanuzzi et al., 2009 ; Jangorzo et al., 2015 ; Santini and Fey, 2015*).

1.3. L'eau interstitielle du sol

La composition et la réactivité de la phase liquide du sol dépendent des propriétés de l'eau entrante, des flux de matière provenant de la phase solide du sol, du système biologique et de l'atmosphère. Cette solution du sol sera définie comme l'eau interstitielle ou eau porale qui sont des terme moins spécifiques et qui seront utilisés dans la suite de ce manuscrit.

L'analyse de la composition de l'eau interstitielle d'un sol est souvent plus instructive que celle du sol (concentration totale) ou des extraits de sol pour y évaluer la réactivité, la mobilité et la biodisponibilité des éléments traces. Ce concept a permis de conduire au développement de plusieurs modèles qui essaient de prédire la répartition des éléments entre les différentes fractions solides du sol et leur spéciation dans la solution en équilibre avec ces phases solides.

Deux régions peuvent être identifiées pour représenter l'eau interstitielle du sol (*Qasim. 2015*). La première, nommée « eau liée », se trouve à proximité de la phase solide et correspond à la plus

importante zone de réaction de surface du système dans le milieu poreux, mais aussi de diffusion de la fraction mobile du soluté. La seconde, nommée « eau d'infiltration », correspond à la zone d'eau libre, elle régit le débit d'eau et le transport de soluté dans les sols (Figure 1.2).

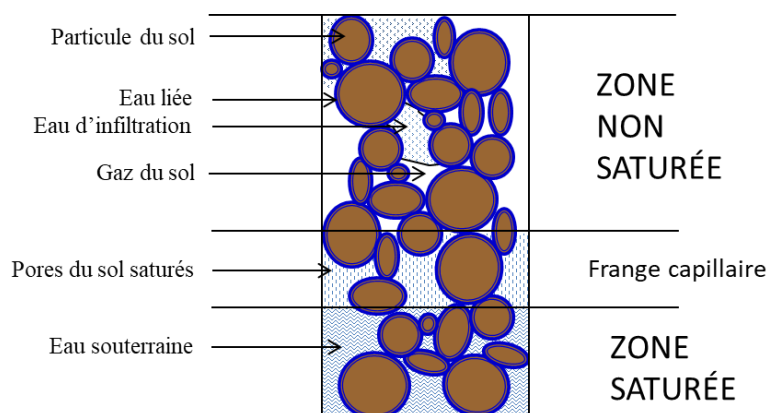


Figure 1.2 : Représentation schématique de l'eau interstitielle du sol (Shaw, 1993).

Plusieurs méthodes sont disponibles pour l'échantillonnage et l'analyse de l'eau interstitielle du sol. Cependant, aucune d'elles n'a été adoptée comme «procédure standard». Le principal facteur définissant le rapport entre les différentes phases du sol, à savoir les phases solides, liquides et gazeuses est la porosité (Qasim et al., 2015). Les concentrations de solutés dans l'eau interstitielle du sol peuvent dépendre d'un certain nombre de facteurs techniques, comme la méthode d'extraction, la tension imposée et le débit de l'échantillonneur.

Enfin, l'extraction de l'eau interstitielle introduit des artéfacts dans les compositions physico-chimiques de la solution extraite, un apport d'oxygène par exemple, ce qui peut altérer la spéciation des métaux ou métalloïdes étudiés.

La méthode mise en œuvre au cours de la présente thèse repose sur l'utilisation de bougies poreuses connectées à des seringues. Les prélèvements étaient rapides et ponctuels, et les eaux recueillies immédiatement acidifiées afin de réduire le risque de précipitation des métaux.

2. Caractérisation des éléments métalliques et métalloïdes en contexte miniers

2.1. Les éléments métalliques et métalloïdes en contexte minier

Les activités minières produisent de grandes quantités de polluants, *via* les différentes opérations liées à l'exploitation des ressources minérales. Elles se subdivisent ainsi : (1) les travaux de déblaiement, (2) les travaux d'extraction du minerai, et (3) les opérations de traitement et d'enrichissement (Boussen, 2010). Par exemple, il n'est pas étonnant de retrouver des teneurs élevées jusqu'à 4,5% en plomb dans les déchets issus de l'extraction du minerai principal de plomb

(la galène PbS) pouvant contenir jusqu'à 80% de Pb (société chimique de France). Le minerai contient également, associé à l'élément exploité, de nombreux autres éléments de types métaux et métalloïdes qui se retrouvent dans les déchets ou stériles miniers. Ces éléments métalliques et métalloïdes sont localisés dans des phases solides minérales (phases porteuses). Autrefois, ces déchets étaient généralement accumulés soit dans des bassins de décantation soit en terrils, sans réel aménagement.

La concentration en contaminants n'est que la première information sur le risque environnemental potentiel. Il est nécessaire de déterminer le comportement de ces éléments dans l'environnement *via* leur réactivité. Certains déchets miniers sont très fins, car ils ont été générés après une étape de broyage du minerai, ce qui va augmenter leur mobilité, leur solubilité et leur dispersion physique, entraînant, lorsqu'ils sont soumis aux intempéries, une migration potentielle par érosion éolienne (*Ghorbel et al., 2010*) et/ou hydrique (*Pascaud et al., 2014*). Par exemple, sur certains sites, les massifs de déchets peuvent être accessibles et diverses activités récréatives (promenade, vélo, motocross...) peuvent engendrer une déstabilisation de la couche supérieure et soulever des particules de gros diamètre.

Ces différents vecteurs de transports peuvent être la cause de la dispersion des éléments métalliques et métalloïdes contenus dans ces déchets soit (i) sous forme dissoute, soit (ii) sous forme particulaire. Par conséquent, la contamination se retrouve non plus localisée sur le site lui-même mais également aux alentours.

En effet, les déchets miniers présentent de fortes teneurs en polluants et l'étude de leur dynamique s'intègre totalement dans la gestion des risques liés à leur transfert vers l'hydrosphère ou la biosphère (*Pérez-López et al., 2008 ; El Amari et al., 2014 ; Nejeschlebová et al., 2015 ; Pascaud et al., 2015*). Par ailleurs, Chassin *et al.* (1996) ont mis en évidence un grand nombre de voies d'exposition de la biosphère aux contaminants des déchets miniers (Figure 1.3).

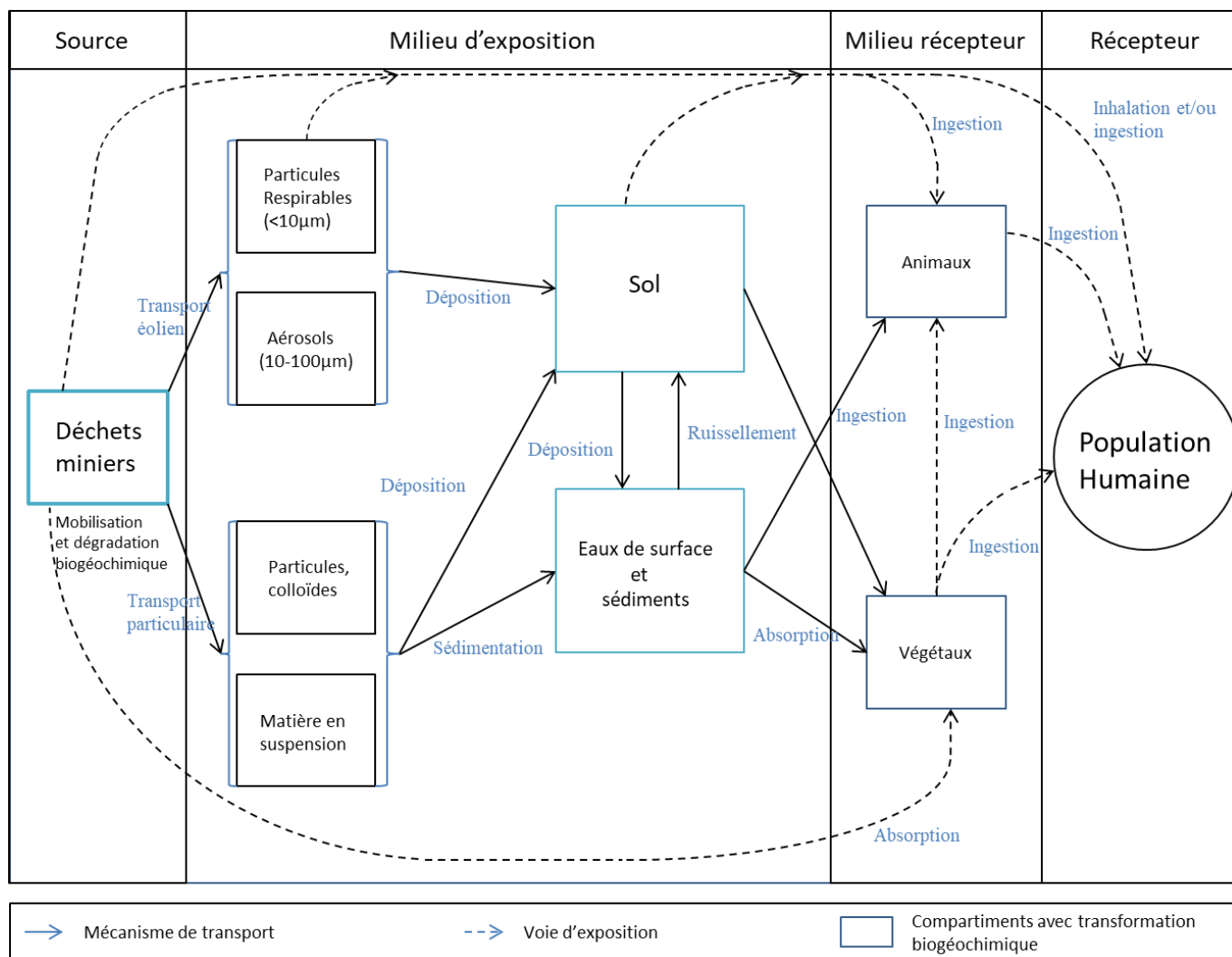


Figure 1.3 : voies d'exposition possibles pour la biosphère à partir d'un déchet minier (adapté de Schaider *et al.*, 2007)

Dans l'exposition directe par exemple, les humains peuvent être soumis aux éléments métalliques et métalloïdes par ingestion de la terre contaminée (contact main-bouche), ou encore inhalation des poussières contenues dans l'air. Ces expositions peuvent induire une augmentation de l'incidence de certaines maladies chroniques ou aiguës, un changement du confort de vie, une modification du tissu social, etc... (Coquart 2012). L'exposition est dite indirecte si elle se fait par l'intermédiaire des milieux eux-mêmes pollués : l'air, le sol, l'eau, les animaux ou les plantes. L'influence de cette exposition peut alors être plus large, par exemple, si des déchets miniers sont réutilisés ou si des éléments métalliques et métalloïdes sont transférés dans les cours d'eau ou dans l'atmosphère *via* les poussières ou s'ils entrent dans la chaîne alimentaire.

Enfin, la mesure des teneurs totales en éléments métalliques et métalloïdes ne renseigne en rien sur la toxicité de ceux-ci. Pour cela, il est nécessaire de déterminer la spéciation de ces éléments métalliques et métalloïdes au sein du déchet et par conséquent la stabilité des phases porteuses dans l'environnement.

2.2. Spéciation, mobilité des éléments métalliques et métalloïdes

Un des facteurs primordiaux à prendre en compte dans une stratégie de réhabilitation des technosols miniers est la compréhension de la dynamique des métaux et métalloïdes. La mobilité d'un élément est sa capacité à passer d'un compartiment du sol à un autre (formes échangeables, minéraux, oxydes/hydroxydes, molécules organiques). La biodisponibilité est la capacité de ce même élément à passer d'un compartiment du sol vers le vivant (Vanobberghen 2011). Pour appréhender ces deux notions, il est donc essentiel de déterminer les différentes phases porteuses.

Les phases porteuses des éléments métalliques et métalloïdes des déchets miniers sont, la plupart du temps, des phases solides minérales, de natures différentes en raison de la variabilité des minerais et de la lithologie primaire des roches exploitées. La stabilité des phases porteuses est variable en fonction du type de phase minérale et des variations des facteurs environnementaux. Ceci va donc influencer directement le comportement des métaux et métalloïdes des déchets miniers. Les facteurs environnementaux susceptibles d'influer sur le comportement des éléments métalliques et métalloïdes sont : (i) d'origine climatiques comme la pluie, la température... induisant une altération chimique des phases et leurs modifications structurales, (ii) d'origine géomorphologiques avec des modifications granulométriques (altération physique) et (iii) d'origine physico-chimiques comme les variations de pH (*e.g. Hofmann et Schuwirth., 2008 ; Chatain 2004*), de Eh (*e.g. Alloway, 1995*), ou encore une évolution du pourcentage de matière organique. Ainsi, pour les éléments Cd, Cu, Ni, Pb et Zn, une augmentation du pH du sol se traduira généralement par une diminution de leur mobilité (Rees 2014).

La percolation de l'eau météorique en contexte supergène va donner lieu à la déstabilisation des phases porteuses primaires, donnant naissance à de nouvelles phases solides néoformées (phases secondaires : oxyhydroxydes de fer, argiles...) et une redistribution des éléments métalliques et métalloïdes entre les différentes phases solides aussi bien inorganique qu'organique. Un exemple de différentes phases porteuses des déchets miniers est reporté dans le tableau 1.1, pour différents éléments métalliques et métalloïdes.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Tableau 1.1 : Quelques exemples courants de phases porteuses des métaux et métalloïdes rencontrés dans les déchets miniers

Eléments	Classes	Minéraux	Compositions majeurs	Références
As	Sulfure	arsénopyrite arséniate	FeAsS	<i>Artignan et Coltard., 2003;</i> <i>Parviainen et al., 2012;</i> <i>Roussel et al., 2000;</i> <i>Larios et al., 2013;</i> <i>Pascaud et al., 2014;</i> <i>Cerqueira et al., 2012</i>
	phosphate, arséniate,	scorodite	FeAsO ₄	
	oxyde	beudantite	PbFe ₃ (AsO ₄)(SO ₄)(OH) ₆	
Pb	Sulfure	galène	PbS	<i>Artignan et Coltard., 2003;</i> <i>Boussen et al., 2010;</i> <i>Pascaud et al., 2014;</i> <i>Cerqueira et al., 2012</i>
	Sulfate	anglésite	PbSO ₄	
	carbonate	cérusite	PbCO ₃	

Toutes ces phases minérales ont des stabilités différentes, ce qui joue un rôle sur la pérennité du piégeage des métaux et métalloïdes dans les déchets miniers puis dans les sols. Comme il est possible de le voir dans le tableau 1.1, ces phases peuvent être majoritairement de type silicate, sulfure, oxydes, carbonates ou sulfates. Cependant, les argiles et les oxyhydroxydes de fer et de manganèse peuvent également être de bons supports structuraux adsorbant des métaux et métalloïdes. Selon si les éléments métalliques et métalloïdes sont sous forme d'espèces adsorbées, complexées, précipitées, solubles organiques ou inorganiques, etc., leur mobilité et biodisponibilité sera différente. Enfin, la matière organique (MO) peut également piéger des éléments tels que l'arsenic et l'antimoine. En effet, elle possède une forte affinité vis-à-vis de Sb et As qui ne seront pas facilement libérés (*Li et al., 2014b*).

2.2.1. Méthodes de détermination de la spéciation

Il existe principalement deux grands types de méthodes pour étudier la spéciation des métaux et métalloïdes dans les solides : (1) les méthodes physiques et (2) les méthodes chimiques. Selon Cornu et Clozel (2000), les méthodes physiques peuvent permettre de déterminer directement la spéciation de l'élément métallique avec des moyens analytiques ne modifiant pas la structure contenant l'élément, à l'opposé des méthodes chimiques, où l'analyse est dite indirecte car l'élément est « sorti » de son contexte structural par des attaques chimiques.

La spéciation par méthode physique va permettre d'identifier la composition chimique des phases dans lesquelles se retrouvent les éléments chimiques recherchés. Plusieurs méthodes sont utilisées pour sa détermination comme : (1) la microscopie électronique à balayage (MEB) ou à transmission (MET) associée à un spectromètre à dispersion d'énergie (EDS) permettant de localiser des éléments dans les phases minérales ; (2) la diffraction des rayons X (DRX) qui permet de réaliser une caractérisation minéralogique des phases cristallisées et ainsi de quantifier les potentielles phases porteuses, ou encore (3) la microsonde électronique qui permet la caractérisation chimique quantitative des phases minérales (*Brisset et al., 2008*).

La spéciation par méthode chimique quant à elle va permettre d'identifier les différents types de liaisons que l'élément va former avec les ligands présents dans l'environnement. Ainsi, différentes techniques permettent de la mesurer notamment par des protocoles d'extractions chimiques :

- L'extraction sélective (simple) : cette méthode est employée pour évaluer la disponibilité des éléments métalliques et métalloïdes pour les plantes c'est-à-dire leur fraction phytodisponible. Pour en déterminer leurs teneurs extractibles et facilement échangeables, il est possible de réaliser des extractions chimiques simples avec différents réactifs. Les extractants chimiques peuvent varier, allant de l'eau déionisée à des acides très forts mais dilués, tels que l'acide nitrique ou l'acide chlorhydrique, des complexant organiques de types EDTA ou DTPA, ou des solutions salines. Les solutions salines de type chlorure de calcium ou nitrate d'ammonium permettent d'obtenir de bons résultats de corrélations entre les teneurs en métaux qu'elles permettent d'extraire et leurs teneurs dans les végétaux (*Qasim et al. 2015*).
- Les extractions séquentielles les plus utilisées sont celles de Tessier (*Tessier et al., 1979*) ou celle du « Community Bureau of Reference" européen, appelée BCR (*Davidson et al., 1994 ; Davidson et al., 1998 ; Davidson et al., 1999*) ce qui a permis une certaine homogénéisation des extractions séquentielles en proposant un schéma en 4 étapes (Figure 1.4).

Dans tous les cas, leur principe repose sur l'extraction, avec des réactifs de force croissante, des métaux et métalloïdes contenus dans les phases solides des échantillons de déchets étudiés. Les fractions ainsi obtenues ne sont pas définies par les phases minéralogiques mais par le mode opératoire utilisé (*Cornu et Clozel, 2000*). Ces dernières permettent de mettre en évidence plusieurs fractions distinctes et, selon le protocole, le nombre d'étapes peut varier. Voici les principales fractions pouvant être distinguées grâce à ces protocoles :

- La fraction échangeable : c'est la fraction des éléments qui vont s'adsorber sur les surfaces minérales par des liaisons non spécifiques de type électrostatiques (*Yong et al., 1993*). Généralement cette fraction est extraite par des solutions salines au pH du sol ou à pH neutre. La phase 1 du protocole d'extractions séquentielles de Tessier *et al.* (1979)

équivalente à la fraction acido-soluble du BCR (F1) correspond aux fractions hydrosolubles, échangeables et carbonatées.

- La fraction « réductible » : ce sont les métaux et métalloïdes liés aux oxyhydroxydes de fer et de manganèse qui sont différenciés en fonction de leur cristallinité : amorphe et cristallisé (*Cornu et Clozel, 2000*). La solution d'extraction consiste en une solution de chlorhydrate d'hydroxylamine. Cette fraction est généralement extraite en phase 3 du protocole de Tessier et à la fraction 2 du BCR.
- La fraction oxydable comprend principalement les métaux et métalloïdes associés à la matière organique et aux sulfures. L'extraction sera réalisée avec une solution de peroxyde d'hydrogène. Cette extraction est utilisée dans la phase 4 du protocole de Tessier et la fraction 3 du BCR.
- Et, enfin, la dernière fraction est la fraction résiduelle qui correspond essentiellement aux métaux et métalloïdes qui sont intégrés dans les réseaux cristallins (*Cornu et Clozel, 2000*).

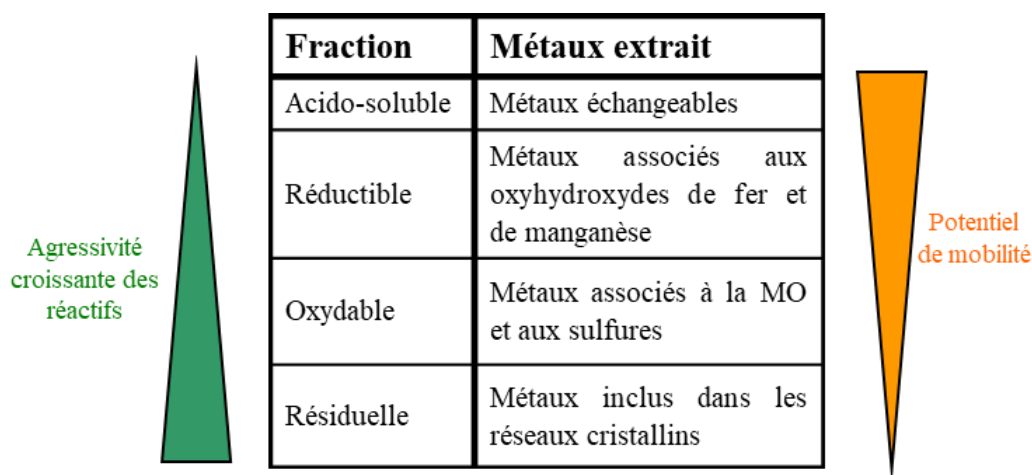


Figure 1.4 : Estimation de la mobilité potentielle des métaux et métalloïdes en fonction des réactifs utilisés : extractions séquentielles

2.2.2. La bioaccessibilité

La bioaccessibilité fait généralement référence à une mesure de la biodisponibilité physiologique du métal *via* les différentes voies d'entrée du corps humain (ingestion et inhalation). La solubilisation des métaux et métalloïdes est généralement nécessaire pour son absorption à travers les membranes des organismes vivants. Dans certaines circonstances, si la solubilité est le déterminant majeur de l'absorption pour l'entrée des contaminants, la bioaccessibilité pourra, en effet, prédire la fraction d'un polluant pouvant atteindre la circulation systémique (*US EPA, 2007*).

L'exposition de l'Homme aux déchets miniers et aux sols contaminés se fait par inhalation de

poussières et surtout par ingestion. La mesure de la fraction bioaccessible est mise en œuvre par la simulation des attaques chimiques subies par les particules contaminées dans le tractus gastro-intestinal (salive, sucs gastriques et intestinaux) ou par la voie pulmonaire (mucus).

L'impossibilité de réaliser ce type d'expérimentations sur une population humaine a abouti à développer des protocoles *in vitro* non invasifs, permettant d'approcher la biodisponibilité des éléments étudiés à l'aide de composés chimiques mimant le tractus gastro-intestinal (Feidt *et al.*, 2011). Ainsi, plusieurs protocoles sont proposés et vont voir le nombre de compartiments du tractus gastro-intestinal mimés varier (Figure 1.5). Deux de ces tests sont exposés Tableau 1.2.

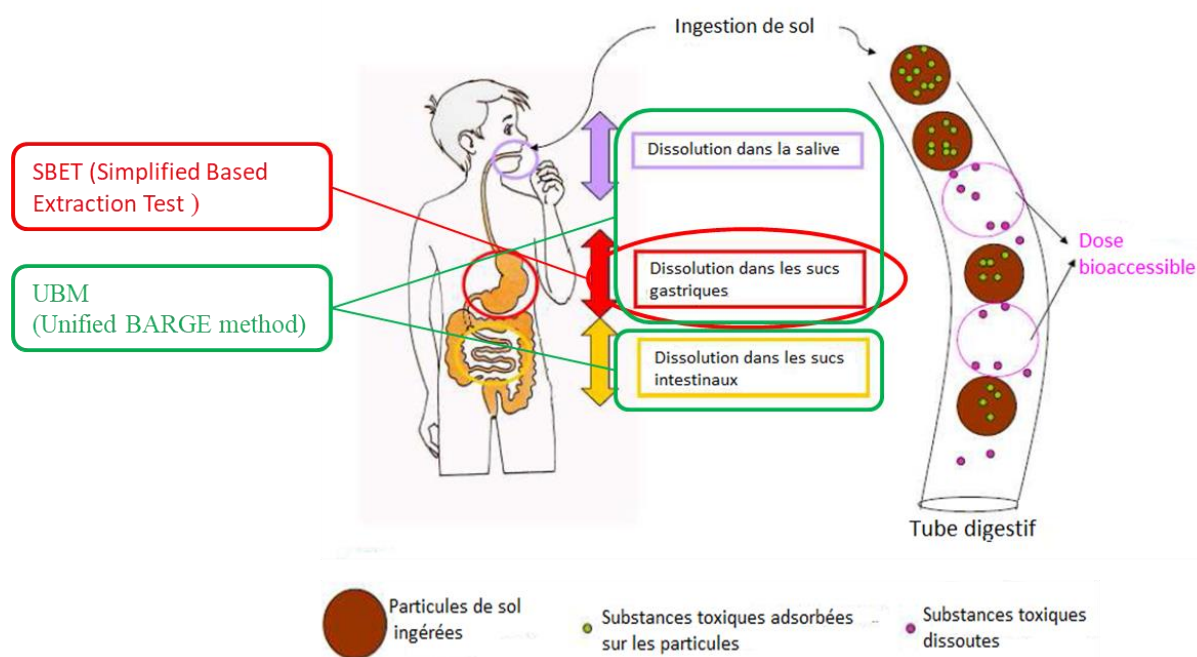


Figure 1.5 : schéma de la notion de bioaccessibilité (RECORD, 2012).

- Le test SBET est un test en une seule étape représentant uniquement le compartiment gastrique où la bioaccessibilité est la plus forte (Ruby *et al.*, 1996 ; Casteel *et al.*, 1997 ; USEPA, 2007).
- Le test UBM (UBM : Unified BARGE Method) est un des tests les plus aboutis ; il se rapproche le plus du processus de la digestion d'un point de vue physiologique pour un test statique. Il simule trois phases digestives à différents pH, elles-mêmes composées de phases inorganiques, organiques et biologiques. Ces phases sont différentes en fonction des compartiments étudiés.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Tableau 1.2 : Récapitulatif des protocoles avec les compartiments simulés, les produits utilisés et les voies d'entrées visées (adapté de RECORD., 2012).

Acronymes et nom des tests	Segments simulés	pH adoptés	Solutions utilisées			Références
			Composés inorganiques	Composés organiques	Autres composés	
SBET (Simplified Based Extraction Test)	Estomac	1,5	HCl		Glycine	adapté de Schoff (2003)
	Bouche	6,5	KCl KSCN NaH ₂ PO ₄ NaCl NaOH	urée	-amylase Acide urique mucine	
UBM (Unified BARGE method)	Estomac	1,2-1,8	NaCl NaH ₂ PO ₄ KCl CaCl ₂ , 2H ₂ O NH ₄ Cl HCl	-glucose -acide glucuronique -urée -chlorhydrate de glucosamine	Albumine bovine, pepsine, mucine	Caboche (2009)
	Intestin grêle	5,8-6,8	NaCl NaHCO ₃ KH ₂ PO ₄ KCl MgCl ₂ HCl	urée	CaCl ₂ . 2H ₂ O Albumine bovine pancréatine lipase	
	Bile		NaCl NaHCO ₃ KCl HCl	urée	CaCl ₂ . 2H ₂ O Albumine bovine Bile porcine	

Les différents tests présentés précédemment permettent de définir l'éventuel transfert de métaux et métalloïdes d'un compartiment à un autre, jusqu'au compartiment humain. Ces transferts dépendent de divers processus associés aux composants du sol.

2.3. L'interaction des éléments métalliques et métalloïdes avec les constituants du sol

A l'interface solide – liquide, plusieurs mécanismes d'interactions physico-chimiques peuvent être impliqués dans l'échange et/ou la rétention des éléments métalliques et métalloïdes : (1) l'adsorption spécifique ou non spécifique, (2) la précipitation/coprécipitation, (3) la complexation de surface et (4) la fixation par la matière organique (Figure 1.6). Il est à préciser que certains métaux et métalloïdes tels que l'As sous la forme d'arsine (AsH_3) et les formes méthylées d'arsenic, le Hg sous forme élémentaire ou sous forme organique (méthylée) et le Se sous la forme de sélénure d'hydrogène (H_2Se), diméthyl sélénide ($\text{C}_2\text{H}_6\text{Se}$) ou de diméthyl disélénide ($\text{C}_2\text{H}_6\text{Se}_2$) peuvent se retrouver dans l'atmosphère sous forme de composés gazeux (INERIS 2010, 2011 ; Bolan et al., 2013).

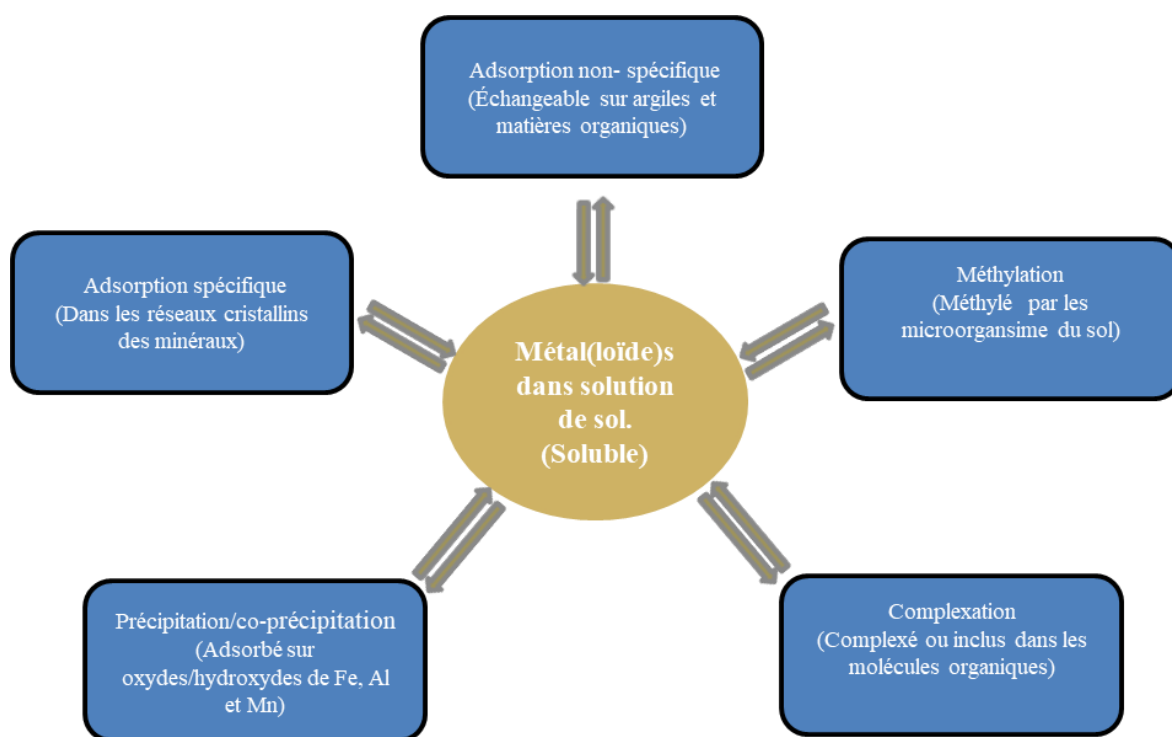


Figure 1.6 : Différentes formes et mécanismes de rétention des éléments métalliques et métalloïdes dans le sol (Qasim 2015).

2.3.1. Adsorption

L'adsorption se définit comme la fixation de matière à l'interface solide – liquide. Deux mécanismes d'adsorption sont habituellement identifiés : (1) l'adsorption physique non spécifique (physisorption) et (2) l'adsorption chimique spécifique (chimisorption) (Bolan et al., 2014).

Dans le cas de physisorption, l'énergie de la liaison de type Van der Waals est relativement faible et des échanges cationiques se produisent (Galvez-Cloutier et Lefrançois 2005) : les cations en solution sont par exemple attirés par des forces électrostatiques, vers les charges négatives de la

Chapitre I : Synthèse bibliographique

surface des particules du sol telles que les particules argileuses (*Majone et al. 1996*), les oxydes (*Martinez et McBride 1998*) et les substances humiques (*Andreux 1997*). L'adsorption non spécifique se produit sans modification de la structure moléculaire et est réversible. Elle a lieu au sein d'une sphère de molécules d'eau enrobant les particules du sol sans interactions entre les atomes de métal et la surface des particules du sol. Ce type d'interaction est nommé « complexe de sphère externe » (*Sposito 1989*).

La chimisorption résulte d'une interaction chimique qui se traduit par un transfert d'électrons entre le solide et l'adsorbat sans aucune molécule d'eau interposée entre les ions de métaux ou métalloïdes et un atome du substrat. On parle de formation de « complexe de sphère interne » (*Alloway 1995*). Il y a alors formation d'un composé chimique à la surface de l'adsorbant faisant intervenir des liaisons chimiques fortes de type ioniques ou covalentes (*Blanchard 2000*), plus stables que la liaison électrostatique de sphère externe. Les éléments métalliques ou métalloïdes ainsi chimisorbés seront beaucoup moins susceptibles d'être mobilisés.

Ces processus sont principalement affectés par le pH qui va directement impacter la charge électrique de surface (Figure 1.7).

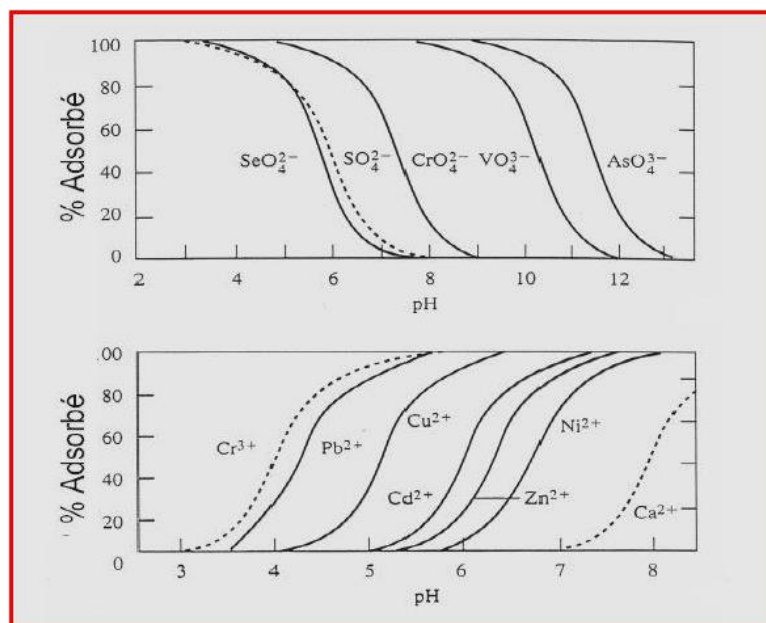


Figure 1.7 : Fraction de métaux et métalloïdes adsorbés (cations et anions) sur une surface d'hydroxyde de fer (III) en fonction du pH (d'après Sigg *et al.* 2001)

Ainsi à des pH acides, l'adsorption des anions est favorisée par une charge positive des sites de surface. Au contraire, aux pH basiques, les sites de surface sont chargés négativement, et favorisent l'adsorption des cations. De plus, une charge de surface négative peut être favorisée, indépendamment du pH par la substitution d'ions Al^{3+} et Si^{4+} par des ions divalents et trivalents.

2.3.2. Complexation

La formation de complexes fait intervenir une liaison de coordination entre un atome « donneur » (ligand) et un atome ou un ion métallique « accepteur » (*Stumm et Morgan 1996*). Des liaisons covalentes de coordination peuvent également s'établir entre les atomes d'oxygène et des métaux de transition, ou bien des liaisons hydrogène faisant intervenir les groupements hydroxylés de la surface des particules du sol et ceux des ions complexes de la solution.

Les cations métalliques, ainsi que les oxyanions tels que l'As et le Sb peuvent former des complexes avec différents ligands organiques tels que les acides humiques et fulviques (*Galvez-Cloutier et Lefrançois 2005*) et inorganiques comme les carbonates, phosphates et sulfates présents dans la phase aqueuse du milieu (*Evans 1989*).

2.3.3. Précipitation

La précipitation et la coprécipitation sont des phénomènes jouant un rôle très important pour retenir les éléments métalliques et métalloïdes dans la phase aqueuse du sol (*Qasim 2015*) et se définissent comme le passage d'un élément dissous dans une solution à l'état solide. Elles peuvent intervenir lorsque l'équilibre d'adsorption/désorption est supérieur à la limite de solubilité (produit de solubilité (K_s)). Dans le milieu naturel, les principaux précipités pour les métaux et les métalloïdes sont sous la forme d'hydroxydes, de sulfates ou de carbonates. Ces derniers sont directement influencés par les conditions environnementales telles que le pH et le potentiel d'oxydo-réduction. Des pH élevés dus à une augmentation des ions hydroxyde ou carbonate, vont favoriser la précipitation des cations métalliques (*Bolan et al., 2014*).

Par exemple, *Lu et al. (2011)* ont confirmé que la coprécipitation de Pb(II) avec des oxyhydroxydes ferriques a lieu à pH 4 environ et semble plus efficace que l'adsorption pour éliminer le Pb(II) de solutions aqueuses à des pH similaires.

2.3.4. Méthylation

La méthylation est un mécanisme chimique et biologique permettant de modifier la toxicité, la volatilité, la solubilité, et la mobilité des métaux et métalloïdes (par exemple : As, Hg) en les convertissant en dérivés méthyliques (*Bolan et al., 2014*).

Bien que la méthylation des métaux et métalloïdes se produise par des processus chimiques (abiotiques) et biologiques, la méthylation biologique (biométhylation) est considérée comme le processus dominant dans les sols et les milieux aquatiques. La biométhylation peut entraîner une baisse de la toxicité des métaux et métalloïdes, puisque les dérivés méthylés sont généralement

moins toxiques et peuvent être excrétés facilement par les cellules et sont souvent volatils comme par exemple les substances organoarséniées.

Ainsi, comme nous avons pu le constater, l'ensemble des processus décrits précédemment sont contrôlés soit par des facteurs physico-chimiques comme le pH du sol et de la solution de sol, la température, le potentiel d'oxydo-réduction et la concentration en solutés, soit par des facteurs biologiques (*Garnier-Laplace et al., 1997 ; Qasim 2015*).

2.4. Propriétés physico-chimiques et comportement du Pb et de l'As

Dans la présente étude, les principaux éléments polluants retrouvés dans le technosol étudié sont en termes de concentrations le plomb ($\sim 10 \text{ g.kg}^{-1}$) et l'arsenic ($\sim 0,5 \text{ g.kg}^{-1}$). Ainsi il est judicieux de détailler leurs principales caractéristiques.

2.4.1. Le plomb (Pb)

Le plomb, de numéro atomique 82, est un élément chimique issu de la famille des cristallogènes. Parmi ses différents états d'oxydations, Pb(II) est le plus commun à la surface de la Terre. Les autres sont Pb(IV) et Pb(0). Le plomb est connu pour sa toxicité, son caractère reprotoxique et mutagène et n'est pas essentiel pour l'organisme. Ainsi, bien que sa toxicité soit avérée, sa spéciation peut en faire varier les effets.

Cet élément est naturellement présent dans l'environnement à une concentration moyenne de l'ordre de 32 mg.kg^{-1} dans la croûte terrestre (*Pais et Benton 2000*). Dans les sols français, des concentrations comprises entre 9 et 50 mg.kg^{-1} sont trouvées dans des environnements non pollués (fond géochimique) (*Baize 1997*). Par contre, des teneurs en plomb supérieures à 110 mg.kg^{-1} traduisent soit un fond géochimique élevé, soit une source de contamination proche (*Juste 1995*). Les sources principales de plomb dans l'environnement sont les activités anthropiques : rejets des automobiles (avant l'interdiction du plomb dans les carburants au 1^{er} janvier 2000), épandage de boues de stations d'épuration et surtout activités minières.

Le plomb dans le sol est souvent rencontré sous les formes de galène (PbS) ou d'anglésite (PbSO₄), (cette dernière est la forme oxydée de la galène), c'est le cas dans les gisements de sulfures, ou sous forme de cérusite (PbCO₃) dans un contexte carbonaté. Enfin, il peut simplement se rencontrer sous forme d'oxyde de plomb (PbO). Dans certains sols, la formation d'espèces méthylées d'origine microbienne a déjà été évoquée. Ces espèces sont beaucoup moins présentes que les complexes inorganiques, mais elles sont beaucoup plus toxiques.

Le plomb peut entrer en compétition avec les autres cations sur les sites d'adsorption de surface des solides, ou réagir avec des ligands organiques ou des ions tels que les carbonates,

chlorures, sulfates, nitrates et fluorures. Le plomb peut alors former des espèces aqueuses hydroxylées : PbOH^+ ; $\text{Pb}(\text{OH})_2\text{aq}$ et $\text{Pb}(\text{OH})_3^-$ (Baes et Mesmer 1976). Comme pour l'ensemble des éléments chimiques, le comportement géochimique du plomb dans les sols dépend essentiellement de sa forme, et donc des conditions physico-chimiques environnementales (pH, Eh, CEC...) (Merrington et Alloway 1994) (Figure 1.8). Les conditions supergènes rencontrées peuvent déstabiliser les minéraux contenant le plomb. Il se retrouve alors libéré et peut s'adsorber sur les phases solides (autres minéraux), sachant qu'il possède une grande affinité vis-à-vis de la matière organique (Bolan et al., 2014).

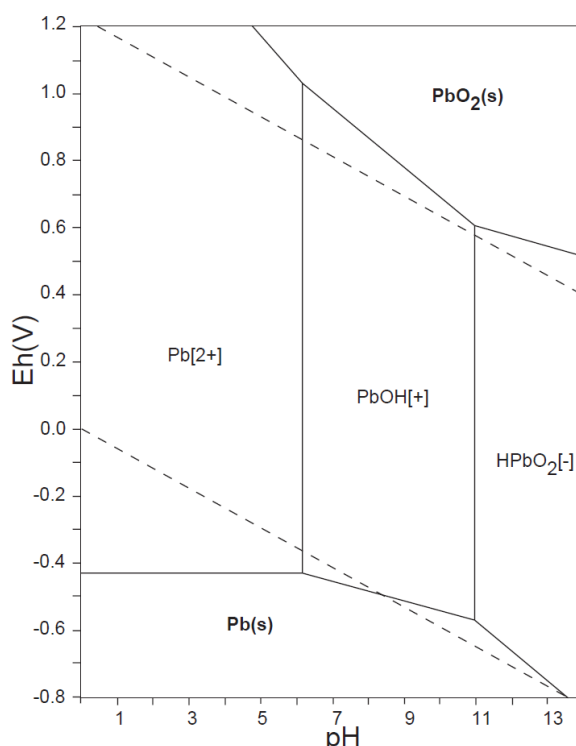


Figure 1.8 : Diagramme de Pourbaix (ou diagramme potentiel-pH (ou Eh-pH)) du plomb du système Pb-O-H. $\Sigma \text{Pb} = 10^{-10} \text{ mol.kg}^{-1}$, 298.15 K, 105 Pa (d'après Takeno, 2005). Indique les domaines d'existence ou de prédominance des différentes formes (ions, complexe, précipité, métal) d'un élément.

Lorsque le pH du sol est inférieur à 6, le plomb a tendance à être lentement dissous dans le milieu : l'espèce Pb^{2+} devient dominante et ira s'associer aux oxy(hydroxy)des de fer et manganèse (Anawar 2015) ainsi qu'à la matière organique. Des pH supérieurs favoriseront la formation de précipités de carbonates de plomb, d'hydroxydes ou de sulfates insolubles, ou l'adsorption de plomb à la surface des minéraux argileux (Boussen et al., 2010).

En milieu naturel, le plomb est fréquemment associé à la fraction colloïdale, qui peut être organique (composés humiques) ou inorganique (oxyhydroxydes métalliques). Cette fraction aura tendance à favoriser la mobilité du plomb et à modifier sa biodisponibilité (Cecchi 2008).

Cette mobilité du plomb va également être influencée par ses différentes formes rencontrées dans les diverses conditions environnementales. En effet, le plomb sous forme d'oxyde (PbO) ou de carbonate (PbCO_3) sera plus soluble que le plomb sous forme de sulfure (PbS) ou de phosphate (PbPO_4H).

2.4.2. L'arsenic (As)

L'arsenic est un élément chimique de type métalloïde, de numéro atomique 33. Les valeurs moyennes et médianes de concentrations en arsenic total en France sont respectivement de 12 et 18 mg.kg^{-1} ; cet élément est dit ubiquiste (*Baize 1997 ; Laperche et al., 2003*). Il est considéré comme un ultra-oligoélément puisqu'il est nécessaire pour l'organisme mais seulement à des doses extrêmement faibles : 10 à 20 $\mu\text{g.jour}^{-1}$ sous forme organique (largement couvert par l'alimentation) (*Laperche et al., 2003*). Il serait par exemple impliqué dans le métabolisme de la méthionine, et apparaît essentiel à la croissance et à la reproduction chez le rongeur (Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, 2001). Etant de type métalloïde, l'arsenic aura des propriétés chimiques semblables à celles des éléments métalliques mais aussi à des éléments non métalliques. Il se présente sous de 3 états différents d'oxydation : As(O), As(III) et As(V) ; ce dernier étant plus stable en conditions oxydantes, alors que l'As(III) domine dans des conditions environnementales réduites. L'arsenic est un élément phytotoxique et cette phytotoxicité dépend de sa spéciation. En effet, elle sera plus importante pour l'ion arsénite que pour l'ion arséniate.

Dans la nature, diverses formes d'arsenic peuvent être rencontrées : des arsénates, des sulfures, des sulfosels, des arsénites, des arséniures ou encore des oxydes. L'affinité de l'arsenic avec les sulfures le classe parmi les éléments chalcophiles. Il formera des phases porteuses sulfurées ou sulfatées rencontrées couramment sur les sites miniers : la beudantite ($\text{PbFe}_3(\text{AsO}_4)(\text{SO}_4)(\text{OH})_6$) mais aussi l'arsénopyrite (FeAsS) (*Laperche et al., 2003 ; Lengke et al. 2009*). La scorodite ($\text{FeAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) peut également être rencontrée sur ce type de site.

L'arsenic possède une forme libre anionique. Les oxyhydroxydes métalliques, et en particulier les oxydes de fer, apparaîtront donc comme de bons adsorbants d'arsenic. Il s'avère que ce piégeage est assez bien décrit par le mécanisme de complexation de surface particulièrement pour l'As(V) par rapport à As(III) (*Cui et al. 2015 ; Taleb et al. 2015 ; McCann et al., 2018*).

Le potentiel redox est l'un des paramètres clés dans la mobilité de l'arsenic. En effet, les oxydes sur lesquels est piégé l'arsenic seront déstabilisés dans des conditions réductrices. (Figure 1.9). L'augmentation de pH impactera la mobilité de l'As en diminuant la charge positive de surface des adsorbants (*Beesley et al., 2014*) ou encore en augmentant la quantité d'espèces chargées négativement ce qui favorisera la compétition (*Beesley et al., 2014*). D'autre part, il semble que

l'augmentation de pH favorise la déstabilisation de certaines de ses phases porteuses telles que la scorodite (Hu. 2012 ; Pascaud. 2015).

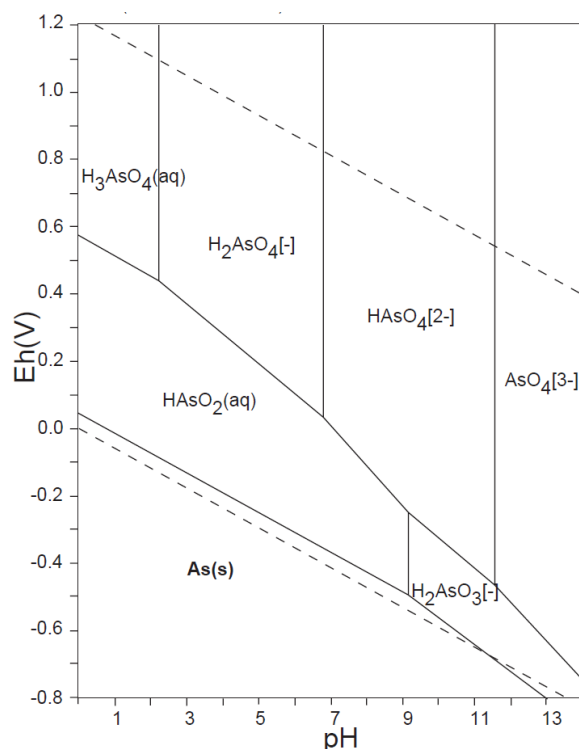


Figure 1.9 : Diagramme de Pourbaix ou diagramme potentiel-pH (ou Eh-pH) de l'arsenic du système As-O-H. $\Sigma \text{As} = 10^{-10} \text{ mol.kg}^{-1}$, 298.15 K, 105 Pa (d'après Takeno, 2005). Indique les domaines d'existence ou de prédominance des différentes formes (ions, complexe, précipité, métal) d'un élément.

La spéciation de l'arsenic va grandement influencer son absorption par les végétaux. En effet, l'absorption des ions arsénates est trois fois plus forte que celle des ions arsénites (Mitchell et Baar, 1995 ; Pitten et al., 1999 ; INERIS, 2010). De plus, l'arséniate peut entrer en compétition avec les ions phosphate et sulfate, dont le comportement chimique est très proche de l'arséniate, sur les mêmes sites de sorption non seulement dans les sols, mais aussi sur les parois et les membranes plasmiques des cellules (Rahman et al., 2008). Le phosphore a des effets à la fois synergiques et antagonistes sur l'absorption de l'As par les plantes selon les caractéristiques du sol et des plantes (Piracha et al., 2016). Lorsqu'un milieu est déficient en phosphate et en présence d'arsenic(V), certaines plantes (maïs, tomates, melons) sont capables de réduire l'arsenic(V) et de le méthyler en acide monométhylarsénique $\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$ (MMA) et en acide diméthylarsinique $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$ (DMA) (INERIS 2010).

Ainsi, les végétaux peuvent modifier la spéciation des métaux ou métalloïdes, ce qui peut être recherché dans un procédé de phytomanagement.

3. Phytomanagement

3.1.Définitions et approches

Suite à la découverte de plantes hyperaccumulatrices capables d'extraire et d'accumuler une forte quantité de métaux présents dans le sol, le terme phytoremédiation a été introduit en 1983 (*Chaney et al., 1997 ; Raskin et al., 1997*). La phytoremédiation désigne l'utilisation de végétaux et de microorganismes associés pour réduire les effets toxiques de contaminants présents dans l'environnement (*Kidd et al., 2015*) par accumulation dans la biomasse produite. Cependant, la phytoremédiation s'est heurtée à de nombreuses limites dont notamment la gestion de la biomasse végétale contaminée. Ce qui a nécessité de faire évoluer cette technique afin de favoriser la stabilisation des polluants dans le sol, contrôler leur transfert vers les parties aériennes des végétaux, promouvoir les fonctions écosystémiques et enfin valoriser la biomasse produite. L'ensemble de ces stratégies est défini sous le terme « phytomanagement ». Le phytomanagement est donc la production à long terme d'une biomasse végétale rentable sur un sol dégradé avec ou sans apport d'amendements diminuant au final l'impact des pollutions et favorisant la restauration des services écosystémiques (*Burges et al., 2018 ; Mench 2017*) (Figure 1.10).

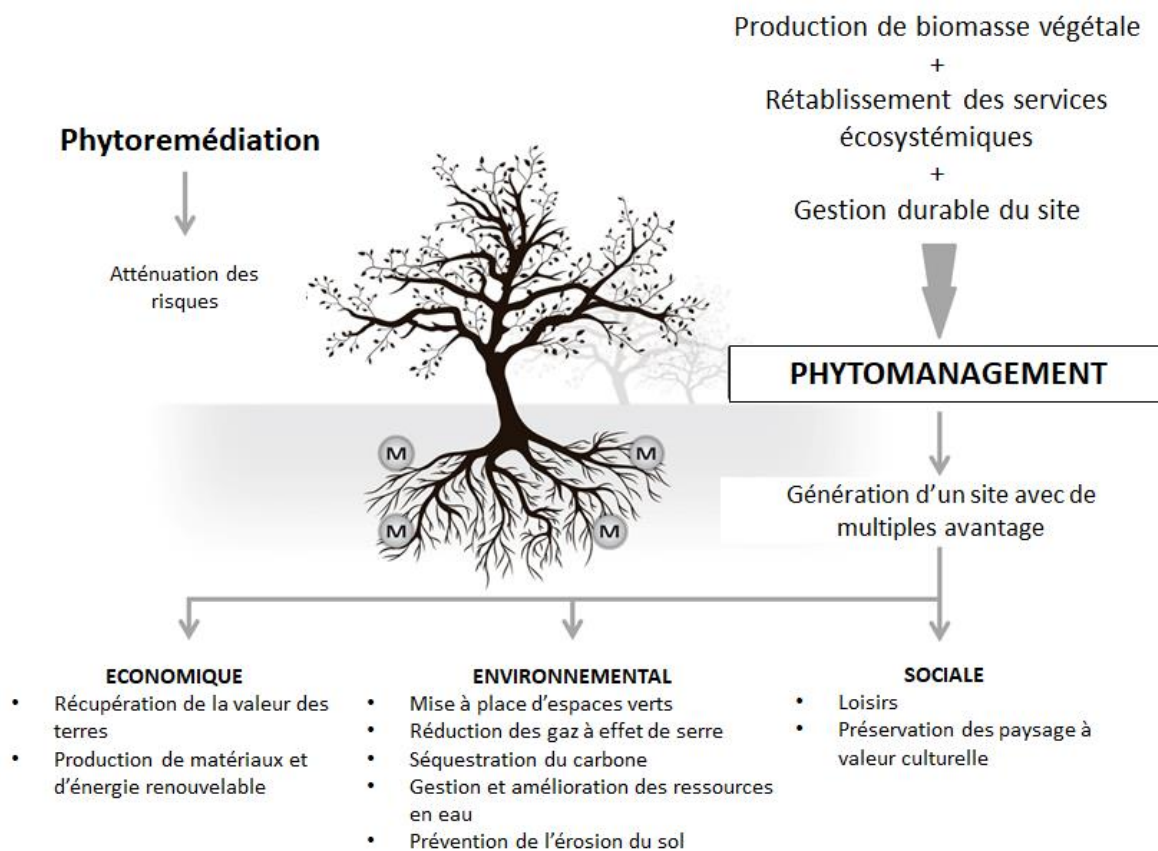


Figure 1.10 : Représentation schématique de l'approche de phytomanagement adapté de Burges *et al.*, 2018.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Le phytomanagement semble être bien accepté par le public, étant considéré comme une solution écologique et alternative pour résoudre les problèmes liés à la pollution métallique des sols. Ce procédé possède un grand potentiel, puisque plus de 400 espèces végétales ont été identifiées comme des phytoremédiateurs potentiels (Ali *et al.*, 2013). Le phytomanagement, par la mise en place d'un couvert végétal, permettra de limiter les transferts verticaux ou horizontaux des métaux vers les différents compartiments de l'environnement en limitant la lixiviation des métaux, le transport de particules par voie aérienne ainsi que l'érosion du sol (Alvarenga *et al.*, 2009 ; ADEME 2013 ; Lee *et al.*, 2014). Ceci aboutira à la diminution des risques pour la santé humaine et l'environnement et contribuera à la valorisation des paysages par la mise en place d'un couvert végétal. Enfin, le phytomanagement s'avère d'un point de vue économique moins coûteux que les solutions d'assainissement physiques ou chimiques (Ali *et al.*, 2013).

Le phytomanagement peut s'appliquer à une grande variété de contaminants allant des hydrocarbures jusqu'aux métaux en passant par les radionucléides (Vishnoi *et Srivastava* 2008) sur des sites de grande échelle où d'autres procédés de traitement physiques peuvent ne pas être aussi efficaces et rentables. En effet, le comportement des plantes face aux métaux et métalloïdes varie considérablement entre les espèces mais aussi entre variétés au sein d'une même espèce, en fonction de leur génétique, et de leurs caractéristiques physiologiques et anatomiques, laissant un large choix d'utilisations possibles lors de processus de phytomanagement.

Les plantes peuvent être utilisées, en fonction de leurs caractéristiques, dans 5 techniques de phytomanagement : la phytoextraction, la phytofiltration, la phytostabilisation, la phytovolatilisation et la phytodégradation (Wiszniewska., 2015 ; Sarwar *et al.*, 2017) (Tableau 1.3).

Tableau 1.3 : Techniques possibles pour un système de phytoremédiation

Mode d'action	Description
Phytoextraction	Prélèvement des contaminants du sol et accumulation de ceux-ci dans les tissus récoltables de la plante
Phytodégradation	Prélèvement et dégradation des contaminants du sol par le métabolisme interne de la plante ou par les exsudats racinaires et microbiens
Phytovolatilisation	Prélèvement et transformation des contaminants du sol en substances volatiles, puis libération par les stomates dans l'atmosphère
Phytostabilisation	Absorption et adsorption dans la rhizosphère en vue de diminuer la mobilité des polluants (<i>développée ci-dessous</i>)
Rhizofiltration	Absorption ou adsorption de contaminants présents dans l'eau

La phytostabilisation, ou phytoimmobilisation, est l'utilisation des plantes pour stabiliser les sols et les contaminants dans les sols rhizosphériques et dans les racines (séquestration)

sans translocation dans les parties aériennes (*Singh 2012*). Dans le cas des sites très fortement pollués, le phytomanagement par phytostabilisation semble être la technique la plus appropriée, car en limitant la translocation dans les parties aériennes, la biomasse produite pourra donc être exploitée sans précaution particulière. Il est toutefois important de noter, que ce processus est efficace que si les racines des végétaux sont en mesure d'atteindre les polluants et d'agir sur eux (*Chevrier 2013*). Le choix des espèces végétales se portera alors sur des espèces possédant une faible translocation des polluants et un vaste système racinaire. Dans un processus de phytostabilisation, le couvert végétal va contribuer, en fonction des espèces utilisées et par la décomposition des parties foliaires retournées au sol, à l'enrichissement en éléments nutritifs et à l'activité biologique du sol traité (*Mertens et al., 2007 ; Vamerali et al., 2010*) ainsi qu'au développement de nouveaux profils organiques et donc participera au début d'une pédogénèse.

Cependant pour cette utilisation spécifique à des environnements pollués, il est essentiel de collecter le plus grand nombre d'informations possibles sur le sol à remédier. En effet, les caractéristiques d'un technosol minier sont particulières du fait de son niveau de toxicité élevée et de sa faible valeur agronomique, caractéristiques qui ne se prêtent pas à la croissance des végétaux. Un des moyens de palier à ces difficultés est d'apporter des amendements au sol (*Vangronsveld et al., 2009*). Si une telle végétalisation est effectuée en combinaison d'amendements, on considère qu'il s'agit d'une phytostabilisation aidée (*Alvarenga et al., 2009*). L'apport d'amendement au sol permettra d'améliorer la qualité agronomique du sol mais aussi de diminuer le pool labile des contaminants et donc de limiter l'exposition et les doses reçues par les végétaux et les organismes du sol (Figure 1.11). Cependant, l'application d'amendements peut avoir des effets indésirables tels que la destruction de la structure du technosol ou l'immobilisation des éléments essentiels et augmenter en conséquence le coût du processus de phytostabilisation. Il faut noter qu'en plus de l'association plante/amendement, la combinaison d'espèces végétales différentes joue un rôle essentiel dans le processus de phytostabilisation.

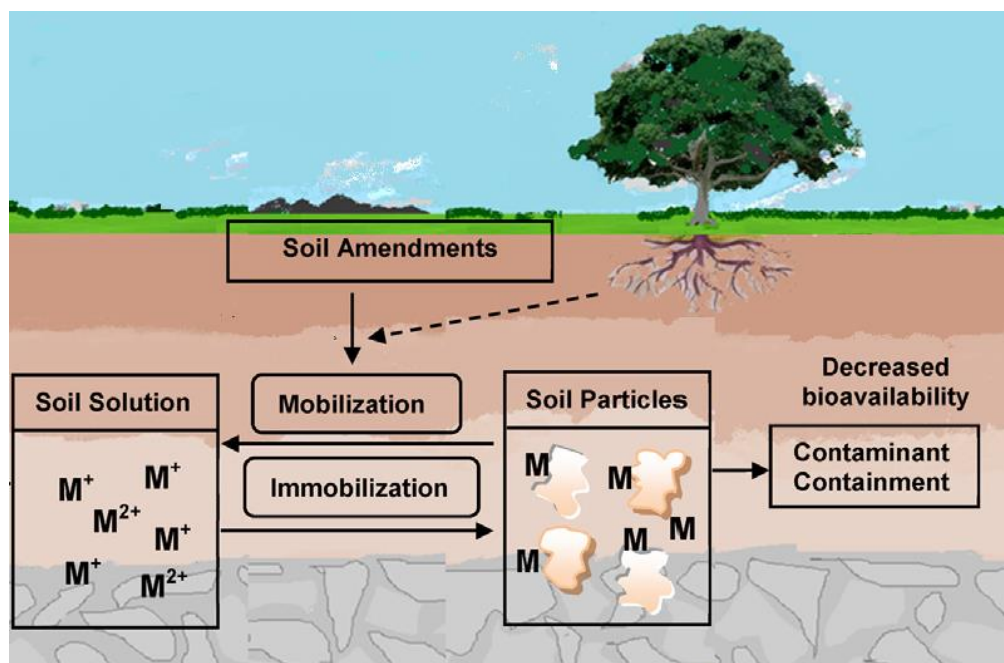


Figure 1.11 : Diagramme schématique illustrant les effets de la phytostabilisation assistée sur le sol et ses contaminants par l'action combinée des amendements et des végétaux (source : Bolan *et al.*, 2014).

Les processus de phytomanagement se trouvent clairement à l'interface d'une multitude de disciplines scientifiques et nécessitent des connaissances de base en chimie des sols, en biologie végétale, en écologie et en microbiologie des sols ainsi qu'en génie environnemental (Figure 1.12).

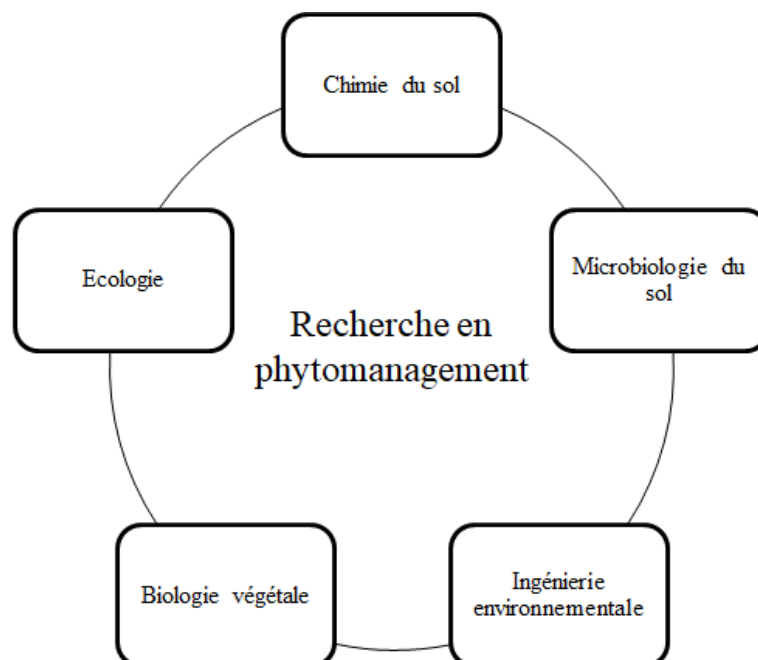


Figure 1.12 : Nature interdisciplinaire des recherches menées en phytomanagement (adapté de Ali *et al.*, 2013).

Considérant la complexité des différents paramètres physico-chimiques d'un sol lors de l'application d'un processus de phytomanagement, comme le pH du sol, la matière organique, les

exsudats racinaires, la biomasse microbienne, et les cations concurrentiels influant sur la disponibilité des métaux et métalloïdes dans les sols, il est nécessaire de procéder à un large éventail d'études en amont, que ce soit en mésocosme ou sur le terrain afin d'optimiser le processus utilisé.

3.2. Les amendements pour la remédiation des sols

3.2.1. Généralités

Dans le cas d'un procédé de phytostabilisation aidée, un apport d'amendements est réalisé. Un amendement est un matériau apporté à un sol pour améliorer sa fertilité. Dans notre cas il permettra également de stabiliser les éléments métalliques et métalloïdes.

Ainsi l'apport d'amendement permettra d'améliorer la qualité agronomique du sol facilitant l'établissement des plantes par l'amélioration de la nature physique du milieu d'enracinement puis de croissance. Cela passe par une amélioration de l'aération du sol, de sa capacité de rétention d'eau, ou encore par un apport de nutriments essentiels aux végétaux. Il servira également à immobiliser chimiquement les métaux et métalloïdes *in situ*, par des réactions d'adsorption, de précipitation et de complexation, réduisant leur mobilité et donc la phytotoxicité du sol (Alvarenga et al., 2008 ; Bolan et al., 2014). Par une telle approche, un effet durable est requis, le temps de l'obtention d'un nouvel équilibre écologique. Les amendements doivent être : (1) peu coûteux, (2) facilement disponibles, (3) faciles à appliquer avec de faibles risques associés, (4) sans effets perturbateurs ou indésirables, notamment sur la structure et la fertilité du sol, (5) compatibles avec les végétaux utilisées pour la revégétalisation, (6) adaptées aux différents contaminants et enfin (7) conformes aux réglementations (Berti et Cunningham 2000).

De nombreux matériaux organiques et inorganiques ont été utilisés pour réduire la solubilité et la biodisponibilité des métaux et métalloïdes dans les sols contaminés. Ces différents amendements vont de la chaux (Bolan et al., 2003 ; Geebelen et al., 2003 ; Alvarenga et al., 2008), à la matière organique (Brown et al., 2003 ; Park et al., 2011), en passant par les composés phosphatés (Basta et McGowen. 2004 ; Sneddon et al., 2006), la zéolite (Oste et al., 2002), les alumino-silicates tels que la bentonite ou les cendres volantes (Geebelen et al., 2003 ; González-Núñez et al., 2011), ou encore les matériaux à base de fer tels que le fer zéro-valent, les oxydes de fer (Lombi et al., 2002 ; Hartley et al., 2004 ; Kumpiene et al., 2006 ; Komárek et al., 2013). Les propriétés physiques et chimiques de ces amendements à l'égard des métaux et métalloïdes ont été discutées dans plusieurs revues (Adriano et al., 2004 ; Kumpiene et al., 2008 ; Kumpiene. 2010 ; Bolan et al., 2014) (Tableau 1.4). Les amendements réduisent la disponibilité et la mobilité

Chapitre I : Synthèse bibliographique

potentielle des éléments métalliques et métalloïdes par un ou plusieurs processus tels que la sorption, la (co)précipitation, l'échange d'ions, et la complexation (*Berti et Cunningham. 2000 ; Mench et al., 2006*). Le rapport coût-efficacité des amendements constitue un paramètre d'une importance particulière puisque la quantité d'amendements requise pour le traitement du sol est généralement très élevée. Il sera donc nécessaire d'utiliser des amendements peu coûteux et facilement disponibles en grandes quantités (*Kumpiene et al., 2008 ; Burgos et al., 2010*).

Tableau 1.4 : Différents types d'amendements utilisés dans un procédé de phytostabilisation pour leur potentiel dans l'immobilisation des métaux et métalloïdes dans le sol (adapté de Bolan et al., 2014).

Amendements	Métaux - métalloïdes	Observations	Références
Composés phosphatés			
KH ₂ PO ₄	Cd, Pb	Réduction de la mobilité et de l'absorption par les plantes.	Chlopecka <i>et al.</i> , 1997
Apatite, Zéolite, Fe-oxyde	Pb, Zn, Cd	Teneur réduite en Pb mais pas en Zn et Cd chez les vers de terre.	Pearson <i>et al.</i> , 2000
Phosphate	As	L'augmentation de l'approvisionnement en phosphate a réduit l'absorption de l'arsenic.	Wang <i>et al.</i> , 2002
Phosphate	Pb, As	Augmentation de l'absorption de l'arsenic du sol par les plantes. Aucun effet sur la phyto-disponibilité du Pb dans le sol.	Creger <i>et al.</i> , 1994
H ₃ PO ₄ , Ca(H ₂ PO ₄), roche phosphatée	Pb, Zn, Cu	Augmentation de la fraction résiduelle de Pb, Zn et Cu, et réduction de la translocation du métal (loid) de la racine à la pousse de la plante.	Cao <i>et al.</i> , 2003
roche phosphaté, phosphate de diammonium	Pb, Zn, Cd	Réduction de l'élution des métaux.	Basta <i>et al.</i> , 2004
farine d'os (apatite)	Pb, Zn	Réduction de la concentration de métal(loid)s dans le lixiviat et disponibilité de métal (loid) dans les sols.	Hodson <i>et al.</i> , 2000
Hydroxyapatite, roche phosphatée, triple superphosphate, phosphate de diammonium	Pb, Zn, Cd	Réduction de l'absorption des métaux par les plantes.	Chen <i>et al.</i> , 2007
Matériaux chaulant			
Chaux	Pb, Cd	Diminution de l'absorption de Cd, mais peu d'influence sur l'absorption de Pb par les radis.	Han <i>et al.</i> , 1996
Boue rouge, zéolite naturelle, chaux	Pb, Zn, Cd	Changements dans les communautés microbiennes.	Garau <i>et al.</i> , 2007

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Amendements	Métaux - métalloïdes	Observations	Références
Zéolite, compost, hydroxyde de calcium	Pb, Zn, Cd	Augmentation de la fraction résiduelle des métaux dans les sols et diminution de l'absorption des métaux par le lupin blanc.	Castaldi <i>et al.</i> , 2005
Chaux, boue rouge	Pb, Zn, Cd, Ni, Cu	Concentrations réduites de métal(loïdes) dans l'herbe.	Gray <i>et al.</i> , 2006
Chaux	As	Augmentation de l'immobilisation de l'arsenic par la formation de précipités de Ca-As.	Moon <i>et al.</i> , 2004
Matière organique			
Compost	Pb, Zn, Cd, Cu	Le lessivage du Zn et du Cd a diminué, mais celui du Cu et du Pb a augmenté.	Ruttens <i>et al.</i> , 2006
Cendres volantes de charbon, tourbe	Pb, Cu	Réduction de la lixiviation des métaux dans les lysimètres de terrain.	Kumpiene <i>et al.</i> , 2007
Biosolide, cendre de bois, K ₂ SO ₄	Pb, Zn, Cd	Phytotoxicité réduite du Pb, du Zn et du Cd et biodisponibilité réduite du Pb.	Devolder <i>et al.</i> , 2003
Biochars de fumier de poulet et de déchets verts	Pb, Cd, Cu	Immobilisation due au cloisonnement des métaux de la phase échangeable à la fraction organique liée.	Park <i>et al.</i> , 2011
Biochar de bois de chêne	Pb	Pb adsorbé en augmentant le pH du sol.	Ahmad <i>et al.</i> , 2012
Biochar de bois tendre et de bois de pin	As, Pb	Diminution de la concentration de Pb mais aucun effet sur l'As dans l'eau interstitielle	Lebrun <i>et al.</i> , 2018b
Oxydes de métaux			
Oxyde de manganèse	Pb	Pb biodisponible réduit.	Hettiarachchi <i>et al.</i> , 2000
Déchets riches en fer (Fe(hydr)oxydes)	Pb, Zn, Cd, Ni, Cu	Cd, Cu, Zn et Pb échangeables réduits.	Contin <i>et al.</i> , 2007
Oxyde de manganèse	Pb, Cd	Fraction échangeable réduite de Cd et Pb, et absorption de métal(lويد)s par le chou chinois.	Cheng <i>et al.</i> , 2002
Goethite, grenaille de fer, sulfate de fer (II) et (III),	As, Cu, Zn	Teneur réduite en arsenic des pousses de plantes	Hartley <i>et al.</i> , 2008
Sous-produit de déchets de fer	Cd, Pb	Réduction de l'absorption de Cd et de Pb par le maïs et l'orge	Chlopecka <i>et al.</i> , 1996
Sulfate de fer, biochar de chêne vert et compost de déchets de moulin à olives	As, Cu	Diminution de la fraction soluble et extractible de As et Cu	Fresno <i>et al.</i> , 2018
Oxyde de manganèse, d'aluminium et de fer	As, Sb	Diminution de la biodisponibilité et de l'absorption par les plantes de As et Sb	Bagherifam <i>et al.</i> , 2014

Au vu du large choix d'amendements disponibles pour mettre en place une phytostabilisation assistée, il est essentiel de réaliser une sélection en fonction des caractéristiques du technosol à traiter, tant du point de vue des contaminants que du point de vue agronomique.

3.2.2. Les amendements utilisés au cours de la présente thèse

La diversité d'amendements organiques et inorganiques envisageables permet de répondre au mieux aux besoins des plantes en améliorant la qualité agronomique et en diminuant la toxicité des sols. Au cours de la présente thèse, nous avons choisi de tester le biochar, dont les caractéristiques semblent prometteuses en termes de réduction de la toxicité du technosol et d'amélioration de ses qualités agronomiques. Cet amendement doit être combiné à d'autres matériaux afin d'optimiser les processus de phytostabilisation.

3.2.2.1. Le biochar

Le biochar est le produit de la dégradation thermique, en l'absence d'air (pyrolyse), de matières organiques de natures variables (biomasses ligneuses, de résidus végétaux mais également de déchets animaux ou urbains) (*Oliveira et al., 2017*). La dégradation thermique est réalisée via une unité de combustion composée d'un pyrolyseur, d'un condenseur de gaz, d'un refroidisseur et d'un broyeur (Figure 1.13). Lors de ce procédé, trois éléments sont obtenus : le biochar, du gaz et des biohuiles.

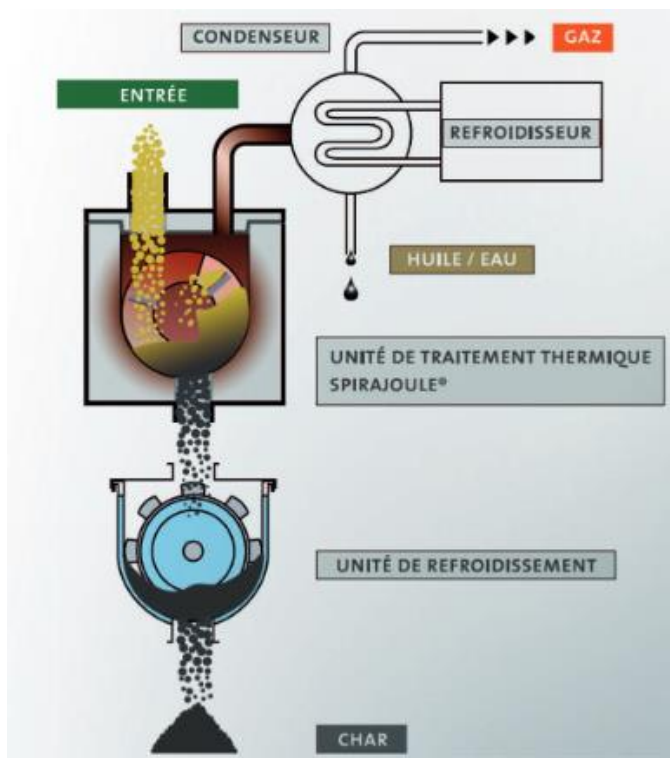


Figure 1.13 : Schéma du procédé de fabrication du biochar (source biogreen®)

Le biochar obtenu correspond à une poudre dont la granulométrie est distribuée entre quelques micromètres et quelques millimètres. Il se caractérise par une forte microporosité, une faible densité (0,2 à 0,5 g.cm⁻³) (Gray *et al.*, 2014), un pH généralement alcalin compris entre 8 et 12, un taux de carbone très élevé allant de 20 % à plus de 90 % (Ahmad *et al.*, 2014), ainsi qu'une phase minérale supérieure aux charbons activés (Rees 2014). D'après Atkinson *et al.* (2010) et Chen et Yuan (2010), les biochars peuvent également contenir des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

Les applications potentielles du biochar sont nombreuses et portent notamment dans les domaines de la gestion des déchets, l'amélioration de la fertilité des sols et la sorption de contaminants organiques et inorganiques. Il pourrait, par sa forme plus réfractaire que les amendements organiques « traditionnels », participer à l'atténuation des changements climatiques par la séquestration du carbone (C) (Lehmann *et al.*, 2011 ; Rees 2014 ; Singh *et al.*, 2015 ; Kuppusamy *et al.*, 2016). Ses applications concernent aussi la production de bioénergie et la réduction des émissions de divers gaz (oxyde nitreux (NO), méthane (CH₄), et dioxyde de carbone (CO₂)). Ces différentes applications ont fait l'objet de nombreuses études (Atkinson *et al.*, 2010 ; Choppala *et al.*, 2012 ; Jones *et al.*, 2012 ; Cayuela *et al.*, 2014 ; Van Zwieten *et al.*, 2014 ; Jeffery *et al.*, 2015).

Caractéristiques physiques et chimiques

Les caractéristiques des biochars dépendent de plusieurs facteurs : (1) le type de biomasse utilisée (résidus de cultures, biomasse ligneuse, litière animale ou déchets solides), (2) les procédés de pyrolyse (lents à intermédiaires), (3) les températures (200 à 900°C) et (4) la vitesse de chauffage (2,5 à 20°C min⁻¹) (Atkinson *et al.*, 2010 ; Zhao *et al.*, 2013 ; Ahmad *et al.*, 2014).

La durée de pyrolyse, à température constante, est un paramètre important : les pyrolyses lentes (plusieurs heures) permettant une carbonisation plus complète que les pyrolyses rapides (quelques minutes). C'est durant cette phase de pyrolyse que la structure de la matière première utilisée va être réarrangée sous forme de chaînes aliphatiques et de structures aromatiques, lui permettant de présenter une grande diversité de groupes fonctionnels en surface, comme des groupes carboxyliques, phénoliques, hydroxyles, carbonyles, ainsi que des quinones et des lactones qui vont apparaître lors du "vieillissement" par oxydation progressive du biochar dans les sols (Yao *et al.*, 2010 ; Rees 2014). Certains de ces groupes fonctionnels porteurs des liaisons N—H, liaisons aliphatiques C—H, doubles liaisons C=C, des groupements méthyl —CH₃, ainsi que des liaisons C—O ont pu être mis en évidence par des analyses en spectroscopie infrarouge à transformée de

Fourier (IFTR) (Steinbeiss *et al.*, 2009 ; Chen *et al.*, 2015). Ils constitueront principalement des composés neutres de faible masse moléculaire (ex : alcools, aldéhydes, cétones, sucres, acides aminés), des composés acides à faible masse moléculaire et des acides humiques (Lin *et al.*, 2012). Ces diverses compositions possibles vont permettre aux biochars de présenter des propriétés hydrophiles, hydrophobes, acides, basiques ou neutres en fonction de la biomasse utilisée et des conditions opératoires de la pyrolyse (Atkinson *et al.*, 2010). De plus, lors de la pyrolyse de biomasse végétale, une partie de la cellulose et de l'hémicellulose peut ne pas être carbonisée (Bruun *et al.*, 2011).

La variété des procédés de pyrolyse ainsi que les biomasses utilisées vont jouer un rôle sur la structure poreuse des biochars qui peuvent développer une surface spécifique plus ou moins élevée de quelques dizaines à plusieurs centaines de $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ (Li *et al.*, 2017). Ainsi, la distribution de taille de pores est variable et peut aller des nanopores ($< 0,9 \text{ nm}$) jusqu'aux macropores ($> 50 \text{ nm}$) (Atkinson *et al.*, 2010 ; Sun *et al.*, 2016). La pyrolyse pourra également faire varier la composition et la quantité de la fraction minérale du biochar (Li *et al.*, 2017).

Il a été démontré que les concentrations totales de K, Ca, Mg et P augmentent avec la température de pyrolyse et ce pour différentes biomasses utilisées : des biosolides (Hossain *et al.*, 2011 ; Chen *et al.*, 2014a), du fumier (Subedi *et al.*, 2016), de déchets de *Conocarpus* (Al-Wabel *et al.*, 2013) ou du bois de chêne (Zhang *et al.*, 2015a). Ceci peut s'expliquer par le fait qu'à des températures plus élevées, le rendement en biochar est plus faible, ce qui l'enrichit en minéraux. La température de pyrolyse peut également affecter la nature de ces phases minérales : une volatilisation de certains éléments comme le potassium lors de cette étape et un changement de cristallographie pour des minéraux comme la silice ont été observés (Rees 2014). Généralement, le biochar produit à 200°C , présente une solubilité dans l'eau du K, Ca, Mg et P plus importante que le biochar produit à des températures supérieures. Ceci pourrait être expliqué par une cristallisation accrue de certains minéraux, comme en témoigne la formation de whitlockite $((\text{Ca},\text{Mg})_3(\text{PO}_4)_2)$ ou par l'incorporation de silicium dans la structure du biochar à une température de pyrolyse de 500°C , le rendant moins soluble (Shinogi 2004 ; Cao *et al.*, 2009).

De même que la surface et la porosité, le pH du biochar varie selon la température de pyrolyse et la biomasse utilisée (Li *et al.*, 2017). La plupart des biochars sont basiques et présentent des pH élevés dans la gamme 8-12 (Ahmad *et al.* 2014). Des corrélations positives ont été observées entre le pH du biochar et la température de pyrolyse pour les biochars produits à partir de bois de chêne (Nguyen *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2015b), de biosolides (Jin *et al.* 2016), ou de résidus de culture (blé, maïs) (Zhang *et al.*, 2015b). Ce phénomène serait lié à une augmentation des teneurs totales en cations basiques et en carbonates (Yuan *et al.*, 2011). À un pH de 3-7, tous les biochars sont chargés négativement. Cependant, d'après Yuan *et al.*, (2011) par rapport à des biochars produits à partir de

paille de canola, de maïs, de soja et d'arachide à 300°C et 500°C, ceux produits à 700°C étaient moins chargés négativement, ce qui signifie que le pH_{PZC} (point de charge nulle) augmente avec la température de pyrolyse.

Dans la gamme de températures de pyrolyse de 400-700°C, les biochars possèdent également des propriétés oxydantes ou réductrices différentes, qui sont conférées par des groupes transporteurs d'électrons de type quinone (*Klöpfer et al.*, 2014).

Le biochar dans les sols

Les apports de biochars dans les sols sont réalisés pour répondre à des objectifs précis, liés en particulier à la « refertilisation » des sols et au stockage de carbone. A la différence des amendements organiques traditionnels, les biochars peuvent perdurer dans les sols pendant des périodes très longues. En effet, le biochar présente un haut degré de stabilité dans les sols (*Singh et al.*, 2015) même si cela fait l'objet de nombreux débats (*Singh et al.*, 2012 ; *Ventura et al.*, 2014). Cette stabilité a été en partie démontrée par la persistance des sols *Terra Preta* d'Amazonie datant de l'époque pré-colombienne, qui contiennent des teneurs élevées en carbone organique sans caractéristiques hydromorphiques (*Glaser et Birk* 2012). Ces sols ont été constitués par des brûlis contrôlés de biomasses végétales à basses températures et en présence de quantité d'oxygène limitée favorisant ainsi la production de biochar.

Cependant, bien que le biochar soit stable dans le temps, dans les premiers jours suivants son apport dans les sols, une partie de sa fraction organique labile disparaît (*Zimmerman et al.*, 2011 ; *Maestrini et al.*, 2014). Cette fraction labile est principalement constituée des fractions cellulosiques et hémicellulosiques non carbonisées ou bien d'éventuels composés volatiles résiduels (*Bruun et al.*, 2011). La persistance du biochar dans un substrat peut varier en fonction des caractéristiques du sol, telles que sa minéralogie, sa texture, sa teneur naturelle en carbone organique et son activité microbiologique. Des facteurs environnementaux comme des processus d'érosion ou de lessivage de particules à travers le profil de sol peuvent également affecter la présence durable du biochar dans le sol (*Singh et al.*, 2015).

Glaser et al. (2002) ont signalé une augmentation d'environ 18 % de la capacité de rétention en eau de sols amendés avec du biochar. Cette capacité est liée à son hydrophobicité et à sa surface spécifique importante, ainsi qu'à l'amélioration de la structure du sol après son application (*Verheijen et al.*, 2010). D'autres études montrent une amélioration du rendement agronomique, en moyenne de 10 %, dans les sols amendés au biochar, avec cependant de larges variations, incluant des effets négatifs du biochar sur la croissance de certains végétaux (*Liu et al.*, 2013 ; *Crane-Droesch et al.*, 2013).

L'amélioration de la production de biomasse végétale liée à l'ajout de biochar dans un sol pourrait être due à un apport direct de nutriments, à une meilleure rétention des nutriments apportés dans la rhizosphère ou à une augmentation de la disponibilité des nutriments du sol (*Atkinson et al., 2010 ; Pandey et al., 2016*). De plus, les végétaux pourraient voir leur croissance stimulée par l'émission via le biochar de certains composés organiques (*Graber et al., 2010*), en particulier l'éthylène (*Spokas et al., 2010*). Des effets indirects, positifs ou négatifs, sur la résistance des végétaux aux stress environnementaux et aux pathogènes en présence de biochar ont également été mis en évidence (*Viger et al., 2014*). Le biochar peut également changer la composition des communautés biologiques des sols, aux niveaux bactériens et/ou fongiques et même améliorer l'activité de la faune du sol (*Lehmann et al., 2011*). Cependant, le changement induit par le biochar sur les communautés bactériennes telluriques agirait sur le carbone natif du sol en accélérant sa décomposition ce qui peut parfois être un problème (*Awad et al., 2013*).

En plus d'améliorer la fertilité des sols, le biochar pourrait également, de par ses caractéristiques physico-chimiques, (Figure 1.14) contribuer à diminuer les impacts des pollutions métalliques (*Beesley et al., 2011 ; Rees, 2014*).

Toutefois, de par ses caractéristiques variables en fonction de la biomasse utilisée et des conditions de pyrolyses, des effets contrastés ont été notés, allant de l'immobilisation à la mobilisation pour certains types de polluants tels que le cuivre, le plomb ou le zinc (*Lima et al., 2009 ; Beesley et al., 2010 ; Namgay et al., 2010 ; Beesley et Dickinson, 2011 ; Beesley et Marmiroli, 2011 ; Fellet et al., 2011 ; Gomez-Eyles et al., 2011 ; Park et al., 2011 ; Khan et al., 2013 ; Brennan et al., 2014 ; Yin et al., 2016 ; Lebrun et al., 2017, 2018a,b,c*). Le même type d'observations a été fait pour l'arsenic (*Beesley et al., 2014 ; Lebrun et al., 2017, 2018a,b,c*), ainsi que pour l'antimoine (*Ahmad et al. 2014 ; Rees, 2014*). La taille des pores du biochar est également un facteur important pour la sorption des métaux ou des métalloïdes ; en effet des pores de petites tailles ne peuvent pas piéger des composés de grande taille, indépendamment de leurs charges ou de leur polarité (*Ahmedna et al., 2004*).

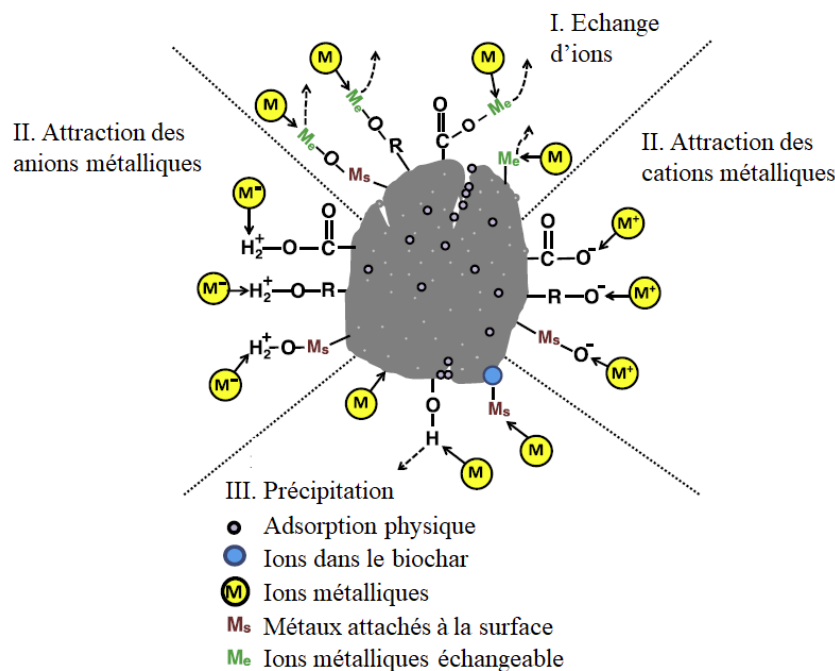


Figure 1.14 : Mécanismes proposés (adaptés de Ahmad *et al.*, (2014)) des interactions du biochar avec les contaminants inorganiques (ions métalliques). Les cercles sur les particules de biochar montrent une adsorption physique. I - échange d'ions entre le métal cible et le métal échangeable dans le biochar, II - attraction électrostatique du métal anionique, III - précipitation du métal cible, et IV - attraction électrostatique du métal cationique.

Divers biochars ont été testés pour leur capacité à absorber le Pb à partir de solutions aqueuses (Cao *et al.*, 2009 ; Ding *et al.*, 2014). Les mécanismes régissant la sorption du Pb par les biochars de fumier et de paille de riz ont été rapportés par Xu *et al.* (2014). En séparant les fractions organiques et inorganiques de ces biochars, ils ont montré que la capacité de sorption du Pb de la fraction organique était seulement d'environ 1 mg.g^{-1} , alors qu'elle était supérieure à 300 mg.g^{-1} pour la fraction inorganique. Ils ont suggéré que l'échange de cations et la précipitation de Pb étaient les mécanismes dominants tandis que la complexation de Pb avec les groupes fonctionnels n'avait qu'une contribution limitée.

Concernant l'arsenic, il a été suggéré que la précipitation est un mécanisme mineur lors de son interaction avec le biochar de pin. Ainsi, les analyses par diffraction des rayons X (XRD) de ce type de biochar avant et après la sorption d'As(V) n'ont montré aucun nouveau pic, suggérant l'absence de formation de nouveaux minéraux au sein du biochar (Wang *et al.*, 2015a).

En revanche, la complexation et les interactions électrostatiques semblent être des mécanismes importants pour la sorption de l'arsenic. Samsuri *et al.* (2013) ont en effet montré que pour certains biochars, l'augmentation des rapports molaires H/C et O/C pouvait contrebalancer une surface spécifique faible et permettre une sorption efficace de l'As. Ceci suggère que la complexation avec les groupes fonctionnels comprenant des hydroxyles, carboxyles et ester C-O des alcools contrôle la sorption de l'As par le biochar.

En plus de la complexation, les interactions électrostatiques représentent un autre mécanisme important de sorption d'As(V) sur les biochars. Wang *et al.* (2015b) ont utilisé du biochar de pin produit à 600°C ($\text{pH}_{\text{ZPC}} > 7$) pour adsorber de l'As(V) à pH 7. En effet, à ce pH, l'As(V) existe principalement sous forme de HAsO_4^{2-} tandis que la surface du biochar est chargée positivement, et les oxyanions As(V) interagissent avec les groupes fonctionnels chargés positivement par attraction électrostatique. Le pH_{ZPC} et le pH de la solution vont donc faire varier la capacité du biochar à créer des interactions électrostatiques avec l'arsenic.

3.2.2.2. Le compost

Tout comme le biochar, le compost est composé essentiellement de matière organique. C'est le produit de la dégradation microbienne des déchets organiques. Il est composé de différentes fractions :

- des résidus de plantes et de racines en voie de décomposition (matière organique particulaire),
- de micro-organismes (agent de décomposition),
- de sous-produits de la biodégradation microbienne de la matière organique (fraction soluble et polysaccharides, etc...),
- d'acides fulviques et humiques, molécules organiques issues de la biodégradation des végétaux et eux-mêmes peu biodégradables,
- de composés inorganiques comme le phosphate.

Le compost va jouer un rôle essentiel dans le maintien de la qualité d'un sol, en particulier au niveau de la rétention en eau et de la restitution d'éléments nutritifs aux plantes (azote, phosphore, calcium, magnésium...). De plus, le compost, de par sa composition (fraction humique), représente un réservoir important dans le cycle du carbone.

L'une des fonctions principales de la matière organique contenue dans le compost est de stabiliser les agrégats, en participant à la formation de pores essentiels au transport de l'eau et de l'air dans les sols. Lorsqu'il est incorporé à un sol, la biomasse microbienne ou les polysaccharides qui le composent vont être les principaux acteurs de la stabilité des agrégats et donc indirectement de la structure du sol permettant de limiter l'érosion et la compaction. La matière organique apportée par les composts va également fournir une grande diversité d'habitats et une source d'énergie pour la faune (lombrics, acariens, nématodes...) et la microflore (champignons, algues, microorganismes...) du sol. La plupart de ces organismes décomposent la matière organique, maintiennent les propriétés physiques du sol et facilitent, dans certains cas, l'accès des végétaux aux nutriments.

D'une façon générale, les rôles joués dans le sol par le compost sont dus à leur caractère à la fois hydrophile et hydrophobe. De plus, la présence de nombreux groupements fonctionnels réactifs leur confère une CEC (capacité d'échange cationique) très importante et des charges de surface variables avec le pH. Le compost agit dans les sols comme source d'éléments nutritifs, tels que (1) K, Na, Mg, Ca etc, indispensables pour les organismes vivants. Il peut aussi apporter des éléments métalliques et métalloïdes, certains comme Zn ou Cu étant des oligo-éléments indispensables, et d'autres, comme Pb ou Cd, toxiques à des concentrations plus ou moins fortes.

L'effet du compost sur la mobilité et la biodisponibilité des métaux et métalloïdes dans les sols dépend du type de sol et des caractéristiques de l'amendement (EC, CEC, pH) et du degré d'humification). Par exemple, des études ont montré que l'apport de compost dans des sols contaminés peut accroître la mobilité de l'arsenic (*Clemente et al., 2010 ; Pardo et al., 2014 ; Bolan et al., 2014*). Le compost peut néanmoins avoir un rôle de biosorbant pour les métaux (*Soares et al., 2016 ; Huang et al., 2016*). Cette capacité d'adsorption du compost a été évaluée par des mesures de cinétiques d'adsorption et d'isothermes d'adsorption (*Paradelo et Barral. 2012 ; Venegas et al., 2015*).

Le compost peut immobiliser les métaux grâce aux substances humiques qu'il contient, à ses micro-organismes et ses composants inorganiques. Les substances humiques, abondantes dans le compost, contiennent un grand nombre de groupes fonctionnels organiques (carboxyle, carbonyle et phénols), qui peuvent lier les ions métalliques par complexation (*Caporale et al., 2013 ; Tsang et al., 2014*). Au niveau de ces substances humiques, les phénomènes de sorption sont contrôlés par des complexes de sphères internes ou externes ou bien par des mécanismes d'échanges ioniques (*Evans 1989 ; Kinniburgh et al., 1996*). Les substances humiques possèdent une capacité à fixer des métaux, qui a été mise en évidence dans de nombreux travaux (*Hatira et al., 1990 ; Lamy. 2006 ; Hattab et al., 2014*) ; cependant seule leur fraction insoluble peut les immobiliser. Différents groupements fonctionnels interviennent sur l'interaction entre les métaux et la matière organique : -COOH (carboxyles), -NH₂ (amines), >C=O (carbonyles), >N-H (imines) et -SH (thiols) (*Alloway 1995*). Huang *et al.*, 2016 ont démontré que les métaux et métalloïdes possèdent une affinité différente en fonction de la diversité des groupements fonctionnels que contient le compost. D'autres composés organiques retrouvés dans le compost peuvent également fixer des métaux, tels que des acides organiques de faible masse moléculaire (acides acétique, oxalique...), des glucides (formation de complexes entre les métaux et les groupements hydroxyles des monosaccharides) ou des protéines. Des corrélations entre le taux de matière organique et leur effet sur l'adsorption du plomb ont été établies dans le cadre de plusieurs travaux impliquant l'utilisation de compost (*Gerritse et al, 1982 ; Tardo et al., 2014*). Ces études ont montré que les concentrations en plomb

trouvées dans les sols étaient étroitement corrélées à la teneur en matière organique ; l'adsorption du plomb augmentant avec la teneur en matière organique.

L'arsenic étant un oxyanion, il possède un comportement différent de celui des métaux en présence de matières organiques. Mench *et al.* (2003) ont observé une augmentation drastique de la lixiviation de l'As à partir d'un sol amendé en compost, et Beesley *et al.* (2014) ont noté une augmentation de la concentration de l'arsenic dans l'eau interstitielle après ajout de compost provenant de résidus de la production d'huile d'olive. L'augmentation de la concentration de l'arsenic dans l'eau interstitielle pourrait être liée à la compétition entre l'arsenic et la matière organique soluble pour les sites de sorption des oxydes de fer (Clemente *et al.*, 2010 ; Hartley *et al.*, 2010). Le compost peut également influencer sur la spéciation de l'As en favorisant la réaction de réduction (chimique ou microbienne) de l'As(V) en As(III), plus toxique et mobile. Des études (Balasoïu *et al.*, 2001) sur neuf sols artificiellement contaminés par l'arséniate de cuivre chromé (ACC) ont révélé que dans ces sols, 92% de l'As total étaient sous forme As(V), alors que dans les sols à forte teneur en matières organiques, la proportion d'As(III) augmentait significativement jusqu'à atteindre un tiers de la totalité.

La présence de phosphore (P) dans certains composts peut également contribuer à l'immobilisation des métaux par production de composés phosphorés inorganiques avec les métaux présents (Kato *et al.*, 2014), mais également à la désorption d'arsenic, le phosphate étant un analogue de l'arséniate.

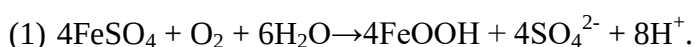
3.2.2.3. Les oxydes métalliques

En agriculture, les oxydes métalliques et plus particulièrement les oxydes de fer, permettent de fixer l'ammoniaque, mais également le phosphate. Le sulfate de fer par exemple (rapidement oxydé en oxy-hydroxyde de FeIII dans le sol) est souvent utilisé en jardinerie, notamment pour lutter contre la chlorose ou bien reverdir une pelouse.

Cependant, au vu des caractéristiques des amendements organiques essentiels à l'amélioration de la qualité agronomique du sol pour le bon développement des végétaux, mais aussi de leurs effets sur la mobilité de l'arsenic, les oxydes métalliques seront essentiellement utilisés pour leurs capacités à diminuer la mobilité de l'arsenic en se reposant sur des procédés d'adsorption/désorption et de co-précipitation.

Les oxydes de métaux, tels que ceux à base de Fe, Al et Mn, jouent un rôle important dans la géochimie des métaux et métalloïdes des sols. Les grandes surfaces actives et la nature amphotère des oxydes les rendent aptes à la sorption et à l'immobilisation d'un large éventail de contaminants

du sol. Les oxydes de fer (hématite, maghémite et magnétite), les oxyhydroxydes de fer (ferrihydrite, goethite, akaganéite, lépidocrocite et ferroxhyte) et les oxydes de Mn (phyllo-manganates et groupe birnessite) sont communs dans les sols. Les oxydes métalliques peuvent fortement lier les métaux et métalloïdes par sorption, co-précipitation, et en formant des complexes de sphère interne, ce qui est le cas de As(III), As(V) et Pb(II) avec les oxy(hydroxy)des ferriques (*Knox et al., 2001*). Les oxydes naturels, les particules d'oxyde synthétisées ainsi que les sous-produits industriels ont été étudiés pour déterminer s'ils peuvent être utilisés dans des procédés de remédiation des sols pollués (*Bolan et al., 2014*). Par exemple, le sulfate de fer (FeSO_4) qui n'est pas directement sous forme d'oxyde peut être utilisé. En effet, son oxydation, très rapide permettra la formation d'oxyhydroxydes de fer selon l'équation suivante :



L'octaèdre $\text{Fe}(\text{O})_6$ ou $\text{Fe}(\text{O})_3(\text{OH})_3$ est l'unité de base des oxydes ou des oxy(hydroxy)des (*Robert 1996*) pouvant être assemblés de différentes manières. En milieu aqueux, la surface des oxydes peut former des complexes avec l'eau.

Les propriétés physiques et chimiques et la diversité des sites de réaction présents sur la surface des oxydes permettent aux réactions chimiques de se produire, assurant ainsi la sorption de diverses espèces chimiques inorganiques et organiques de la solution aqueuse. En général, les mécanismes d'adsorption peuvent être décrits comme (i) l'adsorption spécifique (ou chimique) et (ii) l'adsorption non spécifique (ou physique) (*Komárek et al., 2013*). Les mécanismes d'adsorption spécifique comprennent les processus de complexation de surface - réactions entre les ions métalliques en solution et les groupes fonctionnels de surface. Ces réactions ont lieu au niveau des groupes -OH sur les surfaces minérales qui sont habituellement chargées négativement (déprotonées) à pH élevé et chargées positivement (protonées) à pH faible (*Komárek et al., 2013*). Ainsi, à faible pH, de nombreux oxydes possèdent une charge superficielle positive ce qui va entraîner l'adsorption d'anions tel que As(V). Cette adsorption atteint un maximum pour un pH compris entre 3 et 5 (*Masue et al., 2007*). Par conséquent, les concentrations en As dans les lixiviats de sols contaminés vont être considérablement réduites par l'ajout de goethite, d'oxydes de fer et de sulfates de Fe(II) et de Fe(III). En revanche, ces derniers, vont favoriser la mobilisation des métaux tels que le Cd et le Pb en acidifiant le milieu (*Hartley et al., 2004*). Afin de remédier à cet inconvénient, les amendements au sulfate de fer sont souvent combinés avec des apports de chaux ou de calcaire.

Par ailleurs, la présence de molécules compétitrices organiques (acides organiques de faible poids moléculaire, acides humiques et fulviques), ou inorganiques (phosphates et sulfates) dans les sols va influencer la sorption de l'arsenic. Les oxydes peuvent également être partiellement

solubilisés par complexation avec des ligands organiques, par protonation (dissolution acide) ou réduction en conditions anoxiques (Komárek *et al.*, 2013).

En plus des réactions de sorption, la coprécipitation des métaux et métalloïdes avec des oxydes de fer est un autre mécanisme important de stabilisation des éléments métalliques et métalloïdes dans les sols amendés (Komárek *et al.*, 2013). Ainsi, il a été démontré que la formation de précipités minéraux Fe(II/III) - As (par exemple $\text{FeAsO}^4\cdot\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeAsO}^4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et $\text{Fe}^3(\text{AsO}_4)^2$), relativement insolubles, influencent l'immobilisation de l'arsenic ainsi que sa biodisponibilité dans les sols (Kumpiene *et al.*, 2008 ; Drahota et Filippi 2009).

Hartley *et al.*, (2004) ont testé divers amendements à base de Fe dans les sols multi-contaminés à l'arsenic et aux métaux provenant de différents sites pour évaluer leur capacité à immobiliser l'As. Ces tests ont été réalisés en colonnes et ont permis de classer l'efficacité des amendements de la façon suivante : sulfate de Fe(III) > sulfate de Fe(II) > Fe(0) > goethite.

3.2.3. Tests d'écotoxicité

Des études préliminaires doivent être réalisées avant d'adopter un procédé de phytoremédiation applicable sur le terrain. Il est en particulier important d'évaluer la phytotoxicité d'un technosol minier en mesurant sa toxicité et sa qualité agronomique.

Pour ce faire, de nombreux tests existent et font l'objet d'une attention croissante. Ces tests d'écotoxicités servent à obtenir des informations sur les effets des contaminants dans le sol et sont proposés en complément des analyses chimiques. Ils utilisent une grande diversité d'organismes allant notamment des végétaux aux microorganismes du sol en passant par la macrofaune du sol.

Les végétaux constituent de très bons indicateurs d'un point de vue écotoxicologique par le fait que leurs parties aériennes et racinaires présentent une importante surface d'échange avec l'environnement. Un des tests de toxicité relativement rapide, utilisé couramment, repose sur le suivi de croissance d'haricots (Ruttens *et al.*, 2006). Ce phytotest permet d'évaluer à la fois la toxicité mais aussi la qualité agronomique du sol. Il consiste à mesurer des paramètres biométriques (indicateur de croissance, biomasse, etc) et physiologiques de la plante utilisée (concentrations en polluants dans les différents organes).

D'autres tests sont basés sur l'utilisation de vers de terre. En effet, ces derniers jouent un rôle essentiel dans les sols et sont très sensibles aux paramètres du sol. Les tests d'évitement se basant sur l'aptitude d'un organisme à éviter une situation de stress, reposent sur cette sensibilité selon la norme ISO 17512-1. Ce test évalue l'influence des polluants sur le comportement d'évitement des vers de terre (*Eisenia fetida* ou *Eisenia andrei*) mis en contact avec un sol pollué ou avec un sol naturel sur une durée de 2 jours. A la fin de l'expérience, la localisation des vers de terre sera notée.

Ainsi, ce comportement d'évitement reflète la biodisponibilité des contaminants dans les sols et permet de déterminer la toxicité des sols.

D'autres tests se basent sur l'utilisation de microorganismes qui présentent une plus grande sensibilité que les plantes ou la macrofaune du sol au stress induit par les métaux et métalloïdes (Bolan *et al.*, 2014). Le test de base en phase solide (BSPT) appelé « Microtox™ solide » utilise cette capacité en utilisant des bactéries luminescentes (*Vibrio fischeri*) dont la luminosité sera négativement impactée par la présence de polluant. Ce test est réalisé par la mise en contact des microorganismes avec l'échantillon de sol en suspension aqueuse (Calace *et al.*, 2005).

Cependant, bien que ces différents tests permettent de déterminer la toxicité des sols, ils ne permettent d'observer qu'un effet global de la biodisponibilité des métaux et métalloïdes sur les espèces testées. Il est donc essentiel de réaliser en parallèle des analyses qui quantifieront la mobilité et la biodisponibilité des polluants dans le sol. Il s'agit d'exemple, en mesurant la concentration des polluants dans l'eau porale, ou encore par la réalisation d'extractions chimiques simples sur le sol permettant de déterminer la fraction potentiellement disponible. Il est également important de déterminer les qualités agronomiques du sol par la mesure de paramètres tels que le pH, la matière organique et la disponibilité d'éléments essentiels.

Dans la présente étude, ces tests ont pour objectif de déterminer le meilleur amendement ou la meilleure combinaison d'amendements à utiliser sur la parcelle expérimentale en mesurant la toxicité du sol après ajout d'amendements, mais aussi le gain agronomique, dans le but de permettre la mise en place de végétaux dans un procédé de phytostabilisation et *in fine* la mise en place d'un écosystème viable.

3.3. Les plantes en phytomanagement

3.3.1. Généralités

Le choix de l'espèce végétale appropriée est l'un des aspects les plus importants à prendre en considération dans une approche de phytomanagement. Idéalement, les espèces végétales choisies doivent être capables de tolérer des niveaux élevés de métaux et métalloïdes dans le sol ainsi que des conditions souvent extrêmes en termes d'acidité, de salinité ou d'alcalinité (Wu *et al.*, 2013), tout en étant capables de perdurer dans le temps (Bolan *et al.*, 2011). En outre, dans les régions minières semi-arides, les espèces végétales doivent également pouvoir s'adapter à la sécheresse.

Dans un contexte de phytostabilisation, les plantes qui ont un système racinaire important et une capacité à exclure les métaux et métalloïdes de leurs parties aériennes sont généralement considérées comme de bons candidats (Marques *et al.*, 2009). Elles stabiliseront ainsi le sol,

réduisant l'érosion et le lessivage, tout en minimisant le risque que des polluants puissent entrer dans la chaîne alimentaire ou se disperser dans l'environnement lors de la senescence des feuilles.

Les relations entre la réaction des plantes face aux facteurs environnementaux (réponse) et les caractères qui déterminent les effets de ces plantes sur les écosystèmes (effet) ont récemment été étudiées (Garnier *et al.*, 2016) (Figure 1.15). Ainsi, l'influence des plantes sur les propriétés du sol (physiques, chimiques et biologiques) est considérée comme un des principaux régulateurs de l'écosystème du sol. Les plantes vont par exemple jouer un rôle dans la dynamique et la séquestration du carbone dans le sol, sa stabilité structurale et la réduction de l'érosion, la dynamique et la disponibilité des nutriments, ainsi que l'abondance et la diversité des microorganismes (Garnier *et al.*, 2016 ; Faucon *et al.*, 2017).

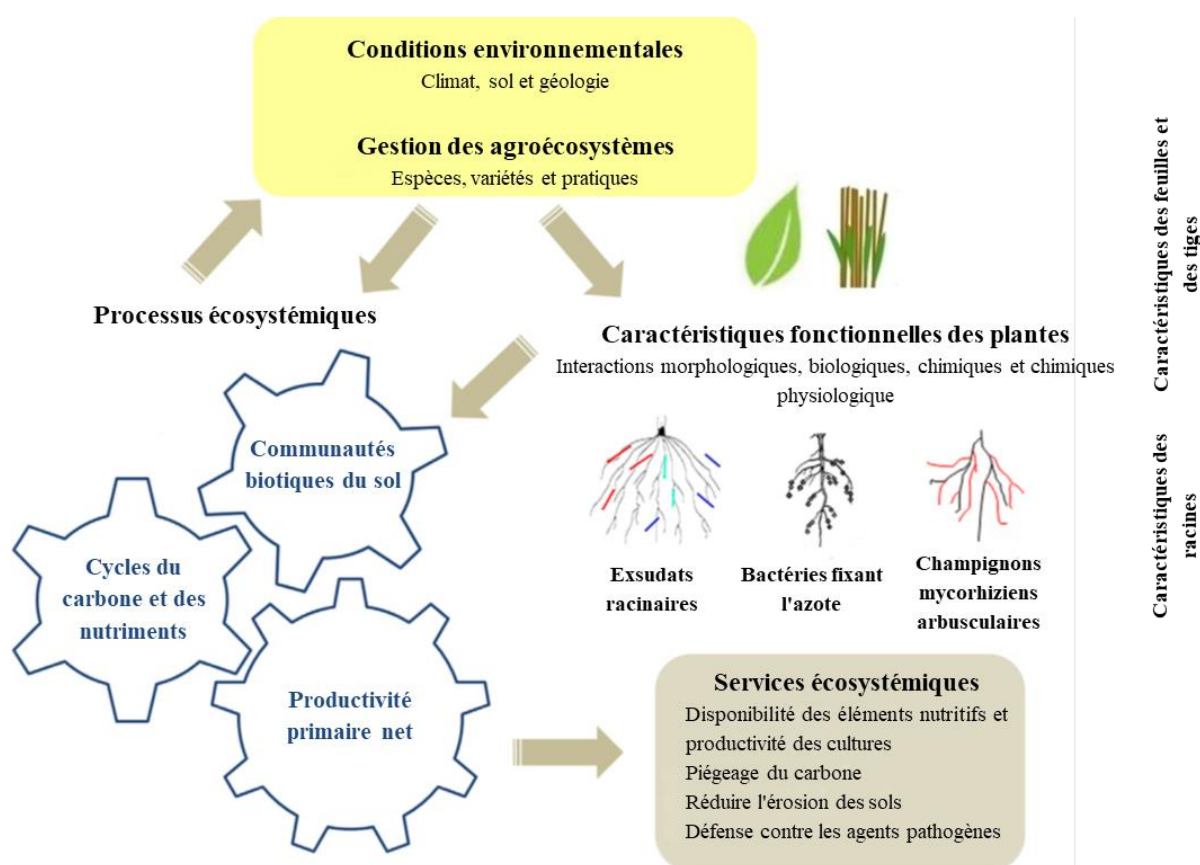


Figure 1.15 : Relations entre les caractères fonctionnels des plantes, les processus écosystémiques. Les caractéristiques fonctionnelles des plantes sont choisies en fonction du climat, de la géologie et des conditions du sol (tiré de Faucon *et al.*, 2017).

Outre la réaction des plantes face aux métaux, leurs effets sur la dynamique du sol doivent être pris en compte dans la sélection des plantes pour la stratégie de phytostabilisation. Par exemple, les graminées comme *Agrostis tenuis*, *Lolium perenne* et *Festuca rubra* sont considérées comme des candidates appropriées en raison de leur croissance sous forme de bonne couverture superficielle et de leur capacité à former un système racinaire dense (Arienzo *et al.*, 2004 ; Lambrechts *et al.*, 2011).

Des fabacées, comme *Trifolium repens* et *Lupinus albus*, ont été suggérées comme des candidates intéressantes, en raison de leur capacité à fixer l'azote atmosphérique (Vazquez et al., 2006 ; Liu et al., 2018). Des plantes d'intérêt économique telles que les cultures énergétiques comme le *Miscanthus* mais aussi des arbres comme ceux des genres *Salix* et *Populus* ont également été recommandées afin de rendre la phytostabilisation économiquement rentable par production de biomasse ligneuse (Korzeniowska et al., 2011 ; Lambot, 2011).

Ces différentes espèces ou genres peuvent être utilisés seules ou en association pour combiner leurs avantages environnementaux ou économiques. Enfin sur certains sites pollués, on note la présence de végétaux adaptés dont la présence permet la stabilisation des sols (Conesa et al, 2006 ; Orchard et al., 2009).

3.3.2. Les métaux et métalloïdes dans le système sol-plante

Comme vu précédemment, des liens forts existent entre spéciation, mobilité et phytodisponibilité des métaux et métalloïdes, et différents facteurs jouent sur ces liens, notamment les végétaux. En effet, ils sont capables de modifier les caractéristiques du sol, particulièrement au voisinage du système racinaire, dans une zone appelée la « rhizosphère ». Le terme de rhizosphère a d'abord été défini par Hiltner en 1904, pour décrire la stimulation de la biomasse microbienne dans la région du sol située à l'interface sol/racine. Depuis, le terme rhizosphère a pris un sens plus général ; elle est définie comme « le volume du sol soumis à l'influence de l'activité racinaire » (Darrah 1993). Ce volume de sol varie avec les espèces végétales, en particulier en fonction de l'extension du système racinaire et ses propriétés de surface, les éléments nutritifs considérés et les propriétés physiques du sol (Alloway 1995).

Une connaissance approfondie des systèmes racinaires pour la sorption des métaux et métalloïdes ainsi que des mécanismes de résistance des végétaux permettra de comprendre comment les plantes peuvent croître et survivre sur des zones polluées, mais également de détoxifier certains sols par extraction des polluants ou d'éviter certaines carences nutritionnelles. Il est important de rappeler que les métaux jouent un rôle primordial dans les végétaux. En effet, certains métaux sont indispensables à des processus physiologiques majeurs, comme la respiration, la photosynthèse ou l'assimilation des macronutriments (azote, soufre...). Ils peuvent aussi être impliqués dans des processus moléculaires comme la biosynthèse des protéines, des acides nucléiques, des phytohormones (auxines...), de la chlorophylle et des métabolites secondaires, le métabolisme lipidique ou la tolérance au stress.

Mais ces éléments ont une action optimale dans une gamme de concentrations très étroites. En quantité trop importante, tous les éléments métalliques deviennent toxiques (Figure 1.16).

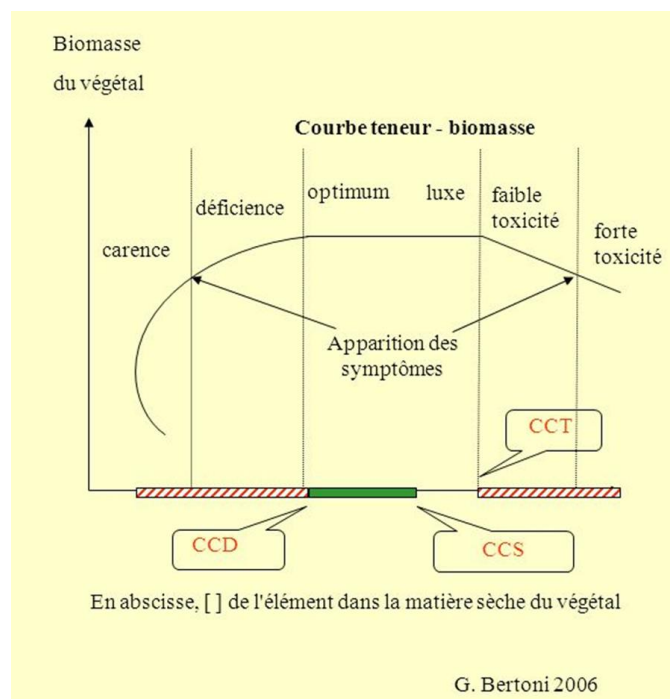


Figure 1.16 : Courbe de croissance des plantes en fonction de la teneur en éléments essentiels : carence, déficience, toxicité. CCD : concentration critique de déficience, CCS : concentration critique de suffisance, CCT : concentration critique de toxicité (source : Bertoni 2006).

La plupart des technosols miniers contiennent un cocktail d'éléments métalliques et métalloïdes en forte concentration. Ces derniers peuvent endommager le système cellulaire. Ils entrent également en compétition avec des éléments essentiels tels que Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} créant un déséquilibre nutritionnel (Zhao *et al.*, 2012). Des dégâts physiologiques (retard de la germination et inhibition de la croissance, surface foliaire plus faible, chlorose par exemple) sont alors occasionnés (Arduini *et al.*, 1998 ; Yusuf *et al.*, 2011 ; Liu *et al.*, 2012). Une diminution du taux de transpiration de la plante ainsi que de son contenu en eau a été observée ; ceci pourrait être dû à une fermeture des stomates. La fermeture des stomates responsables de la fixation du CO_2 va engendrer un impact sur l'approvisionnement de la plante en CO_2 et *in fine* l'activité photosynthétique sera affectée. Ainsi, la quantification des échanges gazeux peut refléter l'adaptabilité et la capacité d'une plante à tolérer une contamination (Lage-Pinto *et al.*, 2008 ; Vernay *et al.*, 2008).

3.3.2.1. Le rôle de la microflore rhizosphérique

La présence de fortes concentrations en métaux et métalloïdes entraîne une réduction de la croissance des plantes, mais elle va également affecter l'activité microbienne du sol. Cependant, les végétaux poussant sur un sol pollué peuvent être associées à un groupe diversifié de microorganismes présents dans leur rhizosphère (Rajkumar *et al.*, 2012).

La rhizosphère est la zone du sol influencée et formée par les racines des végétaux et les microorganismes associés à cette zone. Ce microbiote rhizosphérique comprend différents groupes de microorganismes, incluant des bactéries et des champignons. Dans la rhizosphère, d'importantes interactions sont établies entre les plantes et les micro-organismes, dont le développement est influencé par les exsudats racinaires. Les racines des plantes contiennent également des micro-organismes endosymbiotiques, bactéries et champignons. Cette microflore associée aux racines se distingue nettement de la microflore du sol, et sa composition varie en fonction du site en contexte pollué (*Foulon et al., 2016b*). La croissance des plantes au cours d'un processus de phytoremédiation peut dépendre de la présence de micro-organismes appropriés au niveau de la rhizosphère, dès les premiers stades de l'implantation des végétaux (*Bell et al., 2015*).

Certaines espèces de micro-organismes semblent importantes pour le phytomanagement des sols contaminés par les polluants inorganiques. Ces microorganismes sont capables de tolérer de fortes concentrations en métaux et métalloïdes et peuvent améliorer la tolérance des plantes aux polluants : ils contrôlent leur accumulation ou leur exclusion, ou favorisent la production de biomasse par les végétaux (*Lebeau et al., 2008 ; De Maria et al., 2011 ; Antoniadis et al., 2017 ; Wang et al., 2017*). En effet, certains polysaccharides sécrétés par les microorganismes, la glomaline et d'autres glycoprotéines, peuvent améliorer la structure des agrégats du sol et donc sa stabilité structurelle contre l'érosion éolienne et hydrique. De plus, le déficit en éléments nutritifs des technosols miniers peut être diminué par la solubilisation microbienne de minéraux tels que le feldspath, libérant les éléments P et K (*Wang et al., 2017*) (Figure 1.17). Ils peuvent également fixer l'azote atmosphérique, chélater le fer par les sidérophores (*Vacheron et al., 2013*) ou encore améliorer la production de régulateurs de croissance (auxine, gibbérellines, cytokinines, acide abscissique, éthylène) (*Zappelini 2018*).

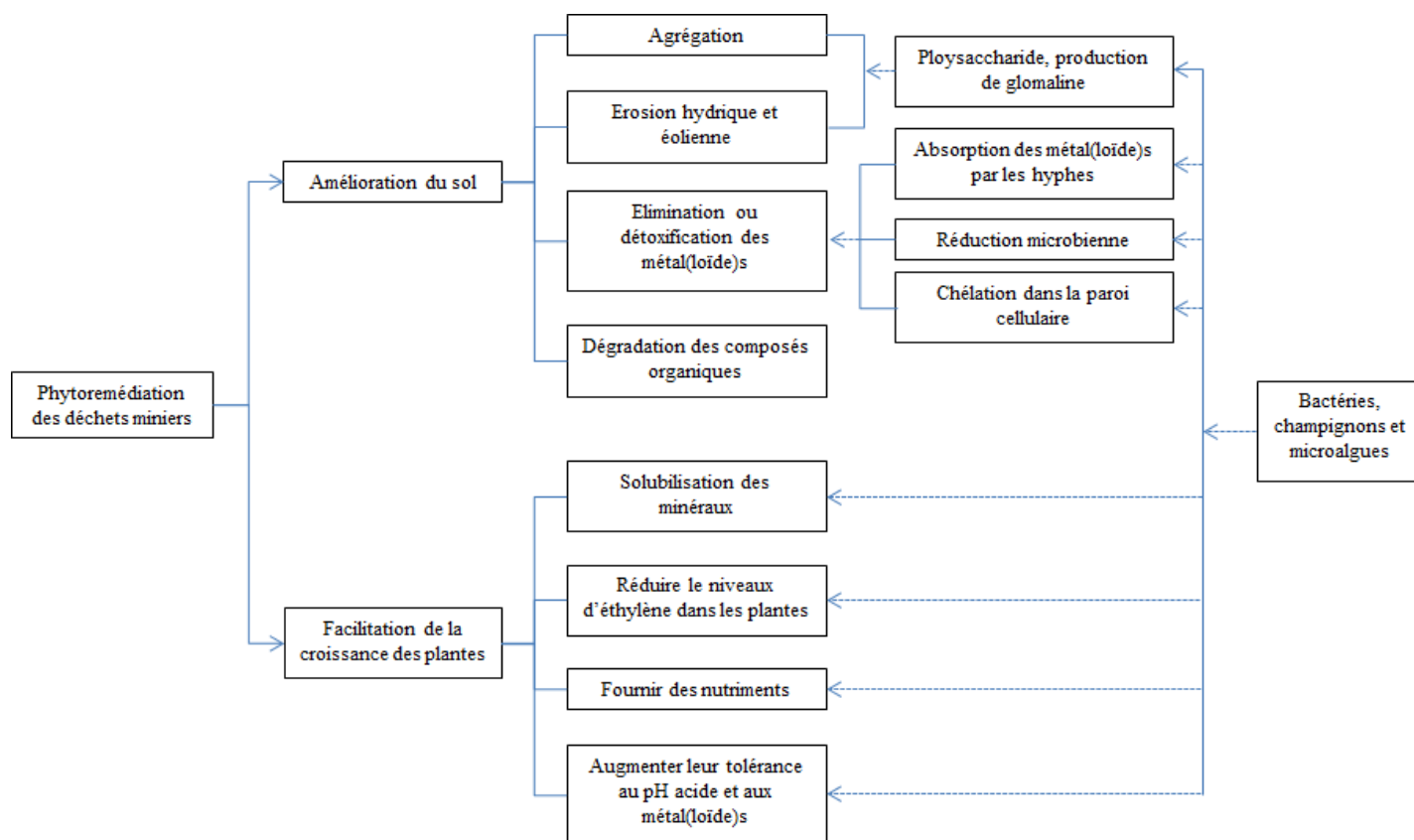


Figure 1.17 : Contribution des micro-organismes à la phytoremédiation des déchets miniers (adapté de Wang *et al.*, 2017)

La détoxification des métaux et métalloïdes chez les plantes et le microbiote associé peut être provoquée par la production d'agents chélatants, mais aussi par des composants de la paroi cellulaire des plantes et des champignons (Sessitsch *et al.*, 2013) (Figure 1.18).

La base mécanistique de cette détoxification par le microbiote peut comprendre (1) l'amélioration de la croissance des plantes ; (2) la réduction voire l'exclusion de l'absorption des polluants par précipitation, liaison, chélation ou réaction d'oxydoréduction, ainsi que la modification du pH dans la rhizosphère (Seshadri *et al.*, 2015) ; (3) la protection *via* la membrane plasmique qui fonctionne comme une barrière sélective chez les plantes et les champignons ; (4) l'activation de transporteurs et pores spécifiques ou non spécifiques dans la membrane plasmique chez les plantes et les champignons ; (5) la séquestration des métaux ou métalloïdes dans les vacuoles des plantes et cellules fongiques ; et (6) leur capture et leur transport par les hyphes de champignons filamenteux tels que *Aspergillus niger*, *Mucor rouxii* et *Rhizopus arrhizus* (Cabral *et al.*, 2015 ; Antoniadis *et al.*, 2017).

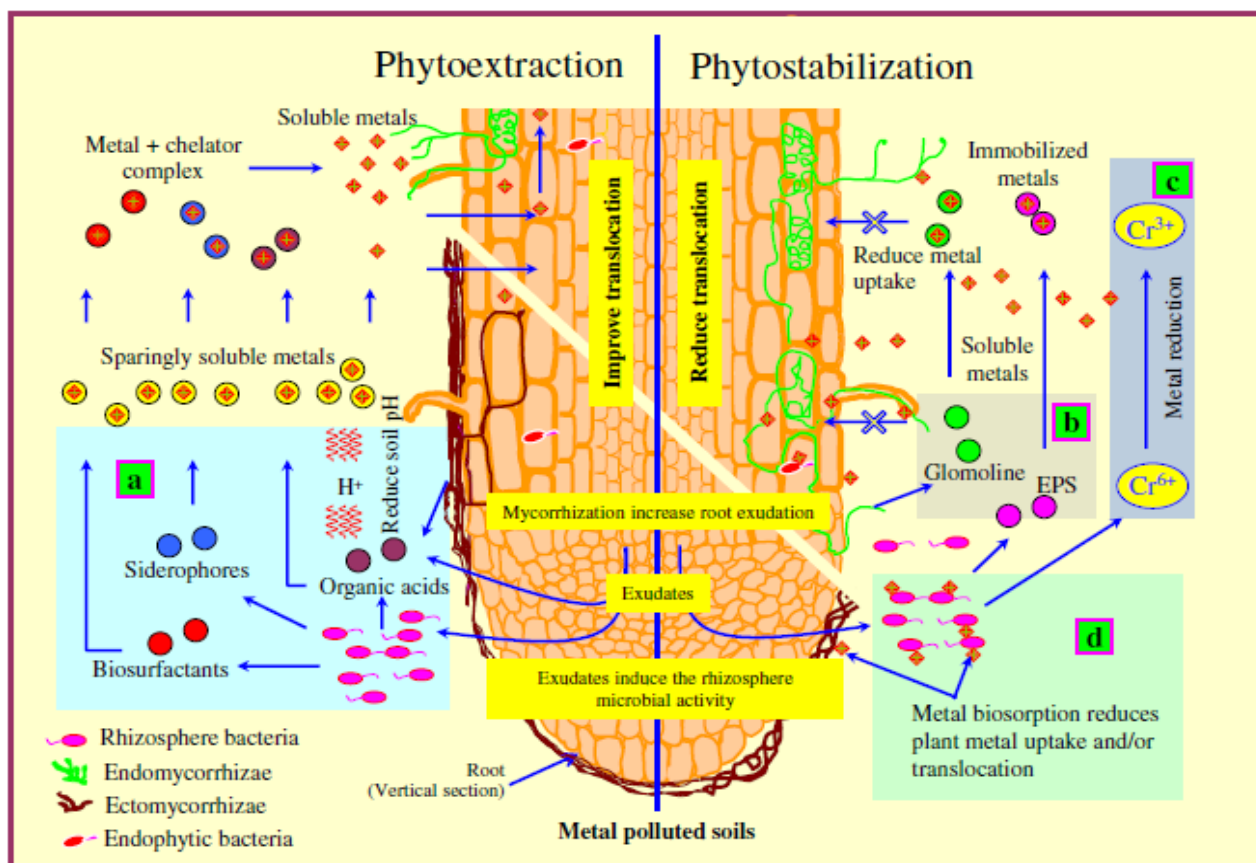


Figure 1.18 : Schéma d'un processus de phytoremédiation dans les sols contaminés par les métaux en améliorant la mobilisation/immobilisation des métaux et métalloïdes. (a) Les microbes améliorent l'assimilation des métaux par les végétaux en produisant des chélateurs mobilisateurs de métaux. Les microbes associés aux plantes réduisent l'absorption et/ou la translocation des métaux végétaux par (b) la production de métabolites immobilisants métalliques, (c) la réduction des métaux et/ou (d) la biosorption des métaux. Abréviations : substances polymères extracellulaires (EPS) (tiré de Rajkumar *et al.*, 2012)

La microflore peut, à travers des réactions d'oxydo-réduction, influencer la mobilité des métaux et métalloïdes dans la rhizosphère des plantes en contexte de phytomanagement. Les bactéries sont impliquées dans les réactions d'oxydation de Fe(II) et Mn(II). La microflore peut participer à la formation de plaques d'oxydes de fer sur les racines des végétaux, contribuant ainsi à la stabilisation de polluants métalliques et métalloïdes au niveau des racines. A l'inverse, certains micro-organismes peuvent réduire des oxydes de Fe et Mn ayant potentiellement piégé des métaux, en particulier lorsque le sol est saturé en eau. De nombreuses études ont mis en évidence l'oxydation ou la réduction de l'arsenic par certaines bactéries (Battaglia-Brunet *et al.* 2002 ; Stolz *et al.*, 2002, Battaglia-Brunet *et al.*, 2006). En effet, le rôle important de l'oxydation de l'As(III) en As(V) dans la détoxification du milieu en condition aérobie par l'arsénite oxydase est due au fait que l'As(III) est plus toxique, plus mobile et donc plus biodisponible que l'As(V). Les bactéries chimiotrophes ou lithotrophes vont utiliser la réaction d'oxydation de l'arsenic comme source d'énergie (Santini *et al.*, 2004, Battaglia-Brunet *et al.*, 2006). Par ailleurs, les microorganismes

possèdent la capacité d'expulser l'arsenic qui a pénétré dans les cellules par un transporteur d'arsénite (*Achour-Rokbani et al., 2007*). En effet, l'As(V) doit d'abord être réduit par l'arsénate réductase en As(III) pour être expulsé (*Achour-Rokbani et al., 2010*). Ce système de détoxification est susceptible d'induire une transformation de l'As(V) en As(III), plus mobile dans les sols.

En conditions réductrices, micro-aérophiles ou aérobies, des bactéries peuvent méthyler les formes inorganiques de l'As (*Zeng et al., 2018*). La méthylation est un mécanisme de résistance développé par les microorganismes car les composés arséniés méthylés tels que l'acide monométhylarsénique (MMAA-V) et l'acide diméthylarsénique (DMAA-V) sont beaucoup moins toxiques que les formes d'arsenic inorganiques (*Laperche et al., 2003*).

3.3.2.2. Le rôle des exsudats dans la rhizosphère

Les plantes peuvent sécréter différents types d'exsudats rhizosphériques. Ces exsudats se composent principalement de composés de faible poids moléculaire (sucres, acides organiques, acides aminés, acides gras, flavonoïdes, métabolites secondaires, notamment phénoliques), de composés de poids moléculaire plus élevé qui sont généralement des polymères insolubles (mucilages, comme les polysaccharides et des protéines, principalement des enzymes), ainsi que des ions (H^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , NH_4^+ , CO_3^{2-} , PO_4^{3-}) (*Baetz et Martinoia, 2014 ; Elvard. 2013*). La libération dans la rhizosphère de la plupart des composés de faible poids moléculaire se fait de façon passive (diffusion, canaux anioniques, trafic vésiculaire), mais elle peut également se faire de façon active (transport assisté) (*Badri et Vivanco. 2009*). Cependant, le stress lié aux métaux et métalloïdes affecte le métabolisme énergétique et par conséquent, la sécrétion active d'exsudats, qui est liée à la consommation d'ATP. De multiples familles de transporteurs membranaires sont impliquées dans l'exsudation active. Certains facilitent la sécrétion de divers composés tels que les sucres, les acides organiques, les esters organophosphorés et les acides aminés, mais aussi les métabolites secondaires. D'autres encore sont impliqués dans la sécrétion de composés phénoliques vers l'apoplaste et provoquent ainsi une augmentation de l'absorption des éléments métalliques et métalloïdes (*Antoniadis et al., 2017*). Par ailleurs, la présence de phénylpropanoïdes et de flavonoïdes dans les exsudats rhizosphériques, qui sont des composés abondants sur la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique, indique également l'implication d'un trafic vésiculaire pendant l'exsudation racinaire (*Antoniadis et al., 2017*).

L'exposition des plantes aux éléments métalliques et métalloïdes engendre des modifications physiologiques (*Vannoppen et al., 2015*). Généralement, les réponses moléculaires aux métaux et métalloïdes entraînent la sécrétion d'exsudats qui sont produits en grande quantité par l'extrémité de la racine principale et la région basale des racines latérales. Plusieurs facteurs peuvent affecter la

composition des exsudats végétaux, par exemple l'état nutritionnel des plantes (*Bowsher et al., 2015*), le stress métallique, le type de sol (pH, teneur en matière organique, structure du sol) (*Chiang et al., 2006*). Ainsi, la toxicité des éléments métalliques et métalloïdes peut entraîner une variation qualitative et quantitative de l'exsudation en réponse à des dommages membranaires.

Les exsudats racinaires libérés activement et passivement par les racines des plantes dans la rhizosphère peuvent former des complexes forts avec une gamme de métaux et de métalloïdes (*Wenzel et al., 2011*). Ces exsudats peuvent (1) interagir avec les métaux et métalloïdes en formant des complexes ou chélates organométalliques dans la rhizosphère, (2) modifier les conditions redox ou le pH du sol, influençant grandement la sorption-désorption des métaux sur et à partir des composants du sol, ou dans l'espace apoplastique et empêchant ainsi leur entrée dans le symplaste (*Watanabe et Osaki, 2002 ; Hill et al., 2002 ; Violante et al., 2008*) (Figure 1.19). Ainsi, la majorité des composants des exsudats rhizosphériques est impliquée dans des réactions redox. Par exemple, les phénols favorisent la réduction des métaux, ce qui entraîne une augmentation de nouveaux complexes de type métaux – composés phénoliques disponibles dans les plantes (*Rengel 2015*). Le carbone organique dissous peut également jouer un rôle dans les réactions d'oxydo-réductions. Enfin, le pH peut être modifié de diverses manières dans la rhizosphère. Pour maintenir leur pH interne proche de la neutralité, les plantes doivent compenser leur absorption ionique par une excrétion de charges au niveau racinaire (*Römheld et al., 1984*). Lorsque les cations sont davantage prélevés que les anions, les racines compensent en relâchant un excès de charges positives (H^+) dans la rhizosphère, ce qui entraîne alors une acidification du milieu (*Lasat 2002*), ou elles peuvent au contraire, relâcher des ions hydroxydes ou bicarbonates (*Hinsinger 2001*) et induire une augmentation de pH. Dans le cas des sites miniers, très riches en éléments métalliques (cations), la plante aura donc tendance à acidifier le sol rhizosphérique. Par ailleurs, la respiration racinaire augmente la pression partielle de CO_2 dans la rhizosphère contribuant, une fois encore, à son acidification (*Nye 1981 ; Hinsinger 1998*).

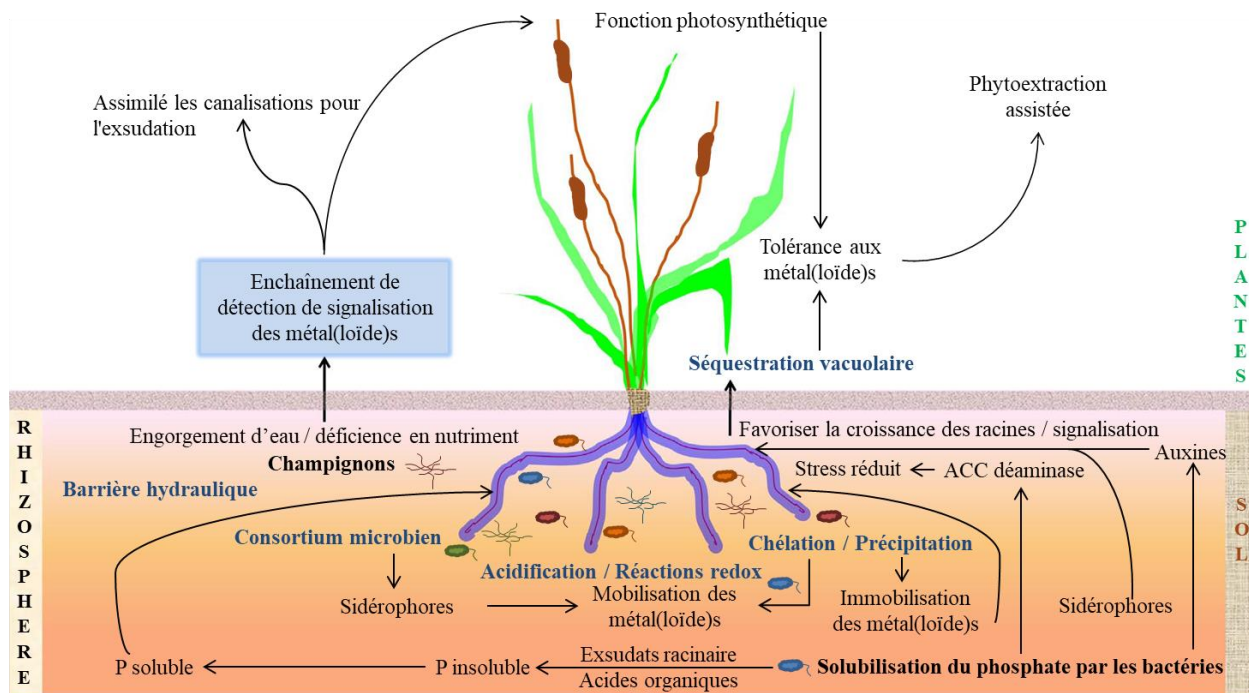


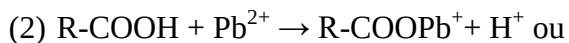
Figure 1.19 : Schéma (adapté de Antoniadis *et al.*, 2017) montrant les mécanismes qui opèrent dans l'interface plante-sol, en particulier dans la rhizosphère, impliquant la croissance des plantes et les processus métaboliques favorables à la santé de la plante, à travers les consortiums microbiens de la rhizosphère. Par exemple, les bactéries solubilisant le phosphate qui favorisent la croissance et la santé des plantes en inactivant les espèces réactives de l'oxygène [ROS], en activant la voie métabolique de la désaminase ACC [ACC1-Aminocyclopropane-1-carboxylate] en dégradant la ACC en ammoniac (NH_3) et en régulant la production d'auxines qui régulent la croissance végétale. Ces processus impliquent la disponibilité des nutriments (N et P) et mobilisent et immobilisent les métaux et métalloïdes toxiques et essentiels.

Les acides organiques exsudés peuvent mobiliser certains éléments comme le plomb, le zinc, le cuivre ou le cadmium liés aux carbonates (Shaheen *et al.*, 2017).

Luo *et al.* (2014) ont montré qu'un l'écotype hyperaccumulatif de *Sedum alfredii* pouvait, par la sécrétion de composés organiques, réduire de manière significative la sorption de cadmium sur les particules du sol et augmenter sa mobilité par la formation de complexes solubles (composés organiques-métal). Dans l'étude de Dessureault-Rompré *et al.* (2008), la forte mobilisation des métaux ainsi que du carbone organique dissous provenant de la matière organique du sol dans la rhizosphère de *Lupinus albus* a été attribuée à l'exsudation d'anions organiques. Ainsi, la mobilisation de l'aluminium, du fer et du zinc a été expliquée par leur complexation avec le citrate exsudé, tandis la mobilité du plomb et du cuivre a été attribuée à leur complexation avec le carbone organique dissous dérivé de la matière organique du sol elle-même dissoute par les exsudats racinaires.

Liu et Huang (2003) ont démontré que les composés organiques des exsudats racinaires peuvent provoquer la libération de manganèse et de fer présents sous forme d'oxydes dans le sol.

Le plomb réagirait avec les acides organiques dans la solution du sol selon les réactions suivantes :



avec R-COOH : acide carboxylique et R-OH : alcool ou phénols.

Parmi les exsudats qui solubilisent le fer, les phytosidérophores forment des complexes Fe-phytosidérophore qui sont absorbés dans les cellules racinaires par un transporteur de Fe (*Curie et al., 2001*). Cette sécrétion de phytosidérophores va, par la chélation du fer, entraîner une acidification du sol (*Schenkeveld et al., 2017*). Plusieurs études ont montré que de tels composés complexant le Fe peuvent dissoudre efficacement le Fe des oxydes pauvres, y compris la goethite, un oxyhydroxyde cristallin, ou encore le fer contenu dans les argiles comme l'illite omniprésente dans les sols (*Kraemer 2004 ; Reichard et al., 2005 ; Reichard et al., 2007 ; Hazotte et al., 2016*). Ils peuvent cependant aussi former des complexes stables avec d'autres métaux, tels que Al, Cd, Cu, Ga, In, Pb et Zn (*Schalk et al., 2011 ; Rajkumar et al., 2012*). Par exemple, Chaignon *et al.* (2002) ont constaté que la croissance du blé sur un sol contaminé au cuivre sous carence en fer entraînait une augmentation d'environ trois fois du taux de libération des phytosidérophores, mais aussi de la biodisponibilité du Cu et du Zn. L'arsenic ayant tendance à se lier aux oxydes/hydroxydes de fer, peut se retrouver mobilisé indirectement, par la dissolution d'oxyde de fer via les sidérophores (*Ma et Lin, 2012 ; Onereti et al., 2017*). Toutefois, certaines études ont montré que la production de sidérophores n'entraîne pas toujours une augmentation de l'absorption des métaux par les plantes (*Kuffner et al., 2008 ; Kuffner et al., 2010*).

3.3.3. Les mécanismes d'absorption, de translocation et de tolérance des métaux et métalloïdes chez les végétaux

Toutes les espèces végétales ont leurs propres systèmes de tolérance, de même qu'une seule et même espèce peut développer plusieurs systèmes de tolérance à la fois. Ces mécanismes peuvent être constitutifs ou induits par l'excès de métaux.

Les stratégies de tolérance des plantes vont être de diverses natures comme l'exclusion des métaux et métalloïdes, leur accumulation dans les racines (phytostabilisation) ou dans les parties aériennes (phytoextraction).

Pour entrer dans la racine, le métal peut emprunter différentes voies :

(1) la voie symplastique (plasmodesmes) ; le transport sera alors actif et se déroulera au niveau de la membrane plasmique des cellules de Caspary. Le transfert pourra donc se faire contre le gradient de concentration (*Remon 2006*).

(2) la voie apoplastique (paroi) qui est la voie d'absorption généralement utilisée ; elle se réalise par simple diffusion au travers de l'apoplaste du cortex racinaire et de l'endoderme. Le transport des métaux se fait alors de manière passive, c'est-à-dire dans le sens du gradient de

concentration par les pores du réseau de la cellulose, de l'hémicellulose et des glycoprotéines.

Le processus d'absorption par les plantes de polluants inorganiques comporte différentes étapes qui déterminent l'efficacité des mécanismes de défense et de protection. Il définit les limites de toxicité et, par la suite, de croissance, de développement et de troubles métaboliques provoqués. Les mécanismes de tolérance des plantes peuvent être classés comme suit (Figure 1.20) : (a) la liaison/chélation par divers composés exsudés par les racines, (b, c et e) la translocation via les vaisseaux de xylème, la séquestration/compartimentation (stratégie d'accumulation), (d) l'excrétion par les parties aériennes ou racinaires des plantes (stratégie d'exclusion) via des transporteurs de métaux impliqués dans le transfert des ions métalliques du symplaste vers l'apoplaste.

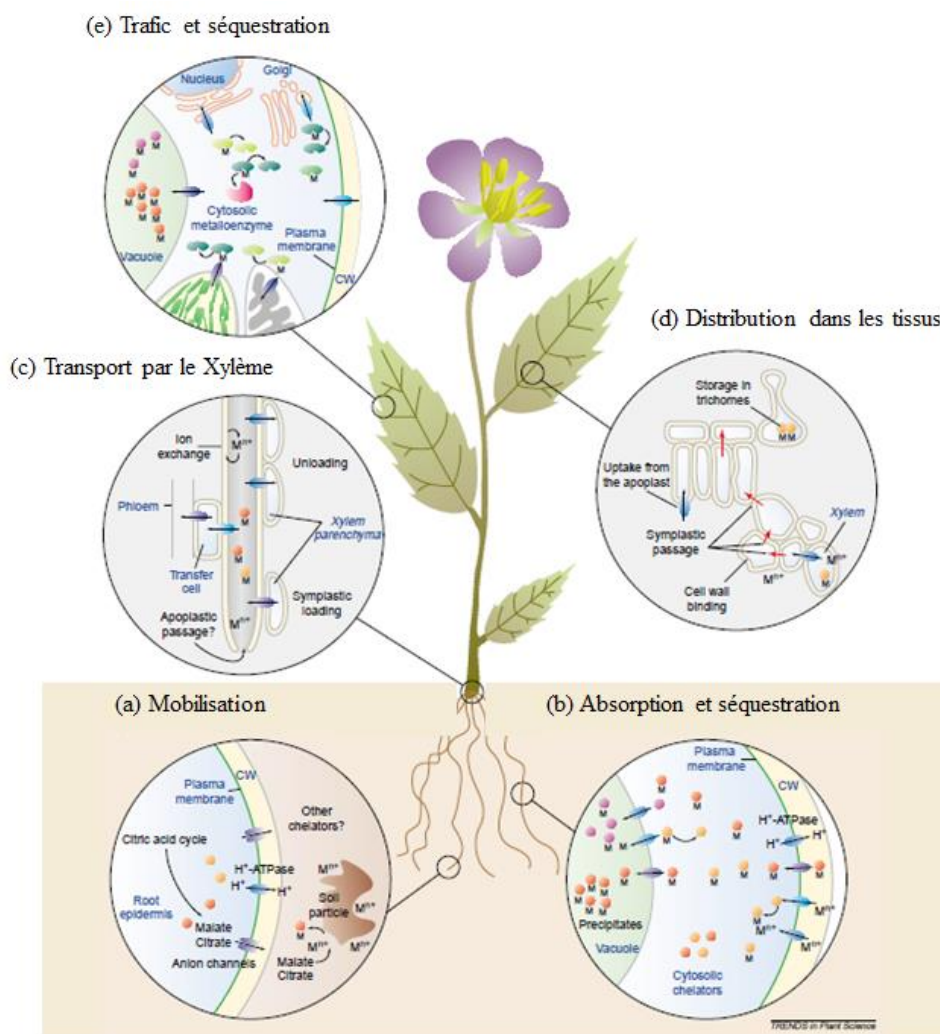


Figure 1.20 : Différents modèles de transports des métaux dans la plante (source : Clemens *et al.*, 2002)

Dans la cellule végétale, les éléments métalliques et métalloïdes sont liés ou chélatés avec divers ligands, ce qui entraîne la formation de complexes et, par la suite, le maintien de faibles concentrations en métaux ou métalloïdes libres dans le cytoplasme.

Les processus de séquestration ou de compartimentation ont lieu à l'intérieur de la cellule (parois cellulaires, vacuoles) ou dans divers organes et tissus (feuilles matures, épiderme et ses

appendices), de sorte que les métaux et métalloïdes ne peuvent pas réagir avec les substances cellulaires métaboliquement actives (Parrotta et al, 2015). La paroi cellulaire, exerçant un rôle de barrière physique et physiologique de la voie symplastique vis-à-vis éléments métalliques et métalloïdes, représente un site important d'accumulation, principalement parce qu'elle contient des polysaccharides riches en groupes carboxyle (pectine) et en lignine. Une séquestration vacuolaire dans les cellules racinaires a été mise en évidence (Antoniadis et al., 2017).

L'excrétion des métaux et métalloïdes par les parties aériennes des plantes est un processus qui a été observé chez un nombre limité de plantes, confrontées à des concentrations excessives d'éléments métalliques et métalloïdes. Par exemple, il a été signalé que des concentrations accrues de Pb et de Ni dans les extrémités des feuilles de tabac pouvaient être dues à la libération de métaux en excès avec les fluides de guttation (Liu et al., 2014).

3.3.4. Le genre *Salix*

Le genre *Salix* comprend près de 500 espèces, se distribuant sur une large zone géographique et climatique (FAO, 2013). Il fait partie des premiers arbres ou arbustes à coloniser un milieu ouvert, perturbé, ou une zone riparienne. Sa croissance requiert beaucoup de lumière et des précipitations importantes. Le saule est une espèce ligneuse phréatophyte à croissance rapide avec un pouvoir d'évapotranspiration important. Il est souvent utilisé pour la réhabilitation des sites contaminés. Ce genre végétal possède de nombreuses qualités recherchées en phytomanagement (Wahsha et al., 2012) :

- (i) Il présente un important système racinaire ;
- (ii) Il est capable de se développer sur des sites présentant différentes conditions climatiques (altitude, pluviométrie), hydriques (sols très drainants) (Malá et al., 2010) et chimiques (présence d'EM en fortes concentrations) (Evangelou et al., 2013 ; Mleczek et al., 2010),
- (iii) Il est capable d'améliorer les propriétés agronomiques d'un sol (amélioration de la texture, capacité de rétention en eau, apports de nutriments, développement de la microflore du sol) (Glaser et al., 2000),
- (iv) Il est capable d'immobiliser les métaux et métalloïdes dans son système racinaire (Bart et al., 2016).

Ces différentes caractéristiques, associées à la sélection d'espèces qui limitent le transfert de métaux et métalloïdes vers les organes aériens (Purdy et Smart, 2008 ; Zhivotovsky et al., 2010), font du genre *Salix* un bon candidat en phytomanagement de sites pollués.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Plusieurs études menées en laboratoire et en plein champs (Tableau 1.5) ont démontré que certaines espèces de saules possédaient une grande capacité d'absorption de métaux au niveau racinaire (*Dickinson et al., 2009*) ainsi qu'une tolérance inter- et intra-spécifique à accumuler les métaux et métalloïdes (*Marmioli et al., 2011*).

Les différentes expériences menées en laboratoire ou en parcelle expérimentale ont montré que le saule possède un facteur de translocation très faible (inférieur à 1), avec des teneurs en métaux et métalloïdes comme le plomb, l'arsenic ou l'antimoine qui sont plus importantes dans les racines que dans les tiges (*Pietrosanti et al., 2009 ; Ruttens et al. 2011 ; Bart et al., 2016 ; Desjardins et al., 2018 ; Lebrun et al., 2017, 2018a,b*). Enfin, la forte production de biomasse de certaines espèces de saules, permet, bien que l'accumulation de métaux et métalloïdes soient inférieure à celles de plantes hyperaccumulatrices, d'extraire une quantité de métaux et métalloïdes pouvant être supérieures à ces dernières. (*Migeon et al., 2009 ; Marmioli et al., 2011*).

Tableau 1.5 : Récapitulatif de quelques études menées sur le saule sur des sols pollués au plomb et/ou l'arsenic.

Espèces	Variétés	Type d'expérience	Type de contaminant et sa concentration (mg.kg ⁻¹ de sol)		Concentration (mg.kg ⁻¹) dans les parties aériennes		Références
			Pb	As	Pb	As	
<i>Salix purpurea</i>	<i>Schultze</i> <i>Shultze</i> <i>Angustifolia</i> <i>kermes</i> <i>Uralensis</i> <i>Nigra</i> <i>longifolia</i> <i>pendula</i> 233 <i>Green dicks</i> <i>Utilissima</i>	<i>In situ</i>	Pb : 7,21		1,02 / 6,38		<i>Mleczek et al., 2009</i>
<i>Salix alba L</i>	<i>Kamon</i>	<i>In situ</i>					
<i>Salix alba L</i>		<i>In situ</i>	Pb : 965 / 1020		19 / 28		<i>Labidia et al., 2017</i>
<i>Salix viminalis</i>		<i>In situ</i>	Pb : 143		12,7		<i>Vervaeke et al., 2003</i>
<i>Salix spp</i>		<i>In situ</i>	Pb : 99 / 720	As : 312 / 615	0-2	< 2	<i>French et al., 2006</i>
<i>Salix spp</i>		<i>In situ</i>	Pb : 1445	As : 420	14	ND	<i>King et al., 2006</i>
<i>Salix alba</i>		Pot	Pb : 493	As : 886	36.3	74.7	<i>Vamerali et al., 2009</i>
<i>Salix viminalis</i> <i>Salix purpurea</i>		Pot	Pb : 80 / 221	As : 212 / 1436	2,0 / 15 0 / 2,5	50 / 100 50 / 220	<i>Bart et al., 2016</i>
<i>Salix alba</i> <i>Salix viminalis</i> <i>Salix purpurea</i>		Pot	Pb: 11000	As : 500	20-150 100-300 100-500	10 2,0 / 30 1,0 / 80	<i>Lebrun et al., 2017</i>

3.3.5. Le genre *Trifolium*

Le trèfle blanc ou trèfle rampant (*Trifolium repens* L. 1753) fait partie de la famille des *Fabaceae*, sous famille des *Faboideae*. C'est l'une des espèces les plus répandues du genre *Trifolium*. C'est l'espèce de *Fabaceae* la plus fréquemment rencontrée dans les prairies (Laissus, 1981).

Trifolium repens est une plante vivace poussant jusqu'à 2800 m d'altitude. Elle se répartit sur tout le continent européen et en Amérique du Nord, à l'exception des zones boréales. Elle s'adapte à tous les types de sols, et peut se rencontrer dans les prés, les pelouses, les talus, sur le bord des routes ou des chemins. Les espèces appartenant au genre *Trifolium* sont, d'une manière générale, des plantes « pionnières » et vont donc jouer un rôle important dans la végétalisation des sols. Le système racinaire du trèfle blanc est en grande partie constitué de racines adventives situées principalement dans les couches superficielles du sol.

La plupart des études sur la croissance de *T. repens* dans les zones polluées par des métaux et métalloïdes sont centrées sur la fixation symbiotique de l'azote et seules quelques-unes se sont intéressées à l'absorption des métaux et métalloïdes (Obbard et Jones 2001 ; Ben Rebah et al., 2002 ; Broos et al., 2004 ; Bidar et al., 2009 ; Lopareva-Pohu et al., 2011 ; Liu et al., 2018). Ces études ont toutes démontré que *Trifolium repens* possède une tolérance vis-à-vis des éléments métalliques et métalloïdes, en acquérant des mécanismes de tolérance et de stratégies de défense.

Le trèfle présente différentes qualités utiles pour la phytostabilisation :

- (i) Ses racines sont les principaux organes de stockage des métaux et métalloïdes (Bidar et al., 2009).
- (ii) Il peut former une couverture végétale sur des sols fortement pollués en Cd, Pb et Zn (Bidar et al., 2009).
- (iii) Il est capable de fixer l'azote atmosphérique en s'associant symbiotiquement à des bactéries du genre *Rhizobium*, ce qui va permettre l'enrichissement et l'amélioration des sols d'un point de vue agronomique. Ce processus de fixation de l'azote entre la végétal et les bactéries est une relation symbiotique qui est bénéfique pour ces deux organismes. Cependant, même si les bactéries sont présentes dans le sol, l'association symbiotique n'est pas obligatoire : elle est régulée par la plante. Divers facteurs peuvent influencer la fixation, notamment la photosynthèse ou la croissance de la plante, la longueur de la saison de croissance, etc. De plus, le choix de ce genre végétal se fera en fonction du taux d'azote disponible dans le sol, ce n'est qu'en

condition limitante en azote que les rhizobiums vont induire la formation de nodosités au niveau racinaire et donc permettre la fixation et la réduction de l'azote atmosphérique en ammonium.

3.3.6. Intérêt de l'association d'espèces en phytomanagement

Les technosols miniers possèdent des caractéristiques particulières, de fortes teneurs et une grande diversité en polluants, ainsi qu'une spéciation complexe (*Van der Perk 2013 ; Zhao et al., 2015*). Il existe un lien entre la biodiversité et les services écosystémiques offerts par les couverts végétaux multispécifiques (*Faucon et al., 2017*). La diversité fonctionnelle et la complémentarité doivent être choisies de manière à favoriser les interactions positives entre les espèces et ainsi fournir des services écologiques (*Faucon et al., 2017*). Ainsi, une diversité accrue d'espèces végétales peut augmenter le rendement en biomasse pour une superficie de terre donnée (*Smith et al., 2008*).

Les herbacées, présentant des systèmes racinaires ramifiés, réduisent le ruissellement de surface et l'érosion éolienne. La plantation d'arbres, quant à elle, améliore la stabilisation physique des sols contre l'érosion hydrique et diminue la vitesse du vent et donc l'érosion éolienne. Desjardins *et al.* (2018) ont démontré une amélioration de la biomasse des différentes espèces (*Festuca arundinacea*, *Medicago sativa* L., *Salix miyabeana* « SX67 ») ainsi qu'une augmentation de l'accumulation des métaux et métalloïdes dans les parties racinaires des plantes étudiées. Ils ont également démontré une augmentation du taux d'azote dans *Festuca arundinacea* lorsqu'elle est associée à *Medicago sativa* L. L'efficacité du phytomanagement peut donc être améliorée par l'association d'espèces qui permet une augmentation de la production de biomasse (*Luo et al., 2017*).

3.4. Les essais sur site

La recherche dans le domaine des techniques de phytomanagement continue de progresser, comme l'indique la tendance à la hausse des publications entre 1993 et 2016 (*Gerhardt et al., 2017*). Cependant, il n'y a pas d'augmentation concomitante des brevets liés aux procédés de phytomanagement, ce qui suggère un investissement plus faible des acteurs économiques dans ce type de technologies.

Afin d'extrapoler les pratiques de phytomanagement du statut de technologies éprouvées à celui de pratique acceptée, des essais sur site apparaissent nécessaires. En effet les résultats obtenus en laboratoire, dans un environnement contrôlé, ne sont pas toujours comparables à ceux des essais sur site (*Gerhardt et al., 2017*). Les différents facteurs influençant le phytomanagement ne sont pas toujours contrôlés sur le terrain contrairement au laboratoire. La multiplication des essais à l'échelle de la parcelle semble être cruciale pour démontrer l'efficacité et la durabilité du phytomanagement en tant que méthode de remédiation des sols dégradés. Ainsi, en France, différents projets de recherche ont été mis en place pour démontrer *in-situ* le potentiel du phytomanagement, parmi lesquels nous pouvons citer : BIOFILTRE, Phytoagglo, PhytoDEMO, Phytoperf, Phytosed, Demophyto, PHYSAFIMM, PHYTOSTAB, Phytopop, PHYTENER, PROLIPHYTE. Cependant, tous les projets ne font pas toujours l'objet de valorisation sous forme d'articles scientifiques. Certains font l'objet d'un rapport public, de simples communications orales ou encore d'aucune communication.

Un récapitulatif des essais *in-situ* de procédés de phytostabilisation pour des sites pollués aux éléments métalliques et métalloïdes ayant fait l'objet de publications scientifiques a été réalisé par *Gerhardt et al. (2017)*, et mis à jour (Tableau 1.6).

Tableau 1.6 : Etudes de terrain de procédé de phytostabilisation menées entre 2010 et 2018, classées par ordre chronologique. Une brève description est donnée pour chaque étude en annexe 1 (adapté de *Gerhardt et al., 2017* et mis à jour).

Contaminants	Espèces de plantes	Amendements utilisés	Localisation du site	Durée de l'expérience	Références
Cd, Pb, Zn	<i>Zea Mays</i>	chaux et faible apport de N	Flandres, Belgique	25 semaines	Meers et al., 2010
Pb, Zn	<i>Pistacia lentiscus</i> , <i>Scrophularia canina subsp. bicolor</i>	compost, fertilisant chimique, zeolithe (seul ou combiné)	Sardaigne, Italie	2 ans	Bacchett et al., 2012
As, Cd, Cu, Mn, Pb, Zn	<i>Atriplex halinus</i> L.	compost, lisiers de porcs	Carthagène, Espagne	2 ans	Clemente et al., 2012
Cu, Mn, Pb, Zn	<i>Lolium perenne</i> L., <i>Festuca rubra</i> L., <i>Poa pratensis</i> L.	chaux dolomique, phosphate	delta, lolombie britannique, Canada	> 39 semaines	Pdmavathiamma et al., 2012

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Pb	<i>Thysanolaena maxima, Vetiveria, zizanioides</i>	Osmocote, fumier de vache, fertilisant organique	Distict de Thong Pha Phum, Province de Kanchanaburi, Thaïlande	1 an	Meeinkuirt et al., 2013
Cd, Cu, Pb, Zn	<i>Populus alba L. var. pyramidalis</i>		Shapopang, Province de Gansu, Chine	> à 7 ans	Hu et al., 2013
Cr	plantes indigènes poussant dans la région ont été récoltées, des graminées sélectionnées (3 espèces), des plantes à fleurs (2 espèces) et des arbres (10 espèces) ont été plantés.		Jajmau, Inde	4 mois, 1 an	Sinka et al., 2013
Pb, Zn	<i>Festuca rubra</i>	divers amendements organiques	Province de Biscay, Espagne	6 mois	Galende et al., 2014
As, Cd, Cu, Mn, Pb, Zn	<i>Bituminaria bituminosa</i>	compost mature fertilisé au NPK (fumier de vache et compost de moulin à olive)	Murcia, Espagne	2 ans	Pardo et al., 2014
Cd, Cr, Ni, Pb	<i>Cymbopogon martinii</i>	boue de tannerie	Lucknow, Inde	3 récoltes	Pandey et al., 2015
Cd, Pb, Zn	<i>Miscanthus x giganteus</i>		Nord de la France	3 ans	Pelfrène et al., 2015
Cd	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	fertilisants organiques, fumier de vache, fumier de cochon	District de Mae Sot, province de Tak, Thaïlande	9 mois	Meeinkuirt et al., 2016
Cd, Pb, Zn	<i>Pinus silvestris, Picea abies, Quercus robur</i>	boues d'épuration (faible teneur en métaux lourds et œufs de parasites)	région de Silesia, Pologne	2 ans	Placek et al., 2016
Pb, Zn	divers exludeurs natifs du site	endophyte consortium (5 isolats)	Biscay, Espagne	9 semaines	Burges et al., 2016
Cd	<i>Eucalyptus globules, Cicer arietinum</i>	EDTA	Guiyu, province de Guangdong, Chine	5 mois	Luo et al., 2016
As, Cd, Pb	<i>Pteris vittata, Sedum alfredii, Sugar cane, mulberry tree</i>	fertilisants (inorganiques et organiques)	comté de Huanjiang Maonan, Chine	2 ans	Wan et al., 2016

Chapitre I : Synthèse bibliographique

As, Pb, Zn, Cd, Cu, Ni	<i>Ericameria nauseosa</i> , <i>Quercus turbinella</i> , <i>Gutierrezia sarothrae</i> , <i>Salix</i> spp, <i>Juglans major</i> , <i>Populus fremontii</i>	compost	Comté de Yavapai, Arizona, Etats-Unis	4 ans	Gil-Loaiza et al., 2016
Fe, Cd, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn	<i>Salix</i> spp, <i>Populus nigra</i> L. ou <i>Agrostis capillaris</i> L.	compost	Coruña, Espagne	3 ans	Touceda-Gonzalez et al., 2017
As, Pb, Cd	<i>Arundo donax</i>	fertilisant organique et cendres volantes	Province du Hunan, Chine	150 jours	Liu et al., 2017
Cd, Pb, Zn	<i>Robinia pseudoacacia</i> , <i>Alnus glutinosa</i> , <i>Acer pseudoplatanus</i> , <i>Salix alba</i>	2 types de Cendres volantes de charbon	Nord de la France	11 ans	Labidi et al., 2017
Cu, Pb, Zn, Cd, As		chaux, compost	Los Maitenes, Chili	6 ans	Pardo et al., 2018
Pb, Zn, Cu, Mn, Cd	<i>Glycine max</i> , la rose arc-en-ciel, <i>Bassia scoparia</i>	biochar, engrais organique, paille de riz, ceramsite et micro-organismes (<i>M. Circinelloides</i>)	province de liaoning, Chine	105 jours	Li et al., 2019

Les résultats de ces études sont plutôt positifs sur la possibilité d'appliquer le phytomanagement *in situ* pour les nombreuses conditions répertoriées. Il est intéressant de noter que la plupart des études menées font appel à des amendements, montrant l'importance d'améliorer la qualité du sol pour permettre l'implantation des végétaux. Tous les essais font référence à une diminution de la phytodisponibilité des éléments métalliques et métalloïdes, ainsi qu'à une amélioration de l'état physiologique des plantes avec l'ajout d'amendements. De plus, la plupart des plantes utilisées montrent un bon potentiel de phytostabilisation. Ce tableau montre également que la majorité des études menées sur le terrain se font sur une durée relativement courte. Ces tests effectués sur des courtes périodes ne permettent pas d'avoir le recul nécessaire à la communauté scientifique pour démontrer l'efficacité à long terme d'un procédé de phytomanagement. Ceci peut s'expliquer par le mode de financement de tels projets, qui couvrent généralement une période de 3 à 5 ans.

Enfin, il est intéressant de noter que bien que la plupart des projets de phytomanagement montrent des résultats positifs, cette technologie demeure peu appliquée pour la gestion des sites pollués. En effet, les parties prenantes du secteur privé ne connaissent que très peu les avantages des techniques de phytomanagement.

4. Objectifs de la thèse

Ce projet de thèse s'inscrit dans le contexte de la gestion des sites pollués avec pour objectif majeur de définir une méthodologie de mise en œuvre et de suivi d'un procédé de phytomanagement par phytostabilisation aidée. Les connaissances acquises sur cette technologie se sont accrues ces dernières années, tant au niveau du choix des espèces végétales que des amendements ou du comportement des métaux et métalloïdes. Cependant, la plupart de ces connaissances ont été acquises en laboratoire et non pas sur le terrain. En effet, en 2015, sur environ 650 publications portant sur la phytoremédiation, seulement 45 traitaient d'essais sur site. Cependant, quelques travaux en situation *in situ*, ont démontré l'efficacité de cette stratégie. Ainsi, malgré une bonne connaissance des techniques de phytoremédiation, peu d'industriels du domaine des sites et sols pollués proposent cette alternative aux techniques de remédiation conventionnelles. Ceux qui ont utilisé cette approche, d'après Gerhardt *et al.* (2017), ne l'ont pas fait efficacement, car ils ont mis en place des végétaux sans avoir l'expertise nécessaire pour choisir des espèces végétales dont la croissance n'est pas affectée par la pollution, et ils n'ont pas suivi correctement dans le temps la chimie du sol à remédier. Le saut d'échelle ou d'extrapolation, du laboratoire au site, demeure un défi. A titre d'exemple, sur le site de Salsigne (projets Difpolmine puis Phytoperf de l'ADEME, Boisson *et al.*, 2011), des espèces végétales ainsi qu'un amendement avaient été sélectionnés avec soin, mais la mise en œuvre à l'échelle réelle du procédé de phytostabilisation a rencontré des difficultés en partie liées à la méthode de travail du sol et d'ensemencement à grande échelle. Ainsi, l'utilisation sur le terrain de cette technologie contraste avec son succès prouvé au laboratoire et son réel potentiel.

Le phytomanagement vise à une application, à terme, sur des sites pollués (miniers ou autre, exploitants public ou privé), présentant des contaminations polymétalliques étendues ou sur des topographies particulières, ne permettant pas la mise en œuvre des techniques de dépollution classiques à des coûts supportables (excavation des terres contaminées ou confinement).

Une méthodologie rapide à mettre en œuvre et facilement applicable sur des sites présentant des typologies diverses devra être déterminée. Pour cela, plusieurs verrous devront être levés.

La méthodologie à développer doit comprendre la sélection de tests de laboratoire susceptibles de fournir des informations pertinentes pour l'extrapolation du procédé sur site. En effet, après avoir caractérisé le site pollué et identifié les principales voies de transfert, il faudra mettre en place des tests simples et rapides pour déterminer le choix des amendements et des espèces végétales à utiliser. Ces tests devront permettre d'observer l'amélioration agronomique du

sol et d'évaluer le comportement des métaux et métalloïdes dans le sol et les plantes. Dans le cadre de la présente thèse, les tests de laboratoire sont couplés à un essai *in-situ*, ce qui permet d'étudier également l'évolution du sol, des amendements et des plantes au cours du temps en conditions réelles et ainsi d'évaluer la faisabilité d'un tel procédé sur le site retenu.

L'analyse de la bibliographie a mis en avant différents types d'amendements et d'espèces végétales possédant un fort potentiel pour des procédés de phytostabilisation aidée. Des travaux antérieurs ont permis notamment d'étudier le comportement du biochar en présence de pollutions polymétalliques et la nécessité de le combiner avec d'autres amendements pour améliorer la remédiation de sols. Elles ont également montré le potentiel du saule dans un contexte de phytostabilisation.

L'objectif général de la présente thèse était de développer une méthodologie de phytomanagement, du laboratoire au site (Figure 1.21). Cet objectif global a été décliné en plusieurs sous-objectifs :

1. **Maîtriser la connaissance du matériau et du site** à stabiliser (Chapitre II) : pour cela, il était nécessaire de caractériser le site et le technosol étudié et d'identifier les vecteurs de transferts de polluants.

2. **Optimiser, au laboratoire**, les paramètres de mise en œuvre sur site du procédé de phytostabilisation (Chapitre III) : cet objectif vise à améliorer le technosol d'un point de vue agronomique et phytotoxique, par l'ajout de différents amendements en mésocosme et de tester le développement de végétaux.

3. **Optimiser la mise en œuvre et la méthode de suivi sur site** (Chapitre IV) : les hypothèses basées sur les résultats en mésocosme doivent être testées *in situ*, afin de vérifier leur validité et éventuellement de proposer des améliorations à la méthodologie.

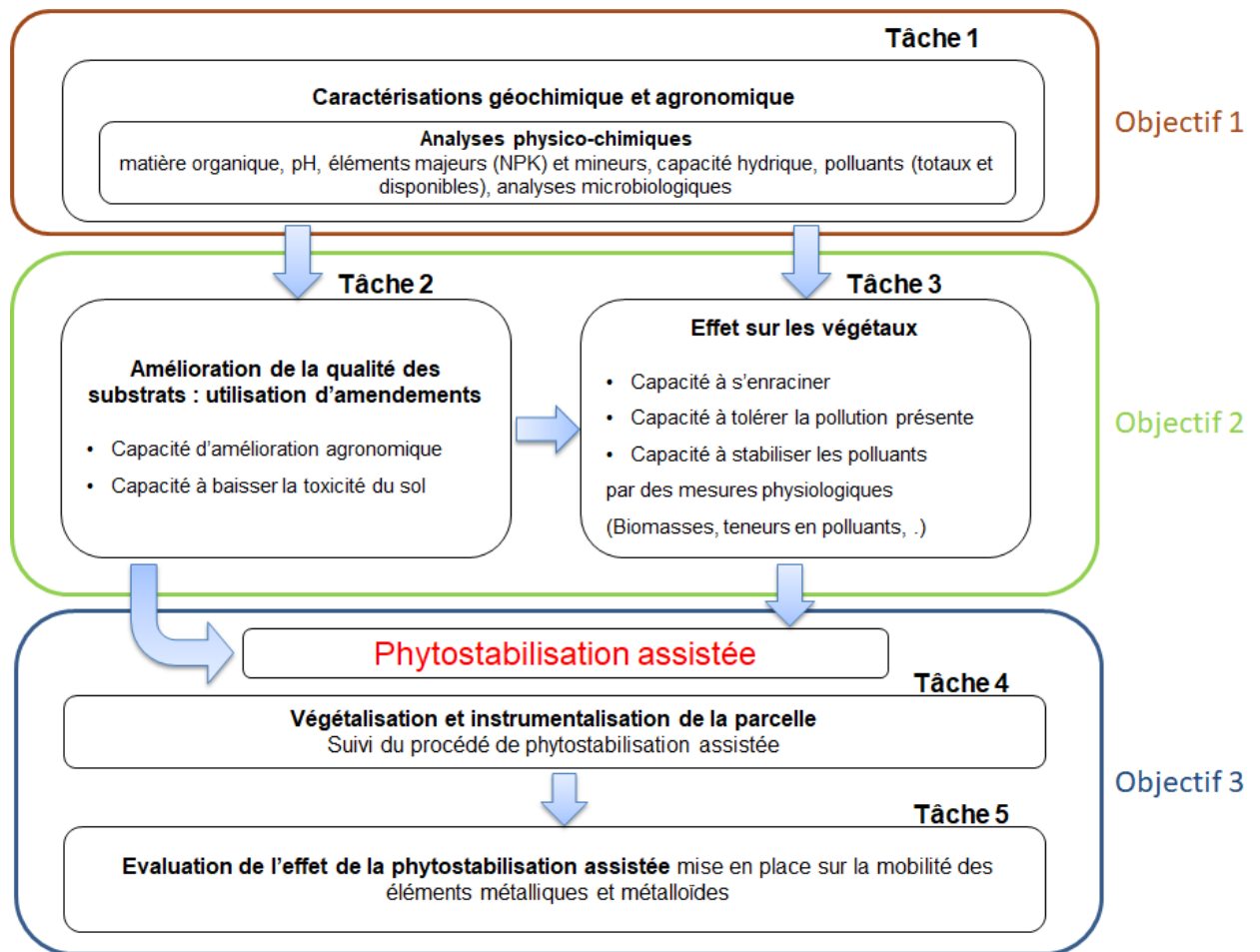


Figure 1.21 : Logigramme de l'enchainement des différentes tâches à accomplir pour la mise en place d'un procédé de phytostabilisation assistée.

**Chapitre II. Présentation du site
d'étude et caractérisation initiale de la
parcelle expérimentale**

Chapitre II. Présentation du site d'étude et caractérisation initiale de la parcelle expérimentale

1. Présentation du site d'étude

Le site d'étude est situé à Roure-les-Rosiers ; il correspond à une ancienne mine plombo-argentifère, localisée dans le Massif Central à proximité de Clermont-Ferrand, sur le territoire de la commune de Saint-Pierre-le-Chastel (63), au lieu-dit Mine des Rosiers (Figure 2.1).

La localisation de la zone d'étude, en coordonnées Lambert II, est :

↙ X : 638147.54

↘ Y : 2087962.79

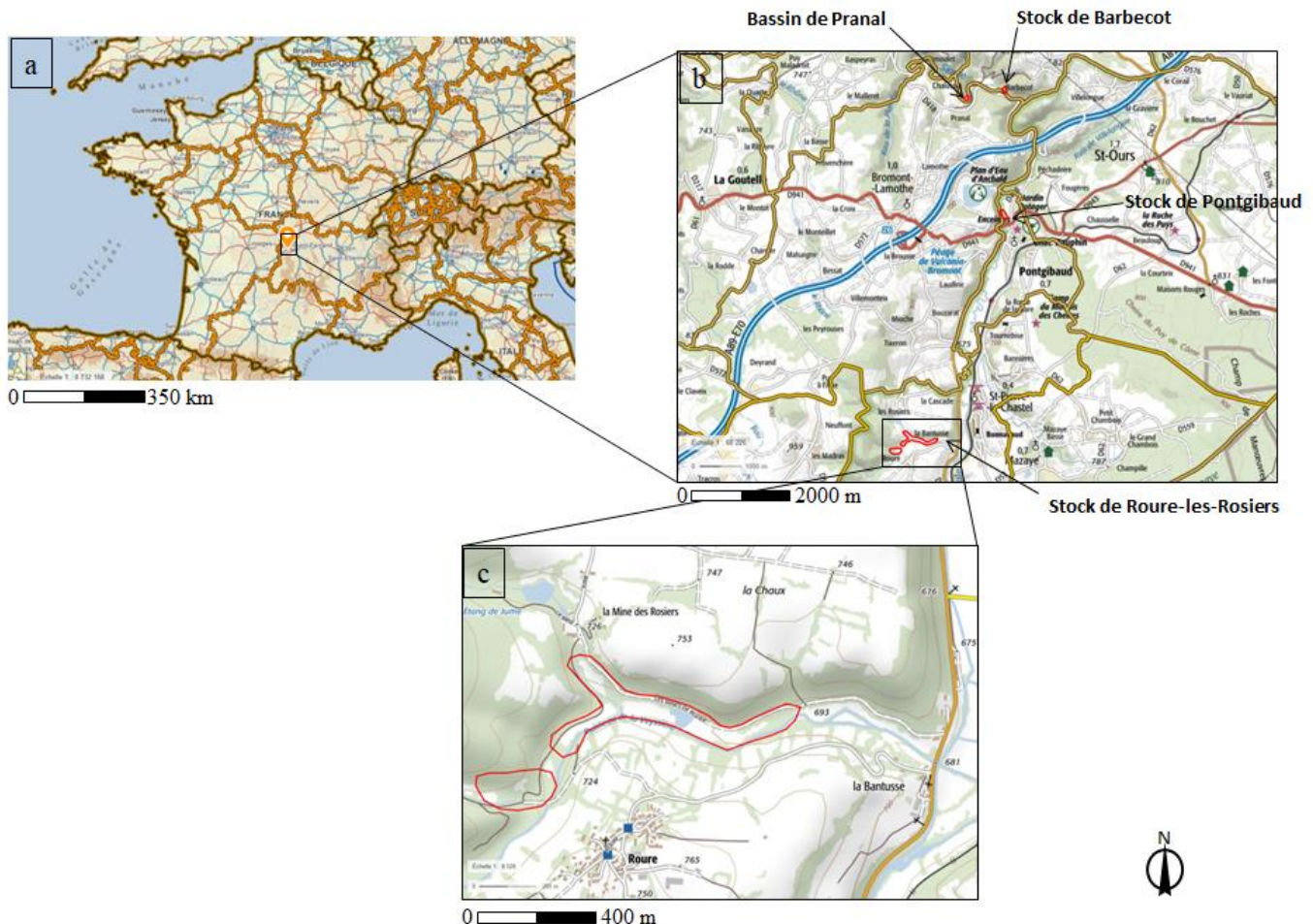


Figure 2.1 : localisation de l'ancienne mine de Roure-les-Rosiers. (a) localisation au niveau national, (b) localisation du district de Pontgibaud avec les différents stocks et (c) localisation au niveau local du stock de Roure-les-Rosiers (source Géoportail)

1.1. Historique du site d'étude

La mine de Roure-les-Rosiers fait partie d'un ensemble de mines qui constitue le district de Pontgibaud. Ce district, exploité depuis la période gallo-romaine, est connu pour avoir été au XIX^{ème} siècle, le principal centre de production de plomb argentifère et la principale mine métallique en France (Cottard 2009). Au total, ce sont plus de 50 000 tonnes de plomb et 100

Chapitre II. Présentation du site d'étude et caractérisation initiale de la parcelle expérimentale

tonnes d'argent qui ont été produits (*Bouladon et al., 1964*) et extraits sur près de 68 km de galeries et 3 km de puits, dont près de 80 % sur le secteur de Roure-les-Rosiers (*Cottard 2009*).

Il existait 4 unités de traitement du minerai afin de fournir en permanence la fonderie située à Pontgibaud qui a été fermée en 1905. La principale unité de traitement était associée à la fonderie ; les trois autres correspondaient à des laveries et étaient situées sur les sites d'extraction aux lieux-dits de Roure-les-Rosiers, de Pranal et de Barbecot.

Lors de la première exploitation au XIX^{ème} siècle, le traitement des minerais une fois excavés était mené uniquement par des procédés mécaniques avec différentes étapes de concassage, triage, broyage, débouillage et séparation gravimétrique sur tables. L'excavation du minerai a généré des stériles rocheux peu végétalisés du fait de leurs fortes pentes en terril qui ne représentent cependant pas d'impact significatif sur l'environnement, l'une des raisons est qu'ils contiennent peu de sulfures (*Cottard 2009*). Par contre, le traitement du minerai en lui-même a également entraîné la production de résidus fins de diverses natures, plus riches en sulfures et donc en métaux et métalloïdes, qui ont été stockés en bassin ou en terril. D'après les archives de la Direction des Mines, il semblerait qu'environ 30% de la galène étaient perdus dans les résidus, ce qui a conduit à partir de 1941 et jusqu'en 1947, à une deuxième exploitation des résidus abandonnés, par la COMIREX (Compagnie d'Exploitation et de Récupérations Minières). La COMIREX appartenait à la Société Européenne d'Etudes et d'Entreprises ; elle fermera définitivement en 1947 après avoir traité quelques centaines de tonnes de concentré de plomb. Lors de cette période, le traitement était réalisé de façon chimique par des procédés basés sur la flottation des sulfures utilisant de nombreux produits comme du carbonate de soude, du silicate de soude, du sulfure de sodium, de l'amylxanthate de potasse, de l'éthylamylxanthate de soude et de l'acide cresylique (*Cottard 2009*).

De par sa situation géographique et ses spécificités, le site de Roure-les-Rosiers est inclus dans une zone naturelle d'intérêt écologique faunistique et floristique de type I et II (ZNIEFF) (Figure 2.2), mais également dans une zone Natura 2000 ZSC « Gîtes de la Sioule » formant une zone spéciale de conservation (n°8302013) qui s'étend sur 731 ha sur le territoire du Puy de Dôme.

Chapitre II. Présentation du site d'étude et caractérisation initiale de la parcelle expérimentale

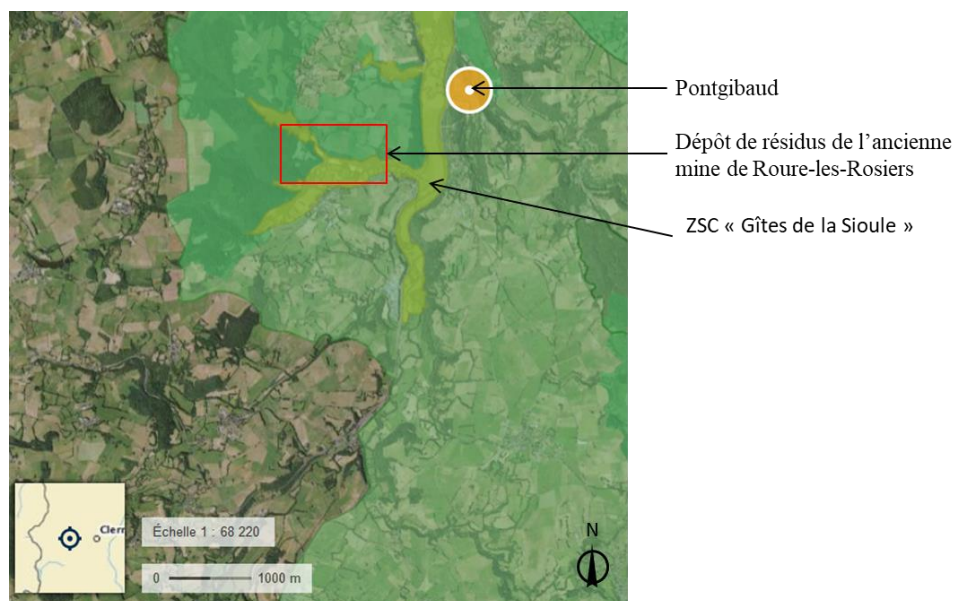


Figure 2.2 : localisation de la zone naturelle d'intérêt écologique faunistique et floristique de type I en vert et de la zone Natura 2000 ZSC « Gîtes de la Sioule » en jaune (source Géoportail)

Ce site Natura 2000 inclut huit habitats d'intérêt européen, représentant environ 23 % de la surface totale du site (166 ha). L'ancien site minier de Roure-les-Rosiers est situé en bordure de l'habitat 91E0 (habitat prioritaire). Il s'agit de forêts alluviales à *Alnus glutinosa* et *Fraxinus excelsior*, localisées en bordure de la Veyssière (Inventaire National du Patrimoine Naturel (INPN)).

Même si elles sont situées dans une zone rurale, des habitations relativement proches du site sont à signaler ; elles sont présentes à une centaine de mètres des résidus. De plus, un usage de loisirs du site avec des personnes pratiquant du motocross, du vélo, de la marche incluant la pratique de la baignade dans le lac bleu ou de pique-nique avait été constaté.

Au début du présent projet de thèse, les résidus s'étendaient sur une superficie de quinze hectares environ, représentant un volume total estimé de $84\,700\text{ m}^3$, et se répartissant sur plusieurs dizaines de parcelles appartenant à de multiples propriétaires privés (Figure 2.3).

Chapitre II. Présentation du site d'étude et caractérisation initiale de la parcelle expérimentale

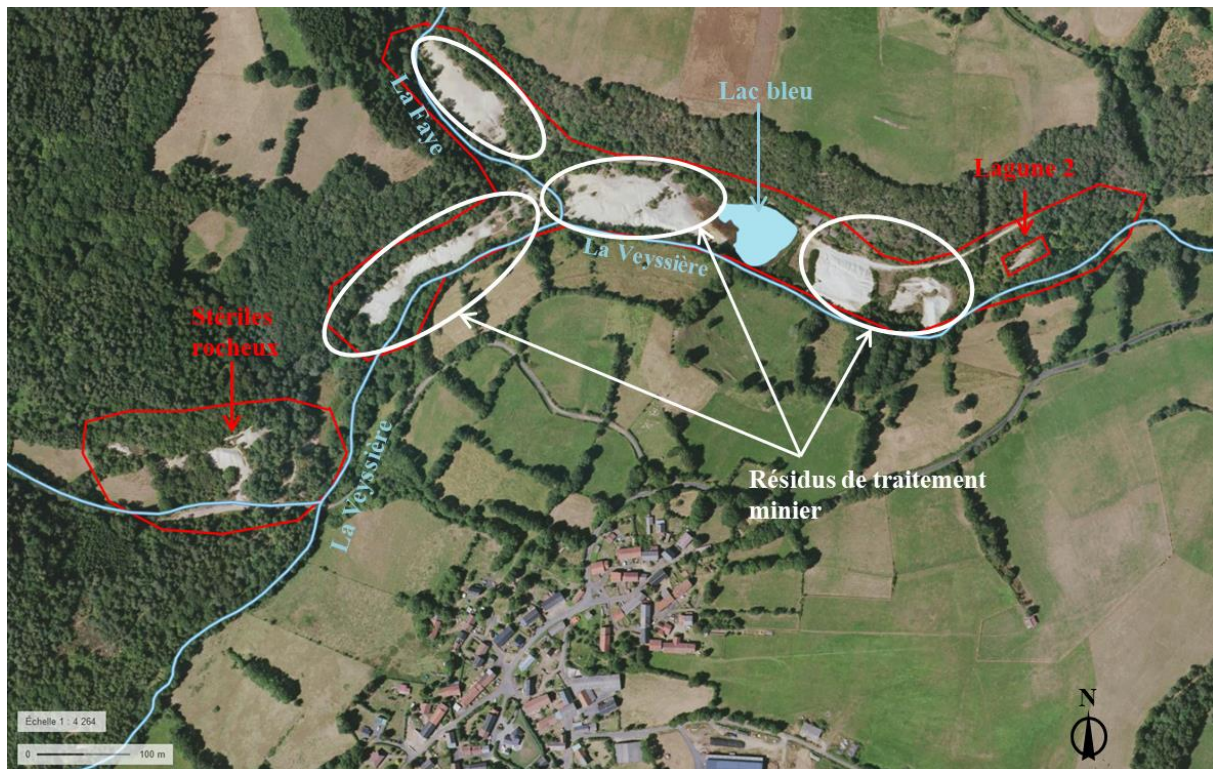


Figure 2.3 : Vue aérienne, datant de 2016, des dépôts de résidus de traitement de minerai de plomb argentifère de Roure-les-Rosiers (source : Géoportail)

Le site était constitué de plusieurs zones :

- Zone des résidus (entourés en blanc sur la Figure 2.3) qui étaient situés, pour trois d'entre eux, en rive gauche de la Veyssière ; le quatrième a été déposé au niveau du lit mineur de la Faye ce qui a eu pour conséquence de détourner le cours d'eau de son lit qui se trouvait implanté, en partie, au sein des résidus sur une longueur de 300 m ; le reste de son tracé se développant au sud du dépôt ;
- D'une retenue d'eau, appelée le "lac bleu", ancienne fosse d'exploitation de la mine créée par la COMIREX, représentant un volume d'environ $8\,870\text{ m}^3$ et d'une surface de $5\,200\text{ m}^2$, qui collectait les eaux de ruissellement d'un bassin versant de quatre hectares, et qui était en communication superficielle avec la Veyssière dans laquelle il se déversait par débordement en période de hautes eaux (Sabourault et al., 2015) ;
- D'un amas de stériles rocheux dont le volume était estimé à $3\,600\text{ m}^3$ au sud-ouest du site ;
- De trois anciennes lagunes partiellement en eau à l'est, en partie comblées et végétalisées, datant de l'exploitation minière. Ces trois lagunes ont une surface de $4\,500\text{ m}^2$. Elles sont constituées d'un bassin amont (lagune 1) de $1\,800\text{ m}^2$; d'un bassin intermédiaire (lagune 2) de $1\,130\text{ m}^2$ partiellement boisé avec une surface d'environ 400 m^2 dénuée de végétation, et un bassin aval (lagune 3) de $2\,100\text{ m}^2$ qui est le bassin le plus boisé ;
- D'anciens bâtiments d'exploitation du site dont certains sont délabrés.

Chapitre II. Présentation du site d'étude et caractérisation initiale de la parcelle expérimentale

Durant la période septembre 2017 - juin 2018 (incluant cette thèse), les résidus de traitement ont été réhabilités, par la réalisation d'un dépôt unique de résidus, par la vidange et le comblement du lac bleu. Ils ont ensuite été recouverts de terre végétale, puis un semis d'herbacées a été réalisé. Un fossé périphérique a été réalisé autour du dépôt unique. Seuls subsistent les lagunes (dont une est l'objet de cette thèse) en aval des résidus, le tas de stériles rocheux au sud-ouest et les bâtiments de l'ancienne laverie.

1.2.Contexte hydrogéologique

Le site de l'ancienne mine de Roure-les-Rosiers est situé dans la formation des volcans de la Chaîne des Puys et plus précisément dans le bassin de la Sioule qui pourrait être découpé en trois entités d'inégales importances et de géologies différentes (*Sabourault et al., 2015*).

Aux alentours de l'ancienne mine de Roure-les-Rosiers, entre la confluence de la Miouze et de l'Ebreuil, la zone est recoupée de nombreux filons de plomb argentifère (Saint-Pierre-le-Chastel, Pontgibaud) qui, avec les anciennes mines de Peschadoires et de Pranal, sont à l'origine des teneurs élevées en éléments métalliques et métalloïdes (plomb, arsenic, argent...) qui se retrouvent dans les sédiments de la rivière Sioule et les retenues en aval.

Le site de Roure-les-Rosiers est situé sur des roches métamorphiques. On observe aussi des alluvions et colluvions sur les bords de la Veyssière et de la Faye. Les coupes lithologiques de fouilles à la pelle (3 fouilles à la pelle de 4 m de profondeur dont l'emplacement est non précisé) et d'un sondage carotté (15 m de profondeur) ont indiqué que les résidus ont été déposés sur les matériaux en place, constitués de granites altérés (*Sabourault et al., 2015*).

1.3.Informations sur le fond géochimique naturel

Aucune levée précise du fond géochimique sur le site n'a à priori été réalisée à ce jour. Le fond géochimique naturel a donc été déterminé par des caractérisations superficielles avec un maillage non représentatif à l'aide d'un appareil à fluorescence X portable (NITON Lt792WY). Ces mesures ont été réalisées en 2008 par Geoderis (*Sabourault et al., 2015*) sur les stériles rocheux de Roure-les-Rosiers, nous permettant de nous approcher du fond géochimique local. On peut donc mettre en évidence une corrélation entre le fond géochimique naturel local élevé et les roches encaissantes métamorphiques des anciens filons minéralisés exploités (*Sabourault et al., 2015*). En effet, les concentrations du plomb et de l'arsenic sont très élevées dans ces encaissants, allant de 700 à 7000 mg.kg⁻¹ et de 220 à 1000 mg.kg⁻¹, respectivement.

Chapitre II. Présentation du site d'étude et caractérisation initiale de la parcelle expérimentale

1.4. Résidus de traitement de minerai de plomb argentifère

Les minéralisations du district de Pontgibaud sont complexes et leur composition est variable en fonction des gisements et de leur localisation. Ainsi, il faut retenir la présence de deux sulfures de fer fortement présents : la pyrite et la marcassite productrices de drainage minier acide (DMA), associées à l'arsénopyrite (FeAsS), source de l'arsenic dans l'environnement, et à la galène argentifère (PbS) qui était le minéral recherché et valorisé. Nous pouvons également retrouver de la blende (ZnS), de la chalcoppyrite (FeCuS_2), et surtout des sulfo-sels de cuivre (bornite) et de plomb (sulfo-arséniures et sulfo-antimoniures) avec des minéraux de bismuth. Ces sulfo-sels constituent d'autres sources d'arsenic pour le milieu récepteur. La gangue est constituée de quartz et barytine (origine du baryum décelé dans les résidus) avec localement de la sidérite (carbonate de fer (FeCO_3)) (Cottard 2009).

Les résidus de traitement correspondent à des sables de couleur blanchâtre à jaunâtre (Sabourault *et al.*, 2015). Ces derniers possèdent une composition minéralogique correspondant à des sables quartzo-feldspathiques composés d'une très faible proportion de sulfures résiduels qui n'a pas été récupérée lors de l'activité minière (initialement la galène, la sphalérite et l'arsénopyrite). Ces sulfures se sont transformés avec le temps, pour la plus grande partie, en sulfates (cas du plomb ou du zinc) et en hydroxydes de fer qui ont pu piéger certains polluants (cas de l'arsenic). Les ordres de grandeur de concentrations pour les deux principaux polluants, à savoir le plomb et l'arsenic, sont en moyenne proches de 1% pour Pb et 0,1% pour l'As.

2. Caractérisation initiale de la parcelle expérimentale

2.1. Présentation de la parcelle

Le choix de l'implantation de la parcelle expérimentale s'est porté sur la lagune 2, qui se trouve en aval hydraulique des terrils miniers aujourd'hui remaniés et recouverts de terre végétale. Elle fait partie de l'ancien système de lagunage, qui n'a pas été concerné par la réhabilitation du site (Figure 3.4). Cette lagune correspond au deuxième bassin de décantation situé en aval hydraulique des terrils miniers et de la lagune 1. Elle possède une surface d'environ 1130 m² avec une épaisseur de résidus miniers estimée à 1 m à l'aide d'une tarière manuelle.

Chapitre II. Présentation du site d'étude et caractérisation initiale de la parcelle expérimentale

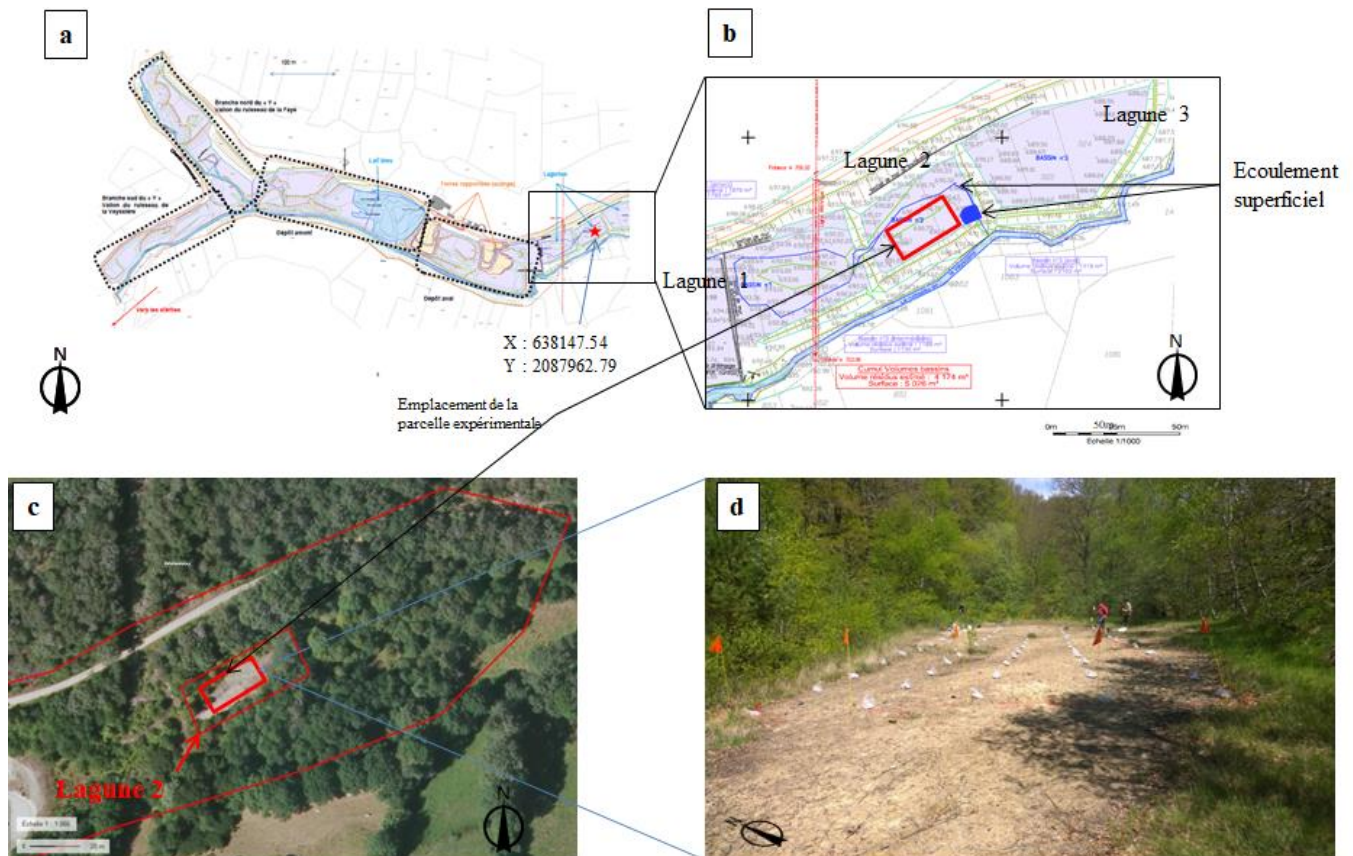


Figure 2.4 : Plan de l'ancien site minier de Roure-les-Rosiers (a) avec un zoom sur le plan des trois lagunes (b), une photo aérienne de la lagune 2 et emplacement de la parcelle expérimentale source Géoportail (c) et photo de la partie non végétalisée de la lagune 2 avec l'emplacement de la parcelle et le prélèvement d'échantillon (d)

Sur la photo aérienne et la photo au sol (Figure 2.4c, 2.4d), nous pouvons observer qu'une partie en périphérie de la lagune 2 se trouve végétalisée. Le choix de l'emplacement de la parcelle expérimentale s'est donc porté sur la partie non végétalisée. D'après les mesures de surface réalisées sur Géoportail, la partie non végétalisée est de forme ovoïde, et correspond à une surface de 550 m² environ.

2.2. Matériel et méthodes

Sur la zone non végétalisée de la lagune 2, une zone de 24 m de longueur par 10 m de largeur a été retenue. Une fois l'emplacement de la parcelle défini, un maillage de 2 m par 2 m sur une surface de 10 m par 20 m a été réalisé pour un relevé topographique relatif du sol à chaque intersection.

Un prélèvement d'environ 0,5 à 1 kg de technosol a été réalisé à la tarière manuelle, selon le maillage établi, sur une profondeur de 25 cm, ce qui correspond à 66 échantillons. Les échantillons frais ont été désagrégés à la main. Leur séchage a été réalisé à température ambiante au laboratoire. Ils ont ensuite été tamisés à 2 mm de façon à extraire les éléments grossiers potentiellement présents.

Ces prélèvements ont permis de mesurer les paramètres physico-chimiques du technosol de

Chapitre II. Présentation du site d'étude et caractérisation initiale de la parcelle expérimentale

la parcelle expérimentale : pH, conductivité électrique et concentrations (pseudo-totales) des éléments métalliques et métalloïdes présents.

En plus du maillage utilisé pour ces différentes mesures, un second maillage a été réalisé pour l'implantation de piézomètres. Ces derniers ont permis de relever la profondeur relative de la surface de la nappe d'eau hypodermique.

- Le relevé topographique du technosol a été réalisé par un théodolite (AL-24 Automatic Level) à partir d'un point fixe situé en aval de la parcelle expérimentale.
- Le relevé topographique de la surface de la nappe d'eau hypodermique a été réalisé *via* les piézomètres installés. Ainsi l'altitude relative du haut du piézomètre (H) et du technosol à son emplacement (h) a été mesurée par théodolite (AL-24 Automatic Level). Le niveau d'eau (P) a été mesuré par rapport au haut du piézomètre *via* une sonde piézométrique ; le niveau topographique relatif de la nappe d'eau (p) a pu être déterminé, par la soustraction suivante $p = P - (H - h)$ (Figure 2.5).

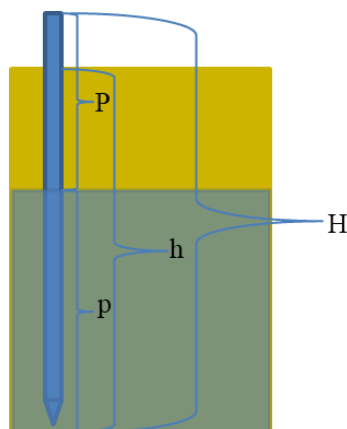


Figure 2.5 : schéma représentant les différentes mesures réalisées pour déterminer le niveau topographique relatif de la surface de la nappe d'eau hypodermique. H : hauteurs du piézomètre, h : hauteur du technosol, P profondeur de la nappe, p : niveau relatif de la nappe.

- Les valeurs de pH du technosol sont mesurées à l'aide d'une électrode de verre après calibration de l'appareil *via* la norme AFNOR NF T01-013. Ces mesures ont été effectuées dans l'eau ultra pure selon un ratio solide/solution = 1/5 avec un pH-mètre (Metler-Toledo, Serveur excellence).
- Les teneurs totales en métaux ont été déterminées en laboratoire *via* un appareil portable à fluorescence X (pXRF) XL3t800 NITON[®]. Les signaux ont été étalonnés à l'aide des analyses chimiques des échantillons de technosol au laboratoire par dissolution totale puis ICP-MS.

Les différentes données obtenues, qu'elles soient topographiques ou physico-chimiques, ont permis de réaliser une cartographie au niveau de la parcelle par extrapolation des données par krigeage (Surfer 8).

En plus de la mesure des paramètres physico-chimiques menée sur la totalité des échantillons

Chapitre II. Présentation du site d'étude et caractérisation initiale de la parcelle expérimentale

prélevés, un échantillon composite rassemblant les 66 échantillons a permis de réaliser des analyses complémentaires telles que la capacité d'échange cationique (CEC), le carbone organique total (C_{org}), le phosphore phytodisponible, le potassium phytodisponible, ainsi que la mobilité des éléments étudiés sur le technosol de Pontgibaud.

La mesure de la CEC a été effectuée selon la norme NF X 31-130 qui consiste à faire réagir une solution de chlorure de cobaltihexamine avec des solides.

Le carbone organique total et l'azote exprimés en %, ont été déterminés à l'aide d'un analyseur élémentaire Thermo Flash 2000. Les échantillons sont préalablement broyés à 125 μm et placés dans des cupules en étain avant d'être pyrolysés.

La disponibilité du plomb et de l'arsenic ont été déterminées par des extractions chimiques :

- soit par des extractions simples pour l'analyse de la phytodisponibilité des éléments essentiels (P et K), ainsi que du plomb et de l'arsenic. Ces dernières consistent à mettre en contact le sol à analyser avec une solution d'extraction de NH_4NO_3 à 1M selon un ratio liquide/solide de 1/10. Le mélange obtenu est agité durant 2 heures puis filtré, acidifié et enfin analysé par ICP-AES (ULTIMA 2, HORIBA, Labcompare, San Francisco, USA). NH_4NO_3 a été adopté comme norme allemande pour évaluer la phytodisponibilité des éléments métalliques et métalloïdes dans les sols.
- soit par des extractions séquentielles qui permettent de déterminer les phases minérales porteuses des éléments étudiés. Elles sont réalisées selon le protocole développé par le BCR (Community Bureau of Reference) et adapté par Pérez-Cid *et al.* en 1998. Ainsi, 0,5 g de technosol broyé est successivement attaqué par des réactifs de force croissante, respectivement : acide acétique 0,11 M (F1, Fraction 1), chlorure d'hydroxylamine 0,1 M ramené à pH 2 avec HNO_3 37% (F2), peroxyde d'hydrogène 30% et acétate d'ammonium 1 M ramené à pH 2 avec HNO_3 65% (F3). Les fractions ainsi définies correspondent respectivement à la fraction échangeable (F1), la fraction réductible (F2), la fraction oxydable (F3) et la fraction résiduelle. Les différentes fractions sont ensuite analysées après acidification par ICP-AES (ULTIMA 2, HORIBA, Labcompare, San Francisco, USA).

Le code d'évaluation des risques (RAC) (Pejman *et al.*, 2017 ; Zhang *et al.*, 2017 ; Kicińska *et al.*, 2019) est déterminé par l'addition des fractions F1 et F2 obtenues précédemment. Ainsi, si le RAC du métal ou métalloïde est inférieur à 1 %, il est considéré comme sans danger pour l'environnement ; entre 1 % et 10 % comme faiblement dangereux ; entre 11 % et 30 % comme moyennement dangereux ; entre 31 % et 50 % comme dangereux, et supérieur à 50 % comme très

Chapitre II. Présentation du site d'étude et caractérisation initiale de la parcelle expérimentale

dangereux pour l'environnement.

Les mesures de bioaccessibilité, mimant la possible assimilation dans le corps humain ont été effectuées selon la procédure du test unifié BARGE (UBM) (*Pascaud et al., 2014 ; Xia et al., 2016*). Ce test est réalisé en deux étapes : la première étape correspond à l'assimilation au niveau de l'estomac (phase gastrique). Elle fait appel à une solution mimant la composition de la salive et celle de l'estomac. Elle est préparée 24 heures à l'avance et agitée à 37 °C au moins 2 heures avant la mise en solution du technosol. Le pH de l'extractant (9 ml de solution salivaire + 13,5 ml de solution gastrique) est vérifié, et doit être compris entre des valeurs de 1,2 et 1,7. Cette phase débute par la mise en contact de la solution salivaire (9 ml) avec le technosol broyé et tamisé (à 200 µm) suivant un rapport solide/solution de 1/15 ; le mélange est ensuite mis sous agitation pendant 5 minutes. Vient ensuite l'ajout de la solution gastrique (13,5 ml) suivant le rapport solide/solution de 1/37,5. Le mélange est ensuite mis en rotation durant 1h à 37°C.

La deuxième étape (phase gastro-intestinale), correspond à la phase gastrique complétée par une phase intestinale. Ainsi, à la solution salivaire et stomacale sont rajoutées une solution duodénale (18 ml) et une solution biliaire (6 ml), qui ont également été préparées 24 heures à l'avance et mises en agitation à 37 °C au moins 2 heures avant la mise en contact. Le mélange est ensuite agité durant 4 heures à 37 °C ; le pH est vérifié et doit être compris entre 5,8 et 6,8 à la fin du temps imparti (Figure 2.6). Les solutions gastrique et gastro-intestinale obtenues sont alors centrifugées à 3000 g pendant 5 min, filtrées sur filtre nitrocellulose à 0,45µm, acidifiées et analysées à l'ICP-AES (ULTIMA 2, HORIBA, Labcompare, San Francisco, USA) pour rechercher la présence d'arsenic ou de plomb.

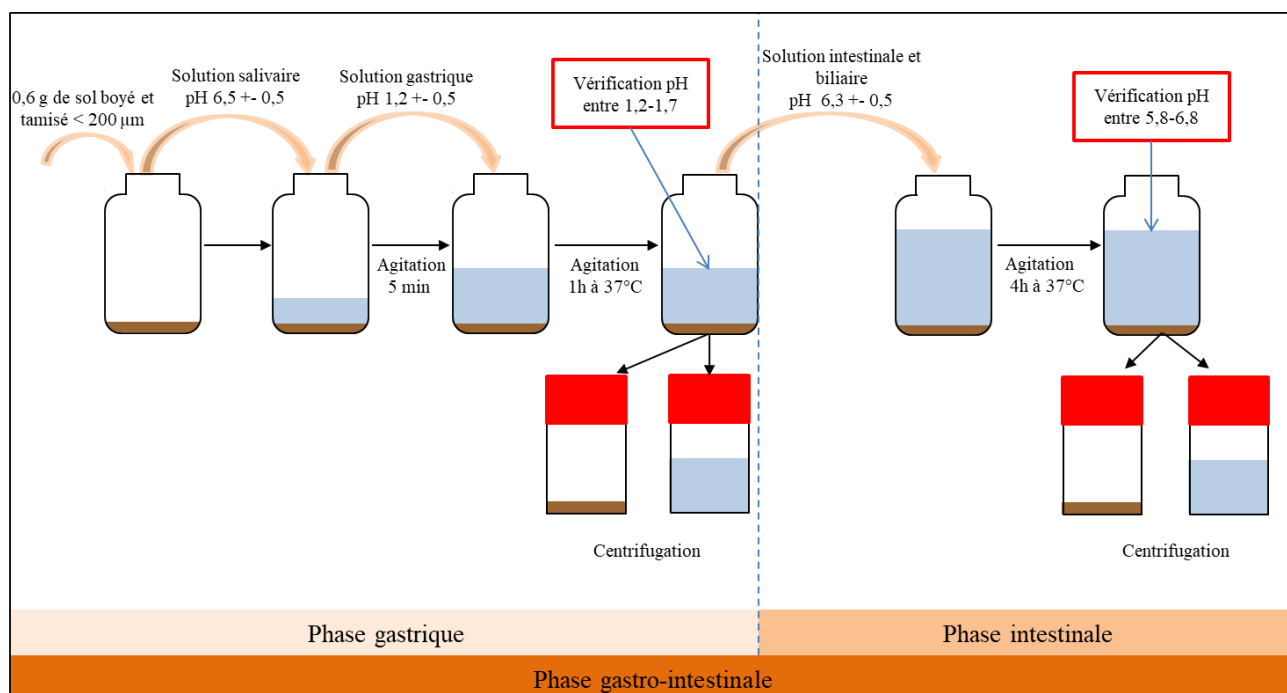


Figure 2.6 : Schéma du déroulement d'un test UBM (BARGE) via deux étapes d'extraction, correspondant à gauche à

Chapitre II. Présentation du site d'étude et caractérisation initiale de la parcelle expérimentale

la phase gastrique et à droite à la phase gastro-intestinale

L'analyse de l'eau porale, qui représente la fraction facilement mobilisable, a également été effectuée. Pour ce faire, il est nécessaire d'utiliser des RhizonsTM (bougies poreuses). Ces derniers sont placés selon un angle de 45° dans un pot rempli de technosol et arrosé à l'eau du robinet. Les prélèvements sont effectués *via* le RhizonTM 4 heures après saturation des pots en eau. L'échantillon est ensuite acidifié par 1 goutte d'HNO₃ à 65 %, puis analysé par ICP-AES (ULTIMA 2, HORIBA, Labcompare, San Francisco, USA) afin de déterminer les teneurs en arsenic et plomb.

L'analyse des phases porteuses est réalisée par :

- Diffraction aux rayons X, qui permet l'identification des minéraux présents dans des matériaux. Le principe repose sur la diffraction d'un faisceau incident monochromatique de rayons X par l'échantillon selon la loi de Bragg. Les paramètres d'analyse sont les suivants : angle 0° et 90° (2 θ) à une fréquence de balayage de 0,3° 2 θ cm⁻¹ en utilisant un diffractomètre INEL CPS120 équipé d'une anode Co (Co K α = 1,78897 Å).

2.3. Résultats

2.3.1. Descriptions topographiques de la parcelle et mesures du niveau de l'eau hypodermique

La cartographie de la topographie relative de la parcelle et du niveau de l'eau hypodermique intégré dans le plan de la lagune étudiée est représentée par la Figure 2.7.

Chapitre II. Présentation du site d'étude et caractérisation initiale de la parcelle expérimentale

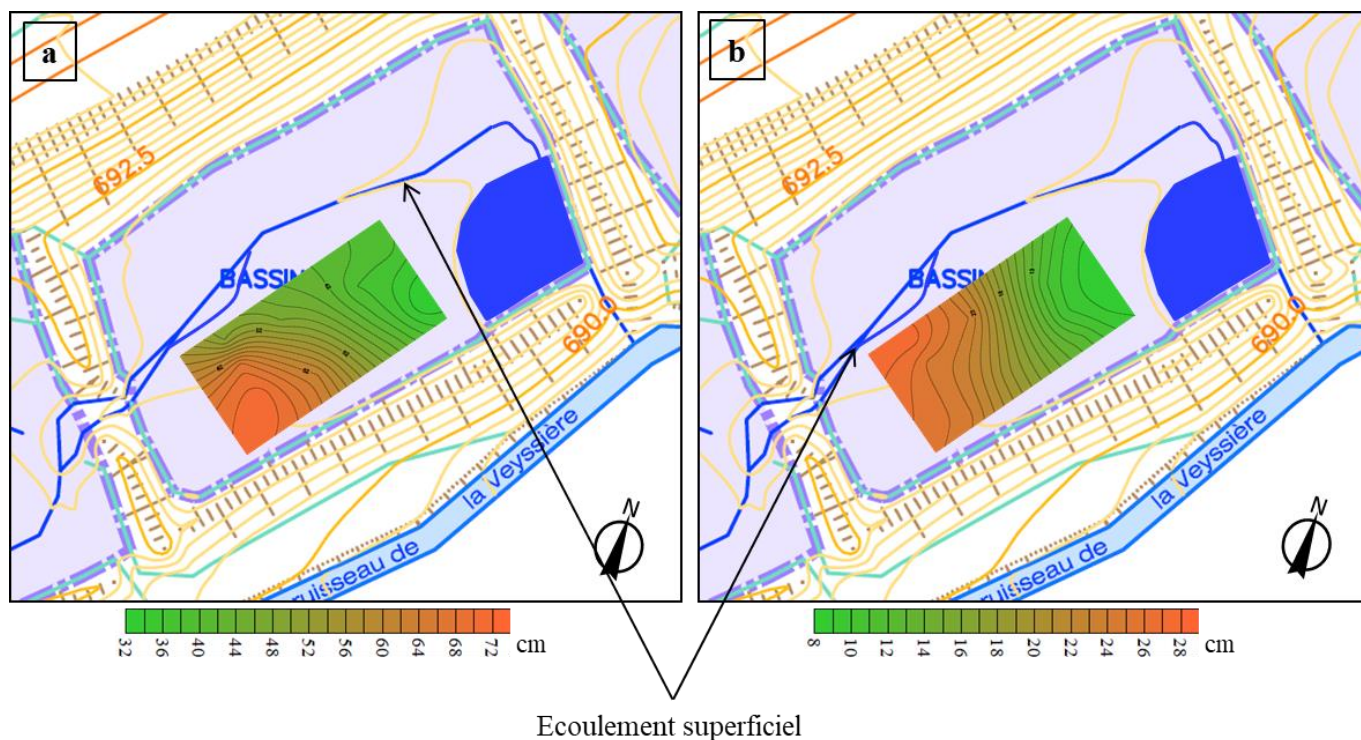


Figure 2.7 : Localisation et disposition de la parcelle expérimentale au sein de la lagune 2. Relevé topographique du technosol (a) et de la surface de la nappe d'eau hypodermique (b)

Comme observé sur la Figure 2.7a, l'exutoire de l'eau hypodermique de la parcelle se situe dans le coin « Est » de la lagune. De plus, le relevé topographique relatif du niveau de la nappe d'eau hypodermique (Figure 2.7b) montre une diminution de la profondeur de celle-ci de l'ouest vers l'est de la parcelle passant de 29 cm à 8 cm. Le sens d'écoulement de l'eau, qui est relativement homogène et rectiligne s'oriente du coin « Ouest » au coin « Est » de la parcelle. En période de hautes eaux (hiver), elle se situait à 31 cm sur la partie la plus élevée de la parcelle « Ouest » et à 9 cm dans la partie latérale de la parcelle proche de l'écoulement superficiel « Est », ce qui démontre le lien entre l'écoulement superficiel et l'eau hypodermique. Durant la période de basses eaux (été), la surface de la nappe d'eau hypodermique est descendue à 66 cm dans la partie haute de la parcelle « Ouest » et à 35 cm de profondeur à l'aval de la parcelle « Est ». Ceci peut s'expliquer par le fait que l'écoulement de surface possède un débit très faible. Il n'est donc pas en mesure d'alimenter l'eau hypodermique de ce côté de la lagune ; seul subsiste la nappe superficielle dans le coin « Est » de la lagune, qui rechargeait en eau la partie de la parcelle la plus proche.

2.3.2. Caractérisation agronomique de la parcelle expérimentale

La Figure 2.8 montre les répartitions spatiales des valeurs de pH (a) et de conductivité électriques (b) du technosol de la parcelle expérimentale.

Chapitre II. Présentation du site d'étude et caractérisation initiale de la parcelle expérimentale

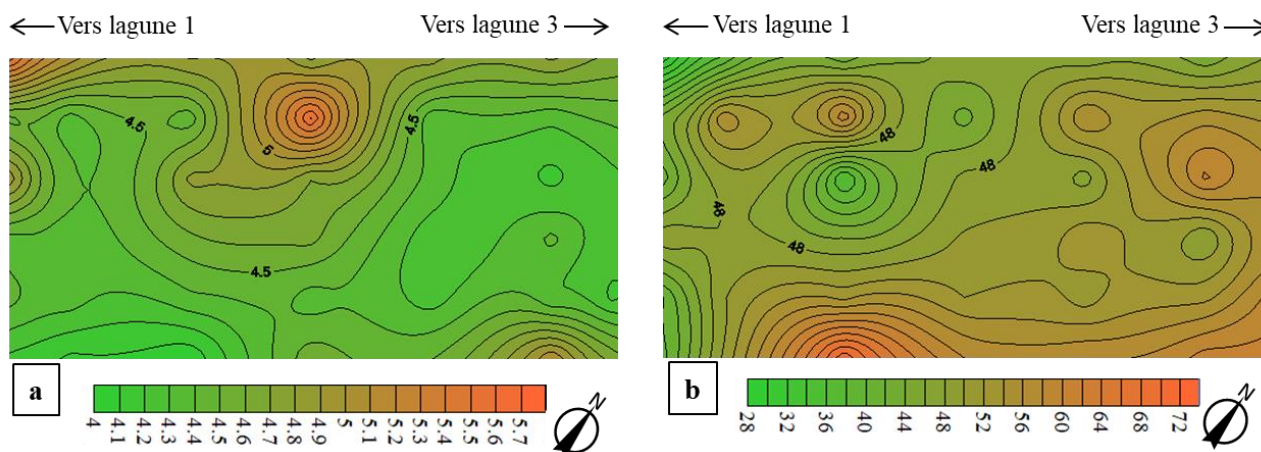


Figure 2.8 : Répartition spatiale, au niveau de la parcelle expérimentale, des valeurs de pH (a), de la conductivité électrique ($\mu\text{S.cm}^{-1}$) (b) à l'aide du logiciel surfer 8.

Nous pouvons observer un pH extrêmement acide (4) à moyennement acide (5,8) (Figure 2.8a), avec une répartition relativement homogène aux alentours de 4-4,5. Il faut toutefois noter des valeurs de pH plus élevées vers le centre de la parcelle mais également aux bords de celle-ci. Ceci était lié à une légère dépression où les feuilles des arbres alentours pouvaient s'accumuler après leur chute et donc entraîner une augmentation de la matière organique par la décomposition des feuilles des arbres. Cette accumulation de matière organique a également permis un début de végétalisation, mais qui est resté très limité.

La conductivité électrique était très faible, $52 \mu\text{S.cm}^{-1}$ en moyenne, avec une amplitude de 28 à $74 \mu\text{S.cm}^{-1}$. Cette mesure représente la quantité d'ions qui peuvent se dissoudre en présence d'eau. Ainsi, cette valeur a démontré une faible teneur et/ou mobilisation des minéraux du sol.

En complément des analyses réalisées sur la totalité des 66 échantillons de la parcelle, des mesures sur un échantillon composite ont permis de déterminer différents paramètres agronomiques répertoriés dans le Tableau 2.1.

Tableau 2.1: Paramètres agronomiques du technosol : mesures de la capacité d'échange cationique (CEC), du carbone organique total (C_{org}), de la matière organique (MO), de l'azote total (N_{tot}), du ratio $C_{\text{org}}/N_{\text{tot}}$ de la capacité au champ, et des éléments majeurs P et K ($n=3$)

Paramètres	Pontgibaud
CEC (cmol.kg^{-1})	$0,7 \pm 0,0$
C_{org} (%)	$0,27 \pm 0,01$
MO (%)	$0,47 \pm 0,04$
N_{tot} (%)	< LD
$C_{\text{org}}/N_{\text{tot}}$	ND
Capacité au champ (%)	$34 \pm 0,3$
[P] phytodisponible (mg.kg^{-1})	$1,1 \pm 0,1$
[P_2O_5] phytodisponible (mg.kg^{-1})	$2,4 \pm 0,3$
[K] phytodisponible (mg.kg^{-1})	$15,6 \pm 0,2$
[K_2O] phytodisponible (mg.kg^{-1})	$19,0 \pm 0,3$

LD : Limite de Détection, ND : Non Déterminé

Chapitre II. Présentation du site d'étude et caractérisation initiale de la parcelle expérimentale

La capacité d'échange cationique est une mesure permettant d'estimer le pouvoir d'un sol à retenir et échanger des cations. Il s'agit d'un indicateur relatif du potentiel de fertilité d'un sol. Les sols ayant une CEC élevée peuvent retenir davantage de cations. Ainsi, la valeur obtenue du technosol de la parcelle expérimentale montrait une CEC très faible, inférieure 1 cmol.kg^{-1} . Selon Doucet (2006), un sol sableux possédant une CEC inférieure à 4 cmol.kg^{-1} présente une fertilité très faible.

Le carbone organique est le principal constituant de la matière organique d'un sol ; il représente environ 50 % de cette dernière, viennent ensuite l'oxygène (40%) l'hydrogène (5%) et enfin le soufre (1%) (Rapport de la Chambre d'Agriculture du Poitou-Charentes, 2012). A partir de la teneur en carbone organique, nous pouvons évaluer la quantité de matière organique en multipliant la concentration en C_{org} par le facteur de Wolff qui est de 1,724. Ainsi, un taux de MO de 0,47% a été déterminé, ce qui est très inférieur au taux de matière organique minimal recommandé de 2,5% pour qu'un sol soit pourvu de façon satisfaisante en MO (Doucet 2006).

La teneur en azote total était inférieure à la limite de quantification de l'appareil de dosage ce qui a empêché de calculer le ratio $C_{\text{org}}/N_{\text{tot}}$.

La disponibilité du phosphore et du potassium, bien que ces 2 éléments aient été extraits avec une solution saline possédant un pouvoir extracteur supérieur à celui de l'eau, montre des valeurs inférieures aux teneurs considérées comme faibles dans le référentiel d'interprétation d'extraction à l'eau, observé dans Védie (2008). En effet, dans le référentiel, les teneurs extractibles à l'eau inférieures à $0,002 \text{ g par kg de sol}$ pour P, et inférieure à $0,02 \text{ g par kg de sol}$ pour K sont considérées comme des teneurs faibles. Ces valeurs montrent la faible qualité nutritive du technosol pour ces éléments. Enfin, il nous a été possible de déterminer les teneurs en P_2O_5 et K_2O et de les comparer au référentiel (Comifer 1993), celles-ci étant obtenues par extraction *via* des réactifs de type acétate ou oxalate d'ammonium, proche du réactif utilisé dans notre étude. Nos valeurs étaient inférieures à 80 mg.kg^{-1} pour P et 100 mg.kg^{-1} pour K, qui sont considérées comme les valeurs recommandées pour un sol correctement pourvu en phosphate et potasse, ce qui démontre de nouveau la pauvreté nutritive du technosol.

2.3.3. Caractérisation minéralogique

La minéralogie du technosol minier a été réalisée par diffraction des rayons X (DRX). Ceci permet de mettre en évidence les différentes phases porteuses des métaux et métalloïdes. Le diffractogramme est représenté sur la Figure 2.9.

Chapitre II. Présentation du site d'étude et caractérisation initiale de la parcelle expérimentale

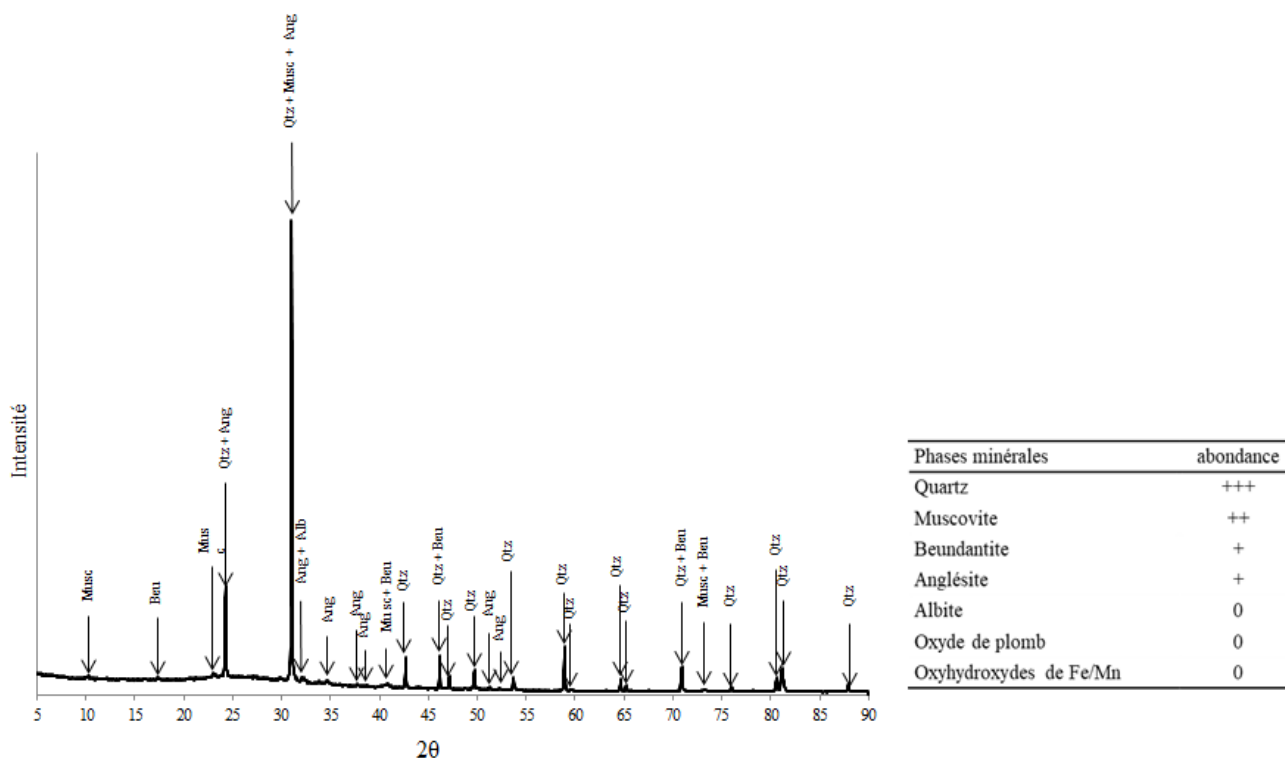


Figure 2.9 : Analyse DRX du technosol de Pontgibaud. Musc : muscovite ; Alb : albite ; Qtz : quartz ; Fds : feldspath ; Beu : beudantite ; Ang : anglesite et estimation de l'abondance relative des minéraux présents. (+++ très abondant, 0 : peu abondant)

Globalement, l'analyse DRX montre que le fond minéralogique du technosol de la parcelle correspond à des silicates comme le quartz (SiO_2) la muscovite et l'albite (Figure 2.9). Les analyses minéralogiques ont également révélé la présence majoritaire d'anglésite (PbSO_4), de beudantite ($\text{PbFe}_3(\text{AsO}_4)(\text{SO}_4)(\text{OH})_6$).

Finalement, les phases porteuses des éléments métalliques sont de nature diverses (oxydes, sulfures, sulfate...) ce qui peut engendrer une variété de comportements et de stabilités en fonction des polluants et des phases porteuses.

2.3.4. Répartition et comportement géochimiques des métaux et métalloïdes dans le technosol

La Figure 2.10 montre les répartitions spatiales des valeurs des concentrations en plomb (a) et arsenic (b) du technosol de la parcelle expérimentale.

Chapitre II. Présentation du site d'étude et caractérisation initiale de la parcelle expérimentale

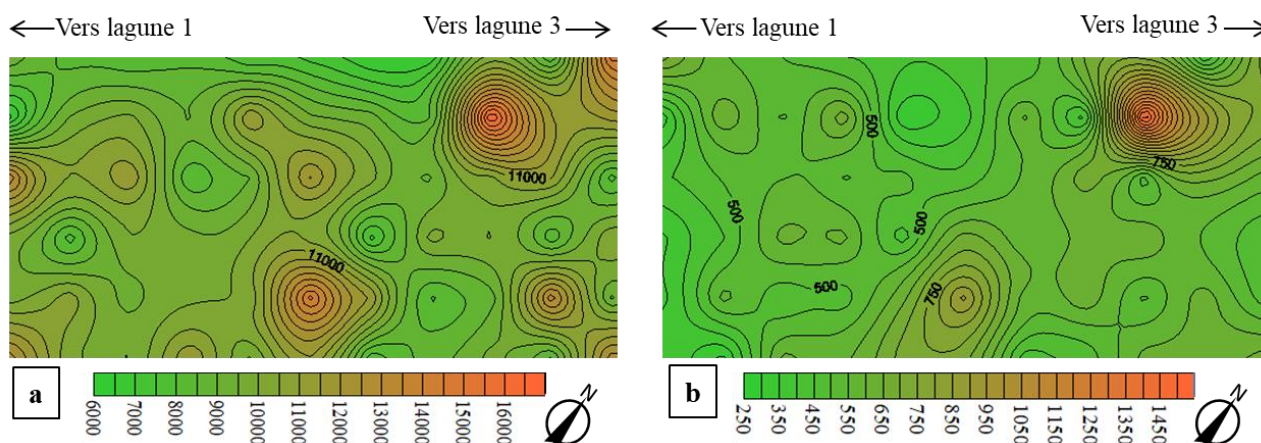


Figure 2.10 : Répartition spatiale, au niveau de la parcelle expérimentale, des valeurs de concentrations du plomb (mg.kg^{-1}) (a) et de concentrations de l'arsenic (mg.kg^{-1}) (b) à l'aide du logiciel surfer 8.

La répartition spatiale du plomb et de l'arsenic a permis de mettre en évidence deux « hot spots » sur la parcelle qui sont localisés au nord de la parcelle, au même endroit pour les deux éléments, allant jusqu'à $17\,000\text{ mg.kg}^{-1}$ pour le plomb et $1\,550\text{ mg.kg}^{-1}$ pour l'arsenic. Cependant la corrélation calculée entre l'As et le Pb reste relativement faible (0,56). Les concentrations moyennes retrouvées sur la parcelle pour le plomb et l'arsenic étaient de $9\,900\text{ mg.kg}^{-1}$ et 550 mg.kg^{-1} respectivement, mais avec de fortes hétérogénéités, comme le montrent les écart-types de $1\,900\text{ mg.kg}^{-1}$ pour le plomb et de 150 mg.kg^{-1} pour l'arsenic. Ces valeurs de concentrations se retrouvent être dans le fond géochimique local. Cependant, ce fond géochimique déterminé par Sabourault *et al.* (2015) a été mesuré sur des stériles rocheux de la mine pouvant posséder des teneurs en éléments métalliques et métalloïdes plus élevées, montrant des teneurs bien supérieures aux concentrations du fond pédogéochimique national qui sont comprises entre 9 et 50 mg.kg^{-1} pour le plomb et de 1 à 25 mg.kg^{-1} pour l'arsenic (Baize 1997).

Les différents résultats obtenus pour la mobilité, la phytodisponibilité et la bioaccessibilité du plomb et de l'arsenic par les différents protocoles utilisés permettent de mettre en lumière le comportement de ces deux éléments dans le technosol. L'ensemble des résultats est présenté dans le Tableau 2.2.

Tableau 2.2 : Concentrations de plomb et d'arsenic dans l'eau porale (mg.L^{-1}) et leurs fractions phytodisponibles (%) obtenues par extraction simple au NH_4NO_3 , fractions du plomb et de l'arsenic (%) obtenues par extraction séquentielle (BCR) et leurs risques environnementaux (RAC) dans le technosol de la parcelle expérimentale

Paramètres	Valeurs
[Pb] dans l'eau porale (mg.L^{-1})	$16,2 \pm 2,9$
Pb phytodisponible (%)	$28,6 \pm 1,2$
Pb fraction échangeable (F1) (%)	$14,5 \pm 0,2$
Pb fraction réductible (F2) (%)	$20,0 \pm 0,6$
Pb fraction oxydable (F3) (%)	$16,1 \pm 1,6$

Chapitre II. Présentation du site d'étude et caractérisation initiale de la parcelle expérimentale

Pb fraction résiduelle (F4) (%)	49,3±1,7
Pb RAC (%)	14,6±0,2
Pb bioaccessible phase gastrique (%)	72,8±1,1
Pb bioaccessible phase gastro-intestinale (%)	15,4±0,5
[As] dans l'eau porale (mg.L ⁻¹)	0,1±0,0
[As] phytodisponible (%)	0,3±0,0
As fraction échangeable (F1) (%)	0,9±0,0
As fraction réductible (F2) (%)	1,0±0,1
As fraction oxydable (F3) (%)	6,4±0,1
As fraction résiduelle (F4) (%)	91,7±0,1
As RAC (%)	0,9±0,0
As bioaccessible phase gastrique (%)	7,3±0,0
As bioaccessible phase gastro-intestinale (%)	14,0±3,7

Les concentrations mesurées du Pb et de l'As dans l'eau porale récupérée via des bougies poreuses montrent une forte mobilité du plomb et une très faible mobilité de l'arsenic. En effet, seuls quelques $\mu\text{g.L}^{-1}$ d'arsenic sont mesurés alors que sa concentration dans le technosol est de l'ordre de plusieurs centaines de milligrammes par kilogramme. Ces valeurs ne représentent, en aucun cas, la quantité totale disponible pour les végétaux. En effet, comme décrit dans le chapitre I (partie 5.3 les plantes en phytomanagement), les végétaux peuvent augmenter la disponibilité de divers éléments par la production d'exsudats racinaires. Nous pouvons toutefois voir que le plomb est relativement disponible pour les végétaux avec une quantité phytodisponible allant jusqu'à $2\,600\text{ mg.kg}^{-1}$. Pour l'arsenic, la fraction phytodisponible est relativement faible et ne représente que $1,65\text{ mg.kg}^{-1}$.

L'étude des différentes fractions, déterminées par le protocole du BCR modifié, permet de déduire la répartition chimique du plomb et de l'arsenic.

La fraction F1, qui correspond à la fraction échangeable, représente 14,5 % de la teneur totale du plomb et 0,9 % de l'arsenic total (Tableau 2.2). Des résultats proches ont été observés par Pascaud *et al.* (2014) avec < 1 % pour l'arsenic et entre 1 et 13% pour le plomb sur un échantillon provenant du même site d'étude.

La fraction correspondant aux oxyhydroxydes et sulfates de Fe/Mn peu cristallins est appelée fraction réductible (F2) ; elle représente 20 % de la teneur totale en plomb, ce qui semble similaire à celles retrouvées précédemment dans la littérature (entre 20 et 40 %) pour des technosols miniers (Álvarez-Valero *et al.* 2009 ; Pascaud *et al.*, 2014). En effet, l'anglésite, retrouvé par les analyses minéralogiques, est un sulfate de Pb. La quantité d'arsenic associée à la fraction F2, soit environ 1 % de la teneur totale, est faible par rapport aux données de la littérature qui font état d'environ 5 à 10 % (He 2007 ; Álvarez-Valero *et al.*, 2009).

La troisième fraction (F3) qui correspond à la matière organique ainsi qu'aux sulfures, montre que le plomb est associé pour environ 16 % à la fraction oxydable. Quant à la quantité d'arsenic qui

Chapitre II. Présentation du site d'étude et caractérisation initiale de la parcelle expérimentale

peut se retrouver liée à la fraction oxydable, soit environ 6,4 %, reste assez faible, même si elle est supérieure à celle trouvée par Pascaud *et al.* (2014) qui est comprise entre 1 et 4 %.

La fraction résiduelle est la plus stable ; puisque les métaux et métalloïdes sont liés fortement à la structure cristalline du sol. Les valeurs obtenues sont d'environ 49 % pour le Pb et 92 % pour l'As. Ces résultats indiquent que l'As est principalement concentré dans cette fraction qui est considérée comme stable à long terme avec un risque très faible de dispersion dans l'environnement. D'après la DRX (Figure 2.9), l'une des principales phases porteuses de As est la beudantite, qui est très stable dans les contextes miniers (Joussein *et al.*, 2013).

Les extractions BCR sont utilisées pour évaluer la mobilité potentiel par rapport à la compartimentation des métaux et métalloïdes. Ainsi, l'addition des fractions F1 et F2 permet de calculer le RAC (« Risk Assessment Code ») déterminant le risque potentiel de mobilité du plomb et de l'arsenic (Pejman *et al.*, 2017). Dans notre cas, l'arsenic ne présente pas de risque, le RAC étant inférieur à 1 contrairement au plomb qui représente un risque moyen avec des valeurs du RAC supérieures à 11 (Tableau 2.2).

Cela nous permet d'observer que les fractions potentiellement phytodisponibles du plomb seraient en partie liées aux oxyhydroxydes et sulfates de Fe/Mn peu cristallins alors que l'arsenic lié à ces oxyhydroxydes et sulfates de Fe/Mn ne serait que très peu disponible pour les plantes.

L'étude de la bioaccessibilité a permis de déterminer la fraction potentiellement accessible lors d'ingestion accidentelle par un être humain. Les résultats sont listés dans le tableau 2.2. Pour le plomb, nous pouvons voir qu'environ 75 % du plomb présent dans le technosol est potentiellement bioaccessible lors de la phase gastrique alors que la fraction bioaccessible chute drastiquement de près de 5 fois lors de la phase gastro-intestinale. Ces résultats sont légèrement supérieurs à la bioaccessibilité du plomb généralement observée dans la littérature pour les technosols miniers qui est de l'ordre de 60 % pour la phase gastrique et de 2 à 10 % pour la phase gastro-intestinale (Juhasz *et al.*, 2011 ; Pascaud *et al.*, 2014). Enfin, en comparant la proportion bioaccessible de plomb extrait lors de la phase gastrique, avec les extractions séquentielles du protocole BCR, nous pouvons observer que celle-ci est supérieure au cumul des fraction F1, F2 et F3 du protocole BCR.

L'arsenic a un comportement différent de celui du plomb. En effet, sa quantité bioaccessible a tendance à augmenter entre la phase gastrique et la phase gastro-intestinale en raison de l'augmentation du pH entre ces deux phases, ce qui est le cas ici. Le pourcentage d'As bioaccessible est resté relativement faible, ce qui tend à montrer que les solutions digestives n'attaquent pas la fraction résiduelle. Cela est en accord avec les résultats des études minéralogiques et du BCR : la beudantite est en effet très stable (Joussein *et al.*, 2013). Les variations entre les phases gastriques et

Chapitre II. Présentation du site d'étude et caractérisation initiale de la parcelle expérimentale

les phases gastro-intestinales peuvent s'expliquer par un effet pH (cf. chapitre 1). Ainsi, quand le pH augmente, la mobilité de l'arsenic va croître, cette hausse de la mobilité étant typique de l'arsenic adsorbé sur les oxydes.

2.3.5. Inventaire floristique de la lagune

Au début de cette thèse, en juin 2016, un inventaire floristique a été réalisé en bordure de l'emplacement de la parcelle expérimentale. Après identification des végétaux, leurs parties aériennes ont été séchées, broyées puis minéralisées afin de déterminer par ICP-AES (ULTIMA 2, HORIBA, Labcompare, San Francisco, USA) leurs teneurs moyennes en Pb et As. Les résultats obtenus sont listés dans le Tableau 2.3.

Tableau 2.3 : Inventaire floristique de la lagune avec les concentrations de plomb et d'arsenic dans les parties aériennes des végétaux, et le facteur de bioaccumulation (BAC) (rapport entre la concentration dans la plante et la concentration dans le technosol). BAC < 0,01 plante non accumulatrice, 0,01 < BAC < 0,1 plante peu accumulatrice, 0,1 < BAC < 1 plante modérément accumulatrice, BAC > 1 plante fortement accumulatrice. En gras les facteurs de bioaccumulation inférieur à 0,01.

Concentrations en métaux et métalloïdes dans les parties aériennes (mg.kg ⁻¹)					Facteur de bioaccumulation	
Espèces	Familles	Noms usuels	As	Pb	As	Pb
<i>Acer pseudoplatanus L.</i>	<i>Aceraceae</i>	Erable sycomore	19,8	73,0	0,024	0,006
<i>Achillea millefolium L.</i>	<i>Asteraceae</i>	Achillée millefeuille	6,5	434,4	0,008	0,036
<i>Agrostis capillaris L.</i>	<i>Poaceae</i>	Agrostide capillaire	0,0	57,5	0,000	0,005
<i>Agrostis stolonifera L.</i>	<i>Poaceae</i>	Agrostide stolonifère	0,0	129,9	0,000	0,011
<i>Athyrium filix-femina L.</i>	<i>Dryopteridaceae</i>	Fougère femelle	0,0	33,8	0,000	0,003
<i>Aulus glutinosa L.</i>	<i>Betulaceae</i>	Aulne glutineux	48,4	526,4	0,059	0,044
<i>Betula pendula Roth</i>	<i>Betulaceae</i>	Bouleau blanc	43,2	310,9	0,052	0,026
<i>Corylus avellana L.</i>	<i>Betulaceae</i>	Noisetier commun	0,0	468,4	0,000	0,039
<i>Crataegus monogyna L.</i>	<i>Rosaceae</i>	Aubépine mongyne	34,1	686,2	0,041	0,057
<i>Cytisus scoparius</i>	<i>Fabaceae</i>	Genêt à balais	0,0	126,7	0,000	0,011
<i>Epilobium parviflorum Schreb</i>	<i>Onagraceae</i>	Epilobe	0,0	10,3	0,000	0,001
<i>Fraxinus excelsior</i>	<i>Oleaceae</i>	Frêne élevé	23,8	347,1	0,029	0,029
<i>Geranium robertianum L.</i>	<i>Geraniaceae</i>	Géranium herbe à Robert	49,8	547,3	0,060	0,045
<i>Holcus lanatus L.</i>	<i>Poaceae</i>	Houlque laineuse	2,1	168,1	0,003	0,013
<i>Juncus effusus L.</i>	<i>Juncaceae</i>	Jonc épars	0,0	263,1	0,000	0,022
<i>Luzula sylvatica (Huds) Gaudin</i>	<i>Juncaceae</i>	Grande luzule	0,0	86,2	0,000	0,007
<i>Pinus sylvestris L.</i>	<i>Pinaceae</i>	Pin sylvestre	0,0	34,5	0,000	0,003
<i>Quercus robur L.</i>	<i>Fagaceae</i>	Chêne pédonculé	5,1	98,7	0,006	0,008
<i>Salix sp</i>	<i>Salicaceae</i>	Saule	3,8	49,9	0,005	0,004

Cet inventaire a permis de montrer la variété des espèces végétales présentes en bordure de la lagune, sur des sols composés de résidus miniers en profondeur et d'un substrat organique en surface. L'ensemble de ces végétaux a permis la mise en place d'une base de données d'espèces potentiellement utilisables en phytomangement dans des études complémentaires à cette thèse. Toutes les espèces qui possèdent des facteurs de bioconcentration pour l'arsenic et le plomb

Chapitre II. Présentation du site d'étude et caractérisation initiale de la parcelle expérimentale

indiqués en gras dans le tableau 2.3 pourraient se révéler intéressantes. En effet, les espèces suivantes : *Agrostis capillaire*, Chêne pédonculé, *Epilobe*, Fougère femelle, Grande luzule, Pin sylvestre et Saule montrent des concentrations en Pb et As dans les parties aériennes très faibles compte tenu de la concentration en Pb et As du substrat sur lequel elles poussent. Ces végétaux peuvent être assimilés à des plantes non accumulatrices envers l'arsenic et/ou le plomb. Cette caractéristique est importante car elle permettrait de végétaliser des sites pollués et d'utiliser la biomasse produite sans exportation des polluants.

Conclusion au chapitre II

Cette 1ère phase du travail avait pour but d'acquérir des données sur le matériau initial de la parcelle. Cette étude a révélé les principales caractéristiques de ce technosol : son acidité, une teneur élevée en Pb et en As, une mobilité relativement élevée du Pb, et une faible qualité agronomique. Les résultats obtenus sont donc en accord avec l'observation faite de l'absence de végétation retrouvée à l'emplacement de la parcelle expérimentale. Globalement, l'étude des paramètres physico-chimiques de la parcelle expérimentale a permis de mettre en évidence les possibles impacts environnementaux du technosol minier, essentiellement pollué en plomb et arsenic. De plus, les diverses extractions chimiques réalisées ont révélé que la teneur totale en As et Pb n'était qu'en partie potentiellement disponible pour les végétaux. Les résultats de l'extraction BCR montrent que l'As est principalement associé à des minéraux stables dans la fraction résiduelle, alors que le Pb est réparti de manière assez uniforme dans les différentes fractions du sol. Le risque potentiel pour la santé induit par l'ingestion de particules solides, évalué à l'aide des valeurs mesurées de bioaccessibilité des métaux et métalloïdes, est en parfait accord avec l'analyse de spéciation. Le Pb est relativement bioaccessible comparativement à l'As. L'ensemble de ces résultats sera pris en compte pour les étapes ultérieures du programme de recherche visant à réduire le transfert des polluants en contexte de phytomanagement.

**Chapitre III : Etudes préalables
à la mise en place d'un procédé
de phytostabilisation aidé *in*
situ : expériences en mésocosme**

Introduction au chapitre III

Dans le chapitre précédent, la caractérisation du technosol, aussi bien d'un point de vue agronomique que phytotoxique, nous a montré qu'il était nécessaire d'améliorer ses caractéristiques agronomiques et de diminuer sa toxicité afin de permettre une végétalisation jusque-là absente.

Notre choix s'est porté sur l'ajout d'amendements. En effet, des études ont montré que l'utilisation d'amendements organiques et inorganiques pouvait favoriser l'immobilisation des éléments métalliques et métalloïdes et apporter les éléments nutritifs nécessaires au développement des espèces végétales cultivées (Pérez-López *et al.*, 2008 ; El Amari *et al.*, 2014 ; Nejeschlebová *et al.*, 2015 ; Pascaud *et al.*, 2015 ; Cundy *et al.*, 2013, 2016). Cette stratégie de sélection des amendements et choix des espèces végétales doit être menée en amont afin d'assurer la réussite d'un projet de phytomanagement pour remédier un site pollué.

Cette stratégie dans notre cas a consisté à :

- Evaluer l'influence de plusieurs amendements organiques et inorganiques sur la phytodisponibilité de l'As et du Pb et sur l'amélioration agronomique du technosol. Ce travail a été valorisé sous forme d'un article scientifique publié dans le journal *CLEAN, Soil, Air, Water* (DOI: 10.1002/clen.201800220).
- Etudier la capacité du trèfle (*Trifolium repens*) à établir une couverture végétale sur le technosol de Pontgibaud différemment amendé et de mesurer la bioaccessibilité (SBET) des éléments As et Pb dans le technosol ainsi que dans les parties aériennes du trèfle. Ce travail rédigé sous forme d'article scientifique est actuellement proposé au journal *Ecotoxicology and Environmental Safety* pour publication le 4 janvier 2019, EES-19-21.
- Etudier l'effet du biochar ajouté au technosol de Pontgibaud sur la capacité de *Salix viminalis* et de *Trifolium repens* à se développer tout en diminuant la mobilité de l'arsenic et du plomb. Ce travail a également été rédigé sous la forme d'un article scientifique à soumettre à *Plant and soil*.
- Finaliser l'optimisation des combinaisons d'amendements par apport de sulfate de Fer afin de contrôler la mobilité de l'arsenic. Les résultats obtenus pour cette partie, sont présentés en fin de chapitre.

1. Matériel et Méthodes

Ce matériel et méthodes regroupe les protocoles expérimentaux communs aux trois projets d'articles développés dans les paragraphes 2 à 4 du chapitre III. Cela concerne : (1) la mesure des concentrations pseudo-totales et des concentrations phytodisponibles des éléments métalliques et métalloïdes du technosol étudié, (2) la caractérisation de l'eau porale (pH, conductivité électrique, carbone organique dissous et concentrations en métaux et métalloïdes), (3) la mesure de la masse sèche et des concentrations en As et Pb dans les racines et parties aériennes des végétaux étudiés. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyennes $\pm$ erreur-standard et ont tous été traités statistiquement à l'aide du logiciel statistique R version 3.1.2 (R Development Core Team, 2009). Le niveau de signification a été fixé à ($P < 0,05$).

1.1. Concentrations pseudo-totales et phytodisponibles de l'As et du Pb dans le technosol de Pontgibaud

Les concentrations pseudo-totales en As et Pb ont été déterminées par traitement à l'eau régale (*Zhang et Selim 2008*) avec un rapport solide / liquide de 1/45, soit de 0,2 g de sol pour 9 mL d'eau régale (HNO_3 (65 %) : HCl (37 %), 1:3 v/v). Le programme de digestion consistait en une augmentation graduelle de la température pour atteindre 180 °C en 15 minutes, une étape de digestion de 15 minutes à 180 °C suivie d'une étape de refroidissement de 15 minutes. Les échantillons ainsi minéralisés ont ensuite été ramenés à un volume de 50 mL avec de l'eau ultra-pure ($18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$) puis filtrés sur une membrane de nitrocellulose à 0,45 μm .

La fraction phytodisponible en As et Pb dans les technosols étudiés a été obtenue en suivant les protocoles développés par *Qasim et al.* (2015) et *Forján et al.* (2018), par utilisation de deux extractants, soit du CaCl_2 ou du NH_4NO_3 .

Les concentrations en As et Pb ont été déterminées par ICP-AES (ULTIMA 2, HORIBA, Labcompare, San Francisco, USA).

1.2. Analyse de l'eau interstitielle du sol

L'eau interstitielle du sol (SPW) a été recueillie à l'aide de seringues et de bougies poreuses (Rhizon) (modèle MOM, Rhizosphere Research Products, Wageningen, Pays-Bas), 4 heures après saturation des sols avec de l'eau (*Cattani et al.*, 2006).

L'eau interstitielle ainsi collectée a été utilisée directement pour la mesure : (1) du pH (pH-mètre, FE20/EL20, Mettler-Toledo AG 2007), (2) de la conductivité électrique (CE)

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

(multimètre, WTW Multi 1970i, GEOTECH, Denver, Colorado) et (3) du carbone organique dissous (COD) (Teckmar-Dohrman Phoenix 8000 TOC). Les concentrations en As et Pb ont été déterminées par ICP-AES (ULTIMA 2, HORIBA, Labcompare, San Francisco, USA) après acidification, selon Bart *et al.* (2016).

1.3. Analyses des végétaux

A la fin de chaque expérimentation, les végétaux étudiés ont été prélevés et séparés afin d'analyser de façon individuelle chaque organe. Les différents échantillons ont été rincés à l'aide d'eau déionisée puis séchés à 40 °C pendant 72 h avant d'en mesurer la biomasse sèche. La matière sèche obtenue a ensuite été broyée puis minéralisée et enfin les teneurs en As et Pb ont été déterminées suivant le même protocole mis en place pour l'analyse des métaux et metalloïdes dans les sols étudiés (cf paragraphe 2.2).

2. Effet de différents amendements sur la phytotoxicité et la phytodisponibilité du Pb et de l'As dans le technosol de Pontgibaud

Cette partie expose les résultats du phytotest mené en mésocosme sur le choix des amendements à apporter au technosol de Pontgibaud pour en diminuer les teneurs en As et Pb dans les eaux porales et favoriser le développement de végétaux (article accepté par la revue CLEAN, Soil, Air, Water) "Effect of biochar and amendments on Pb and As phytotoxicity and phytoavailability in a technosol ».

2.1. Résumé de l'article

La phytostabilisation assistée a été proposée comme un outil prometteur pour la gestion à long terme des sites pollués. L'optimisation de l'efficacité du procédé implique le choix d'amendements appropriés qui permettront à la fois une croissance efficace des plantes et l'immobilisation des contaminants. Ainsi, l'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet de différents types d'amendements organiques et inorganiques (biochar, compost, terre végétale et scories) seuls ou en combinaison sur les caractéristiques du technosol de Pontgibaud tant au niveau agronomique que de sa toxicité. Tous les types d'amendements ont permis d'augmenter le pH et la conductivité électrique de l'eau porale, et induit une diminution de 90 % de la concentration de plomb dans l'eau porale et de 93 % de la fraction phytodisponible du plomb. Toutefois, pour tous les amendements, la concentration d'arsenic dans l'eau porale a

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

augmenté, des résultats contrastés sont obtenus au niveau de l'As phytodisponible. De plus, les amendements apportés ont amélioré la croissance des végétaux bio-indicateurs utilisés (haricot) et ont eu tendance à diminuer les concentrations de métaux et métalloïdes dans leurs organes aériens. La concentration en arsenic dans leurs racines n'a pas diminué, contrairement à celle du plomb. Enfin, le calcul de corrélations a permis de montrer une corrélation positive entre les concentrations de Pb accumulées dans les parties aériennes des haricots et sa fraction phytodisponible. En revanche, la phytodisponibilité de l'As n'a montré qu'une faible corrélation avec les concentrations d'arsenic dans les parties aériennes. Il semblerait toutefois que la procédure d'extraction utilisant NH_4NO_3 1M a fourni des indications plus utiles sur la phytodisponibilité des éléments étudiés par rapport que celle au CaCl_2 .

2.2.Introduction

High concentrations of metal(loid)s in soils generated by mining activities could have negative effects on health when spread into the environment through wind and water erosion. One of the key factors in decreasing health risks and rehabilitating these polluted areas is a thorough understanding of the metal(loid) dynamics, not only within the soils, but also in their transfer to the environment. The rehabilitation of these sterile sites by adding amendments will improve their agronomic characteristics and stabilize the metal(loid)s in the soil, allowing the establishment of a plant cover which will limit the spread of metal(loid)s. Therefore, it is important to study the soil characteristics that control the phyto-availability of metal(loid)s and their accumulation in plants. Measuring the total toxic element contents in a soil will not give information about their potential mobilization and transfer to the environment. It is therefore necessary to study their bioavailability in order to estimate the potential danger linked to a possible run off of such toxic elements firstly into the hydrosphere, and then into living organisms such as plants. The final consequence will be a negative effect on human health due to entry into the food chain (*Qasim et al. 2015*). Therefore, it appears to be important to get more information on metal(loid) availability in soil and their uptake by aerial organs of plants.

The International Organization for Standardization (ISO) defines bioavailability as chemicals in soils that can be absorbed or metabolized by humans or ecological receptors, or that are available for interaction with biological systems (ISO 11074, 2005). The phyto-availability of metals in soils depends on the metal(loid) species and their distribution between the solid phase and the pore water due to the soil physico-chemical characteristics. Thus, many studies have been carried out on polluted soil to evaluate metal(loid) phyto-

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

availability (Qasim *et al.* 2015; Lebrun *et al.* 2017). Moreover, a wide range of individual and sequential extraction schemes have been designed to evaluate the different forms of metal binding in soils using neutral salts (CaCl_2 and NH_4NO_3) (Gupta and Sinha 2007).

Plant ability to stabilize metal(loid)s in soils can be improved by using amendments that will reduce the mobility and bioavailability of metal(loid)s. Moreover, such amendments will contribute to the restoration of physical and chemical soil properties, as well as promoting efficient agronomical properties (Pérez-de-Mora *et al.* 2005; Kumpiene *et al.*, 2006, 2008). Several organic and inorganic amendments (compost, biosolids, lime, coal fly ash, phosphates, red mud, iron shot and Fe/Mn/Al oxides) on polluted soils have already been proposed to enhance metal(loid) soil immobilization and biomass production (Bolan *et al.* 2014; Kumpiene *et al.* 2008; Mench *et al.* 2010). Such bioavailability reduction is achieved by various complex processes, for example adsorption on mineral surfaces, formation of stable compounds with organic ligands, surface precipitation, and ion exchange (Kumpiene *et al.* 2008). Finally, the addition of organic-rich amendments such as compost, manure, various organic wastes, garden soil or biochar (Beesley and Marmiroli. 2011; Lebrun *et al.* 2018a), is commonly known to stimulate plant growth. However, these various amendments can add metal(loid)s to the soil. It is therefore essential to carry out preliminary analyses of the amendments, to make sure they are free of any contaminants.

The effect of organic matter on the bioavailability of metal(loid)s in a specific soil depends on amendment characteristics such as: (i) nature, (ii) microbial degradability, (iii) salt content, and (iv) effects on soil pH and redox potential (Walker *et al.* 2004). Moreover, organic amendments may contain a high proportion of highly variable humified organic matter, which has a great capacity to interact with metal ions and to mobilize or immobilize metal(loid)s (Grafe *et al.* 2002), by the formation of either more or less stable complexes. Organic matter can also compete with As for sorption sites, and displace As(V) and As(III) from iron oxides (hematite) (Redman *et al.* 2002). It can influence the speciation of arsenic (Balasoiu *et al.* 2001).

However, the supply of organic matter is essential for plant growth. Thus, an effective amendment for arsenic immobilization must be used, as shown by Le Forestier *et al.* (2015), where alkaline slags (a by-product of the iron and steel industry containing metal oxides) have been used to improve contaminated acid soils by making metals less soluble through oxidation precipitation and adsorption on the slag surfaces. Amorphous Fe(III) hydroxide (ferrihydrite), which is present in slag, can be an effective sorbent for anions and cations. Possible adsorption of arsenite, As(III), As(V) and arsenate, on ferrihydrite are summarized by Jain *et al.* (1999). The surface of the Fe hydroxide particles can be positively or negatively

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

charged depending on the pH, allowing them to be amphoteric Fe hydroxide compounds. Leupin and Hug (2005) observed that the slow and continuous release of Fe(II) in soils by the corrosion of iron provides ideal conditions for the oxidation of As(III) to As(V), which is easily adsorbed to iron hydroxides.

Among the organic amendments, biochar is considered an alkaline amendment able to increase soil pH, which induces Pb soil immobilization (*Kumpiene et al., 2008, Lebrun et al. 2018b*). However, alkaline materials are described as undesirable in As-contaminated soils since they increase ion leaching, including As (*Hartley et al. 2004*). The same negative results on As mobilization have been observed when contaminated soil was amended with lime (*Mench et al. 2003*). In contrast, Hartley *et al.* (2004) found that lime could reduce arsenic leaching in moderation by the possible formation of As-Ca precipitant complexes (calcium hydrogenoarsenate, CaHAsO_4 , and calcium arsenate, $\text{Ca}_3(\text{AsO}_4)_2$) under highly oxidizing and moderate pH conditions (*Porter et al. 2004*). In addition, the application of biochar improves plant growth by improving the agronomic properties of soils. Agegnehu *et al.* (2015) demonstrated that addition of biochar (either alone or in combination with compost) improved peanut yield for site and pot experiments. These positive effects were associated with better plant N, P, and K uptake and an increase in soil-soluble organic carbon availability to soil microorganisms. Gartler *et al.* (2013) demonstrated an efficient biochar effect on plants' Ca, Mg and Zn availability, and on soil water retention capacity.

The objective of the present study was to evaluate the influence of a range of amendments on the phyto-availability of As and Pb, two toxic elements present in a mining technosol with contrasting biogeochemical behaviors. Biochar was used due to its capacity to immobilize Pb when added to a metal(loid) contaminated mining soil (*Lebrun et al. 2017*). Slag amendment was associated to biochar in order to limit the As soil pore water availability which had increased levels in the presence of biochar. For this purpose, As and Pb mobility were measured in soil pore water (SPW) and in the soil salt extractable fraction of amended and non-amended soils. Phytotoxicity tests using bean germination were established, with plant dry weight, and As and Pb metal(loid) organ concentrations being measured and correlated to metal(loid) concentration in SPW.

2.3. Materials and Methods

2.3.1. Soil physicochemical analysis

The pH and electrical conductivity were determined according to AFNOR NF T01-013, using a combined pH-EC meter (WTW, ProfiLine 1970i, Germany).

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

Total organic carbon (TOC) was determined in the soil samples by Rock-Eval pyrolysis. (Rock-Eval 6 Turbo; Vinci Technologies, France) (Béhar *et al.*, 2001; Disnar *et al.*, 2003; Sebag *et al.*, 2006).

2.3.2. Amendments

The different types of amendments selected for this study were garden soil, slag, compost and biochar (Table 3.1).

Garden soil was collected on the grounds of the University of Orleans, France. The garden soil allows an input of organic matter as well as essential elements. Its purchase cost is very low, generating a low financial impact. However, it can be of great heterogeneity, with soils of varying quality.

The base slag Valorseed 630 semolina was supplied by AXERREAL. Slag is a steel-based amendment used to improve soil characteristics in the context of agronomic studies (eg improvement of soil fertilization and soil pH in acid soils). This basic slag is composed of Ca, P, and other metal oxides, and is an alkaline by-product of steel plants and waste incineration processes.

The compost used in this study was an Algoflash horticultural compost (NF U-44-551 growing medium) composed of peat moss, softwood bark compost, green compost, seaweed and EC fertilizer.

Biochar was supplied by La Carbonerie (Crissey, France). It was obtained from a slow pyrolysis (500 °C) of platelets and hardwood chips, composed of oak biomass, hornbeam and beech. After pyrolysis, the product was passed through different sieves to recover the particle size range of 0.2 to 0.4 mm.

Table 3.1: Amendments physico-chemical properties. Electrical Conductivity (EC) ($\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$), WHC = water holding capacity (% mass). Letters indicate significant difference ($p < 0.05$) ($n = 3$).

	Compost	Biochar	Garden soil	Slag
Granulometry (mm)	ND	0.2 – 0.4	< 2	< 2
pH	7.4±0.0 a	9.0±0.0 b	5.5±0.0 c	9.2±0.0 b
EC ($\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$)	801±24 a	432±2 b	553±2 c	3266±13 d
WHC (%)	51±1 a	183±3 b	30±2 a	ND

2.3.3. Soil mixture preparation

All types of amendments as well as the Pontgibaud technosol were homogenized and sieved at 2 mm. Amendments were mixed according to the combinations and ratio listed in Table 3.2.

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

Table 3.2: Treatment designations and percentage of different amendments per treatment.

Samples	Modalities and amendments percentage (w/w)
Ps	Pontgibaud soil (Ps)
PsC	P + Compost (C) 5%
PsG	Ps + Garden soil (G) 5%
PsS	Ps + Slag (S) 2.5%
PsCS	Ps + C 5% + S 2.5%
PsB	Ps + Biochar (B) 2%
PsBC	Ps + B 2% + C 5%
PsBG	Ps + B 2% + G 5%
PsBS	Ps + B 2% + S 2.5%
PsBCS	Ps + B 2% + C 5% + S 2.5%

A mixture of biochar with Pontgibaud technosol was distributed into different batches for the following treatments: Ps + B, Ps + B + C, Ps + B + G and Ps + B + C + S (Table 2). The different amendments were added, then the mixtures were divided into 5 replicates. A compost mixture was also prepared for treatments P + C and P + C + S, and then each mixture was divided into 5 replicates. This procedure was applied to limit weighing errors, and to have better sample representation. 300 g of mixture was distributed into each pot. The pots were then placed outside for 30 days. The seeds were then added and left for 13 days. The total duration of the experiment was 43 days.

2.3.4. Germination tests

Before being seeded, *Phaseolus vulgaris* "contender" variety seeds (dwarf bean) were sprouted in perlite. After 3 days the most homogeneous germinations were chosen and placed in the pots containing the technosol with different amendments. Two dwarf bean seedlings were sown in each pot and cultivated for 13 days in controlled conditions (16 h light / 8 h darkness regime, 25 °C/21 °C with an approximate photon flux of 800 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). The soil water holding capacity was kept between 55 % and 65 % by measuring the weight of each pot daily. It was adjusted with deionized water throughout the experimental period.

2.3.5. Soil pore water analysis

Soil pore waters (SPWs) were collected twice during the growth experiment: at the end of the equilibration period (T0) and at the end of the experiment, on day 13 (TF), before harvesting the plants.

2.3.6. Plant analysis

Plants were harvested 13 days after sowing. The above ground plant tissues (primary leaves) were cut and rinsed thoroughly with double deionized water. Rinsed leaves were dried

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

at 40 °C for 72 h before recording the dry matter yield. Roots were washed abundantly with tap water (twice), and washed once in distilled water to remove soil particles bound to roots.

2.3.7. Statistical analysis

All tests were performed in five replicates and results are presented as mean $\pm$ standard error. Statistical analysis included calculation of Pearson's correlation coefficient to determine the relationships between the metal(loid) concentrations in the aerial parts of dwarf bean, and the extractable metal(loid) concentrations in soils for the different single extraction methods. The correlations were examined based on concentrations in dry plant weight.

2.4. Results and discussion

2.4.1. Effects of amendments and plants on soil and SPW properties

At the beginning of the experiment the pH of the technosol SPW was acidic (4.57 ± 0.08) and EC was $713 \pm 11 \mu\text{S cm}^{-1}$ (Table 3.3). No significant difference was observed between T0 and TF for either the pH or EC of SPW.

Table 3.3: SPW physico-chemical characteristics (pH, EC and DOC) in the different treatments, at the beginning (T0) and at the end of the experiment (TF), (13 days).

	pH		EC ($\mu\text{S cm}^{-1}$)		DOC (mg L^{-1})
	T0	TF ^{ns}	T0	TF ^{ns}	TF
P _s	4.57 $\pm$ 0.08 a	4.50 $\pm$ 0.03 a	713 $\pm$ 11 a	670 $\pm$ 24 a	5.62 $\pm$ 0.30 a
P _s C	7.12 $\pm$ 0.05 b	7.22 $\pm$ 0.04 b	1331 $\pm$ 3 b	1347 $\pm$ 9 b	29.05 $\pm$ 4.40 b
P _s G	4.97 $\pm$ 0.01 c	5.02 $\pm$ 0.04 c	1422 $\pm$ 5 c	1406 $\pm$ 8 c	6.32 $\pm$ 0.45 a
P _s S	7.61 $\pm$ 0.04 d	7.70 $\pm$ 0.04 d	2408 $\pm$ 40 d	2417 $\pm$ 44 d	7.44 $\pm$ 2.33 ad
P _s CS	7.72 $\pm$ 0.02 d	7.73 $\pm$ 0.02 d	2137 $\pm$ 15 e	2137 $\pm$ 15 e	43.65 $\pm$ 3.86 c
P _s B	7.28 $\pm$ 0.02 b	7.24 $\pm$ 0.02 b	1307 $\pm$ 32 b	1307 $\pm$ 32 b	7.17 $\pm$ 1.09 a
P _s BC	7.52 $\pm$ 0.02 e	7.57 $\pm$ 0.05 e	1347 $\pm$ 9 b	1344 $\pm$ 8 b	27.25 $\pm$ 4.85 b
P _s BG	7.28 $\pm$ 0.02 b	7.25 $\pm$ 0.02 b	1406 $\pm$ 8 c	1404 $\pm$ 10 c	7.31 $\pm$ 0.56 a
P _s BS	7.56 $\pm$ 0.02 f	7.60 $\pm$ 0.01 f	2367 $\pm$ 54 d	2367 $\pm$ 54 d	11.91 $\pm$ 1.35 d
P _s BCS	7.75 $\pm$ 0.02 d	7.76 $\pm$ 0.02 d	1979 $\pm$ 26 f	1979 $\pm$ 26 f	47.91 $\pm$ 7.34 c

(P_s): Pontgibaud soil, (P_sC): P_s + compost (C) 5%, (P_sG): P_s + garden soil (G) 5%, (P_sS): P_s + slag (S) 2.5%, (P_sCS): P_s + C 5% + S 2.5%, (P_sB): P_s + biochar (B) 2%, (P_sBC): P_s + B 2% + C 5%, (P_sGB): P_s + B 2% + G 5%, (P_sBS): P_s + B 2% + S 2.5%, (P_sBCS): P_s + B 2% + C 5% + S 2.5%.

Letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) ($n = 5$)

^{ns}, no significant difference between T0 and Tf

When adding amendments to Pontgibaud soil (P_s), SPW pH and EC increased significantly ($p < 0.05$). However, converse effects were observed when comparing

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

amendments. At the end of the experiment, garden soil addition was the least efficient in increasing SPW pH (5.02 ± 0.04). Whereas for compost, slag or biochar when added alone or in combination, the SPW pH value reached 7.5. When added alone to Ps, compost and biochar increased Pontgibaud SPW pH in the same way and did not induce statistical differences between treatments.

Pontgibaud SPW EC at the beginning and end of the experiment was approximately $700 \mu\text{S cm}^{-1}$. EC doubled when compost, garden soil or biochar were added to Ps, whereas slag amendment when added alone or in combination with the other three tested amendments caused an EC increase ($1979\text{--}2408 \mu\text{S cm}^{-1}$).

Such pH evolution was consistent with other studies (Molnàr *et al.*, 2016; Beesley *et al.* 2014). Jones *et al.* (2012) found a pH increase of a Cu-contaminated soil (clayey sand) correlating with biochar applications from 1 to 3 %. In 2013, Chintala *et al.* also observed an increase in pH and EC after a 2, 4 or 6 % biochar application to an acid soil from a cultured Entisol. Moreover, Beesley *et al.* (2014) showed that the pH of the pore water of a contaminated soil increased from 3.8 to 7.1, with addition of compost combined with biochar. This increase in pH can be explained by two mechanisms: (i) the biochar alkaline pH induces a liming (Lebrun *et al.*, 2017); (ii) the incorporation of biochar and soil organic amendments allows the acidity of the soil solution to be reduced by the proton consumption reactions in the soil (Chintala *et al.*, 2013; Lebrun *et al.*, 2017).

The low pH increase measured on PsG can be attributed to the fact that the pH of the garden soil was close to that of the technosol and lower than that of the other amendments. The EC of Ps was low $713 \pm 11 \mu\text{S cm}^{-1}$ and was significantly increased by biochar addition $1307 \pm 32 \mu\text{S cm}^{-1}$. To a lesser extent, the same results were observed by Molnàr *et al.* (2013) as EC increased by 24 % when 0.1 % biochar of paper fiber feedstock was added to a sandy agricultural soil in Hungary.

The biochar and compost amendments significantly increased the TOC in the solid phases (Table 3.4), whereas garden soil and slag did not. Pontgibaud DOC value was 5.62 mg L^{-1} .

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

Table 3.4: Total Organic Carbon (TOC)

	TOC (%)
Ps	0.09±0.01
PsC	1.13±0.08
PsG	0.09±0.01
PsS	0.09±0.00
PsCS	1.48±0.01
PsB	1.46±0.00
PsBC	3.00±0.06
PsBG	1.46±0.04
PsBS	1.52±0.04
PsBCS	2.26±0.05

(Ps): Pontgibaud soil, (PsC): Ps + compost (C) 5%, (PsG): Ps + garden soil (G) 5%, (PsS): Ps + slag (S) 2.5%, (PsCS): Ps + C 5% + S 2.5%, (PsB): Ps + biochar (B) 2%, (PsBC): Ps + B 2 % + C 5% , (PsGB): Ps + B 2% + G 5%, (PsBS): Ps + B 2% + S 2.5%, (PsBCS): Ps + B 2% + C 5% + S 2.5%.

When garden soil, slag or biochar were added alone to Ps no significant difference was observed between these treatments and Ps. Treatments with compost showed the highest DOC levels from 29.05±4.40 to 47.91±7.34 mg L⁻¹. When compost was added alone to Ps or in combination with biochar, DOC increased significantly by about five times (27.25±4.85 mg L⁻¹). This effect was amplified when slag was added as a supplementary amendment and DOC reached a value of around 45 mg L⁻¹. Finally, when slag and biochar were added to Ps, DOC was only doubled (11.91±1.35 mg L⁻¹).

According to Beesley *et al.* (2014) treatments including compost induced a significant increase of DOC in SPW. But it should also be noted that for all modalities containing slag associated with one or more amendments (B and C), DOC levels were significantly higher than PsS from 11.91±1.35 to 43.65±3.86 mg L⁻¹. The influence of biochar on the DOC in SPW was weak. Whether biochar was applied on field or on pot studies, Jones *et al.* (2012) showed that biochar amendment did not induce variations in SPW DOC concentrations, even though biochar is mainly composed of carbon. This is explained by the biochar carbon being refractory to physico-chemical or micro-organisms degradation. It has been demonstrated that the biochar carbon pool is relatively stable and insoluble for centuries and could not be remobilized (Beesley *et al.* 2014). The modalities containing compost demonstrated a higher DOC rate, which could be explained by the fact that even though the compost is mainly composed of refractory humified material it is also composed of fresh organic matter, and therefore very labile (Lefèvre, 2015) Compost provides more labile organic carbon than biochar, which would explain a higher DOC concentration.

The presence of slag mixed with biochar or compost increases SPW DOC content, which means that the minerals brought in by the slag could compete with some organic

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

matter, inducing the solubilization of specific carbonic chemical groups released in SPW (Lefèvre, 2015). However, it must be mentioned that in some studies a decrease in DOC was observed when biochar was used as an amendment (Lebrun *et al.*, 2017). Hass *et al.* (2012) proposed two mechanisms to explain such a phenomenon: (i) specific biochar structure could bind to carbon and (ii) biochar could improve soil microorganism activity inducing a mineralization of the soluble carbon organic matter. Because of the short experimental period it was impossible to stimulate soil microbial activities, which is why no SPW DOC decrease was observed when biochar was added to Ps.

2.4.2. Effects of amendments on soil and SPW physico-chemical characteristics

Measuring metal(loid) concentration in the SPW makes it possible to estimate the highly mobilizable metal(loid) part of a soil, and therefore the most easily phyto-available for plants growing in such conditions. Phyto-availability tests were done by measuring the metal(loid) fractions in NH_4NO_3 and CaCl_2 as selective extractants. A correlation between selective extractants, and the metal(loid) concentration in organs will determine which selective extractant best reflects the metal(loid) SPW fraction available for plants.

Table 3.5: As and Pb concentrations in SPW (at the beginning (T0) and at the end of the experiment (TF)) and As and Pb phyto-availability using selective extractants (CaCl_2 or NH_4NO_3).

	SPW				Phytoavailability			
	As (mg L^{-1})		Pb (mg L^{-1})		As (%)		Pb (%)	
	T0	TF**	T0	TF**	CaCl_2	$\text{NH}_4\text{NO}_3^{**}$	CaCl_2	$\text{NH}_4\text{NO}_3^{**}$
Ps	0.08±0.00 a	0.02±0.01 a	16.15±2.83 a	13.20±0.13 a	0.07±0.01 a	0.14±0.01 a	4.11±0.14 a	12.37±1.21 a
PsC	0.13±0.02 b	0.03±0.00 a	0.55±0.08 b	0.18±0.02 b	0.06±0.01 a	0.10±0.01 b	0.26±0.03 b	2.31±0.33 b
PsG	0.11±0.01 b	0.00±0.00 b	15.90±1.49 a	13.28±0.63 a	0.06±0.01 a	0.18±0.01 c	4.12±0.08 a	9.86±1.35 c
PsS	0.13±0.01 b	0.03±0.00 a	0.46±0.10 bc	0.23±0.04 bcd	0.05±0.01 a	0.18±0.00 c	0.03±0.00 c	0.11±0.02 d
PsCS	0.17±0.01 c	0.07±0.00 c	0.44±0.03 bc	0.29±0.01 d	0.06±0.00 a	0.17±0.01 c	0.02±0.00 c	0.03±0.00 e
PsB	0.010±0.00 d	0.01±0.00 b	0.36±0.04 bc	0.43±0.06 c	0.03±0.01 b	0.14±0.00 a	1.08±0.06 d	3.65±0.23 f
PsBC	0.14±0.01 b	0.07±0.01 c	0.30±0.03 b	0.16±0.00 bc	0.03±0.01 b	0.14±0.01 a	0.07±0.01 e	0.03±0.01 e
PsBG	0.11±0.01 d	0.01±0.00 b	0.58±0.14 bc	0.93±0.06 e	0.03±0.01 ab	0.13±0.00 a	0.58±0.15 f	1.61±0.14 g
PsBS	0.13±0.01 b	0.04±0.01 d	0.41±0.00 c	0.32±0.17 bcd	0.03±0.00 b	0.16±0.02 ac	0.03±0.00 c	0.05±0.02 e
PsBCS	0.19±0.01 e	0.12±0.02 e	0.37±0.03 bc	0.25±0.01 bd	0.06±0.01 a	0.20±0.01 c	0.02±0.00 c	0.06±0.01 e

(Ps): Pontgibaud soil, (PsC): P + Compost (C) 5%, (PsG): Ps + Garden soil (G) 5%, (PsS): Ps + Slag (S) 2.5%, (PsCS): Ps + C 5% + S 2.5%, (PsB): Ps + Biochar (B) 2%, (PsBC): Ps + B 2 % + C 5 % , (PsGB): Ps + B 2% + G 5%, (PsBS): Ps + B 2% + S 2.5%, (PsBCS): Ps + B 2% + C5% + S 2.5%. Letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) ($n = 5$), **, significant difference between T0 and TF or between selective extractants CaCl_2 and NH_4NO_3 .

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

Arsenic concentrations in SPW and selective extractions

At T0 all amendments induced a significant As concentration increase in the SPW. The lowest value ($0.010 \pm 0.00 \text{ mg.L}^{-1}$) was observed when biochar was added alone to Ps and corresponded to a 27 % increase. However, when all amendments were added to Ps (PsBCS), As concentration in SPW was the most important compared to the other treatments and corresponded to 140 % of the concentration measured in Ps. For all treatments arsenic concentration was significantly less important at TF than T0, and no differences between Ps, PsC and PsS were observed at the end of the experiment. At TF for the PsBCS treatment, arsenic concentration was strongly mobilized, up to 480 % compared to Ps. This As concentration increase was positively correlated to pH (0.49) and DOC (0.87) (Table 3.6). It should also be noted that at TF for most treatments, As concentrations in the SPW were below the environmental release standard stated at 0.1 mg L^{-1} (Legifrance), and that garden soil amendment resulted in a decrease in SPW As concentration to almost 0 mg L^{-1} .

The results of selectives extractants, which were used to estimate the arsenic phyto-availability, demonstrated a higher arsenic extraction when using NH_4NO_3 compared to CaCl_2 . The difference in favor of NH_4NO_3 was between 1.6- and 5.3-fold for PsC and PsBS, respectively (Table 3.5). No significant correlation was demonstrated between SPW As concentration and As selective extractant, which were -0.02 for CaCl_2 and 0.52 for NH_4NO_3 . When CaCl_2 was applied to biochar Ps amended soil, only 0.03 % of total soil As was extracted, except for the PsBCS treatment, which released 0.06 % of total As. With NH_4NO_3 , the lowest arsenic mobilization was observed in the PsC treatment, with 0.10 % of total soil As. This value increased with the other treatments (PsG, PsS, PsCS, PsBS and PsBCS), which exhibited extraction proportions of ≥ 0.17 % of total soil As. Whereas for PsB, PsBC and PsBG, NH_4NO_3 gave the same proportion of available As (0.14 %) as when NH_4NO_3 was applied to Ps. It should be emphasized, however, that a positive correlation was found between the As concentration in SPW and DOC (0.87), demonstrating that there is a dependence between arsenic concentrations in SPW and soil organic matter.

Arsenic, unlike cationic metals (Cu, Zn, Pb, Cd, etc.), is present in the form of an oxyanion in solution and its mobility in soils increases with increasing soil pH. It is well known that arsenic adsorption generally decreases with increasing pH values (*Beesley et al., 2014; Feng et al., 2013*) as arsenic often binds to iron oxides, which are subject to a decrease in positive surface charge when pH increases. The mobility, toxicity and availability of As in the environment are strongly influenced by soil physico-chemical properties and are mainly controlled by adsorption--desorption processes (*Feng et al., 2013*) Changes in organic matter

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

can directly or indirectly alter the distribution and availability of metals in soils (*Bolan et al., 2014*). The effect of organic residues on arsenic mobility and bioavailability depends on the type of soil and soil characteristics (EC, pH and degree of humification) (*Walker et al., 2004*). Fitz and Wenzel. (2000) reported a higher As solubility in soils when pH increased from pH 3 to pH 8. This may also mean that the conditions induced by the addition of biochar to the soils may control the mobility of As and Pb, regardless of the capacity of the biochar as the sorbent.

The addition of compost can increase the mobility and leaching of metal(loid)s, and in particular arsenic (*Mench et al., 2003*). Strong increases in the arsenic concentration of the SPW of compost-modified soils have been observed, probably because DOC competes with arsenic for sorption sites on Fe oxides and Al, resulting in increased mobility of arsenic (*Mench et al., 2003, Bolan et al., 2014*). The compost may also contain soluble phosphorus, which can displace arsenic from organic and inorganic binding sites (*Bolan et al., 2014*). In addition, Moreno-Jiménez *et al.* (2013) observed that the mobilization of arsenic, Cu and Se after application of olive plant waste compost to flooded soils could be attributed to increased concentrations of DOC in interstitial water. On the other hand, Cao and Ma. (2004) used compost to remediate soils contaminated with chromium-copper arsenate and reported a positive effect on arsenic adsorption. Beesley *et al.* (2010) found no statistically significant correlation between As and DOC concentrations in SPW of a compost-amended soil, indicating that DOC did not drive mobilization of As in this soil. The correlation between SPW As and DOC probably depends on the specific properties of the amended soil. The results obtained on amended Pontgibaud soil are in agreement with those of Moreno-Jiménez *et al.* (2013) who also suggested that the phosphorus brought by compost could in part be responsible for the mobilization of arsenic. The high mobilization of As in treatments with slag may also be linked to the large amount of phosphorus supplied by this amendment. The use of slag was intended to reduce the mobility of As thanks to its content of iron and aluminum oxy(hydroxi)des. Moreover, metal oxides and clay minerals in the soils bind arsenic (*Zhang et al., 2009*). However, the combination of the slag with the compost and the biochar in fact induced arsenic mobilization. This was due to the multiple competition phenomena between organic matter and arsenic for sorption on the Fe oxy(hydro)xides, thanks to the phosphorus supplied by the slag, and the increased solubilization of organic carbon in SPW in the presence of slag.

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

Lead concentrations in SPW and selective extractions

At T0, all treatments (Table 3.5), apart from the treatment with garden soil, decreased the total Pb content of the SPW by 97 % when compared to Pontgibaud soil. For Ps and PsG, the SPW Pb concentration was almost the same at the beginning and end of the experimental period and corresponded approximately to 14.6 mg L^{-1} , whereas for the other treatments the SPW Pb concentration was between 0.1 and 0.9 mg L^{-1} .

Concerning the selective extraction, treatments can be classified into three groups: (i) Ps and PsG, which demonstrated the highest Pb phyto-available fraction (4 % for CaCl_2 and 11 % for NH_4NO_3); (ii) PsC, PsB and PsBG, which demonstrated a Pb phyto-available fraction ranging from 0.2 to 1 % for CaCl_2 and 1.6 to 3.6 % for NH_4NO_3 ; (iii) PsS, PsCS, PsBC, PsBS and PsBCS treatments, in which almost no Pb was extracted neither by CaCl_2 nor NH_4NO_3 . Finally, the correlation tests (-0.99) showed that there was a strong and negative correlation between SW pH and lead availability (Table 3.6).

Compost, biochar and slag have high concentrations of basic cations. Compost and biochar also have high organic matter content. These characteristics result in an increase in pH and cationic exchange capacity (Pérez-Esteban *et al.*, 2014). The increase in pH therefore increased the surface charges of soil particles and thus the retention of metals (Pérez-Esteban *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2016). Humified organic matter, which has a high capacity to interact with metal ions and mobilize or immobilize metals (Grafe *et al.*, 2002), could reduce their mobility (and therefore their bioavailability) in the soil profile through the formation of more or less stable complexes (Bolan *et al.*, 2014). Moreover, biochar has a negative charge, allowing electrostatic attraction, and has a large specific surface (Beesley and Marmiroli 2011; Puga *et al.*, 2015). It is well known that the mobility of metal is strongly influenced by the adsorption phenomena that connect them to biochar surfaces (Bolan *et al.*, 2014).

Amendments can immobilize metals by three mechanisms: (i) adsorption of metals at highly accessible sites on the surface of soil components or aluminosilicates, (ii) precipitation with oxides of Al, Fe or Mn, and (iii) formation of minerals (such as metal silicates) and diffusion through mineral surfaces (Lee *et al.*, 2014). These different properties allow the implementation of different mechanisms, which can make metals unavailable for absorption by plants through changes to SPW pH and lead availability.

Compost, biochar and slag have high basic cation concentrations. Compost and biochar also have high organic matter content. These characteristics result in a CEC and pH increase (Pérez-Esteban *et al.*, 2012), which modify the surface charges of soil particles and thus the retention of metals (Pérez-Esteban *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2016). Compost has also been

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

shown to influence the availability of metal(loid)s by binding them to humic acids (*Bolan et al., 2014*).

2.4.3. Plant dry weight and metal(loid) uptake

The root biomass for beans grown on Ps was 39.9 mg. All treatments improved the root biomass. Plants in the first group, composed of PsS, PsCS, PsBC, PsBG, PsBS and PsBCS, did not demonstrate significant statistical differences in terms of root biomass. Their dry weights ranged from 181.2 to 255.4 mg. The second group, which was composed of PsG, PsB and PsC, had a root biomass between 62.9 and 145.1 mg (Figure. 3.1).

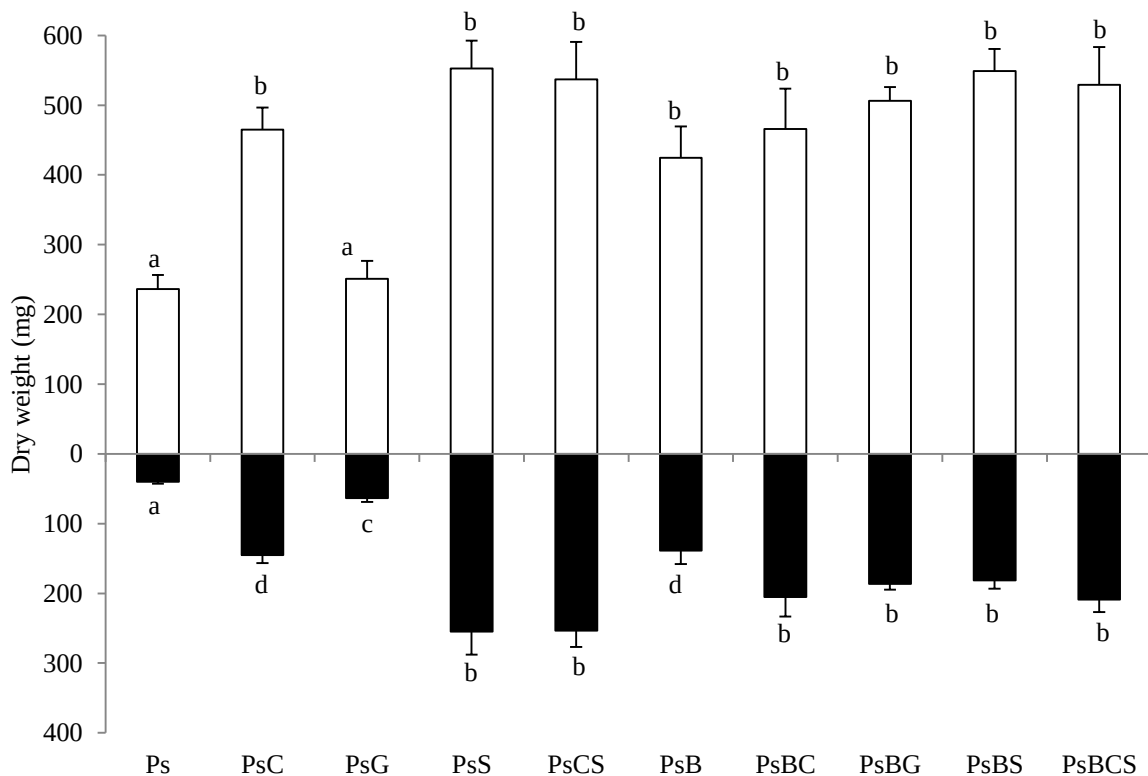


Figure 3.1: Dry weight (mg) of dwarf beans organs (aerial parts (white column), roots (black column)) at the end of the experiment period (13 days). (P): Pontgibaud soil, (PC): P + Compost (C) 5%, (PG): P + Garden soil (G) 5%, (PS): P + Slag (S) 2.5%, (PCS): P + C 5% + S 2.5%, (PB): P + Biochar (B) 2%, (PBC): P + B 2 % + C 5% , (PGB): P + B 2% + G 5%, (PBS): P + B 2% + S 2.5%, (PBCS): P + B 2% + C 5% + S 2.5%. Results are expressed as the mean value and standard error (n=10), letters on bar graphs indicate a significant difference ($p < 0.05$).

Concerning the biomass of the aerial parts, the lowest value was observed on Ps (236.3 mg), and no difference was observed for the PsG treatment. However, for the other studied treatments the dry weight was significantly increased compared to Ps and was in fact doubled (500 mg) (Figure. 3.1).

In this study, addition of amendments was beneficial for plant growth. This can be explained by the improvement of the physical properties of the soil, in particular the water retention capacity, notably by the addition of organic amendments (*Stewart et al., 2000*).

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

Moreover, organic matter, provided by compost improved the N, P, K nutrient cycle (*Marques et al.*, 2008), allowing a better plant growth, as observed by *Marques et al.* (2008) on *Solanum nigrum*.

The beneficial effect provided by biochar on root biomass (3.5-fold) and on aerial part biomass (1.8-fold) was already observed by *Puga et al.* (2015) on *Mucuna aterrima* when up to 5 % of cane straw biochar was applied to an old zinc mining area.

Two mechanisms can be proposed to explain the plant growth improvement induced by the addition of biochar in metal(loid) contaminated soil: (i) biochar could improve water retention capacity (*Agegnehu et al.*, 2015) and (ii) biochar could increase the pH of the soil (*Smider and Singh*, 2014) due to its alkalinity, also demonstrated by *Lebrun et al.* (2017). This is confirmed by the positive correlation between root biomass (0.91), aerial biomass (0.95) and pH value.

Concerning the slag, *Prado et al.* (2003) observed that calcium limestone and basic slag applied in sugar cane fields generated a beneficial effect in correcting soil acidity. Moreover, *Le Forestier et al.* (2015) showed a link between the increase of soil pH and the decrease of acid-soluble and oxidizable fractions in slag modified soils. However, in the present work, by comparing PsS and PsB modalities, a better root biomass production was observed for PsS in spite of Pb being less present in SPW than As. This observation could be explained by the higher biochar sorption capacity which could reduce plant nutrient availability and thus soil fertility (*Rondon et al.*, 2007).

The combination of amendments allowed a better improvement of the bean root dry weight when Ps was amended with individual amendments (C, G, B) except when slag was added to Ps. Moreover, among the treatments composed of Ps and only one amendment, only compost and biochar reduced the SPW Pb concentration (Table 3.5), although the pH in SPW was the same as the one measured on multi-amended Ps. The combination of amendments probably improved root growth by providing more available nutrients than individual amendments.

Moreover the increase in As concentration in SPW linked to the addition of amendments did not have any negative effects on bean growth, probably due to the fact that arsenic concentration remained below the plant toxicity threshold.

Dwarf beans growing for 13 days in soil amended differently showed an accumulation of metal(loid)s in the aerial and roots parts of plants in variable amounts (Figures. 3.2 and 3.3).

In the present study, there were differences in metal(loid) concentrations between the roots and the aerial parts of plants, but no distinction between leaves and stems was observed.

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

For all treatments metal(loid) concentrations were higher in the roots than in the aerial parts of the beans. For Pb it corresponded to 0.25 g.kg⁻¹ in aerial part and 6 g.kg⁻¹ for the roots, whereas for As it corresponded to 5 mg.kg⁻¹ in aerial part and 200 mg.kg⁻¹ for the roots.

Regardless of the amendment used, arsenic concentrations in the aerial parts of the beans ranged from 2.5 to 14.5 mg kg⁻¹, and in the roots between 110 and 290 mg kg⁻¹. For lead, the range was 0.10-0.36 g kg⁻¹ and 4.8-24.5 g kg⁻¹ for aerial and root parts, respectively. In detail, for As concentrations in aerial parts, there were no significant differences between Ps and PsG treatments, with values of 14.5 ± 3.1 and 11.2 ± 1.5 mg kg⁻¹, respectively. These concentrations were 4.2 times higher than those observed in the aerial parts of the beans grown on the other amended soils. Finally, the As concentrations found in the aerial parts of PsC, PsS, PsCS, PsB, PsBC, PsBG, PsBS and PsBCS were below the value observed by Mench *et al.* (2006) and Carbonell-Barrachina *et al.* 1997) for aerial parts of beans grown on control soil, 0.38 and 5.2 mg kg⁻¹, respectively.

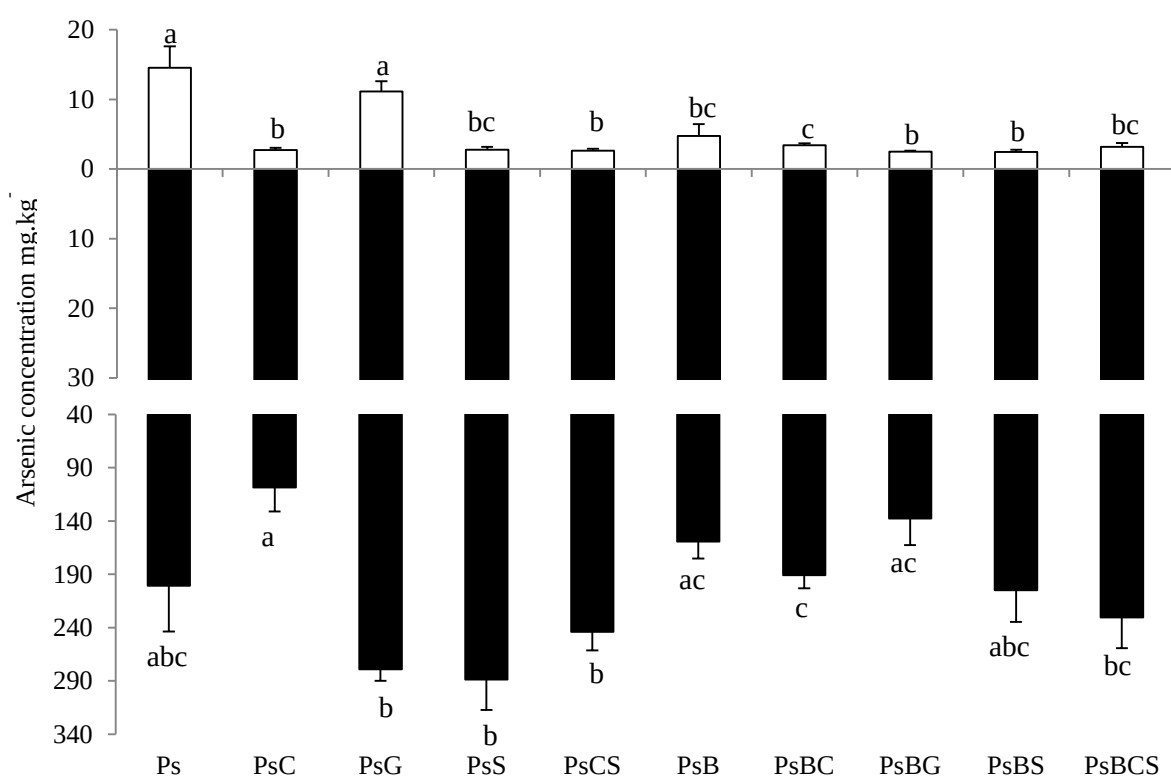


Figure 3.2: Arsenic concentrations (mg.kg⁻¹) in dwarf bean organs (aerial parts (white column), roots (black column)) at the end of the experiment period (13 days). (P): Pontgibaud soil, (PC): P + Compost (C) 5%, (PG): P + Garden soil (G) 5%, (PS): P + Slag (S) 2.5%, (PCS): P + C 5% + S 2.5%, (PB): P + Biochar (B) 2%, (PBC): P + B 2% + C 5%, (PBG): P + B 2% + G 5%, (PBS): P + B 2% + S 2.5%, (PBCS): P + B 2% + C 5% + S 2.5%. Results are expressed as the mean value and standard error (n=10), letters on bar graphs indicate a significant difference (p<0.05).

Pb concentration in roots of beans grown on Pontgibaud soil was 68 times higher than in aerial parts, with root Pb concentration being 24.5 g kg⁻¹, and Pb concentration in aerial parts being 0.4 g kg⁻¹ (Figure. 3.3). For all treatments, garden soil amendment decreased root

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

Pb concentration by 1.4-fold compared to Ps whereas the other treatments decreased Pb roots concentration 4.2-fold. For the aerial parts when biochar or garden soil were added alone or in combination, Pb concentration was no different to that measured on plants grown on Ps. Moreover, when amendments added to Ps containing slag or a combination of biochar and compost, Pb concentration in aerial parts was four times lower than that measured in aerial parts of beans grown on Ps.

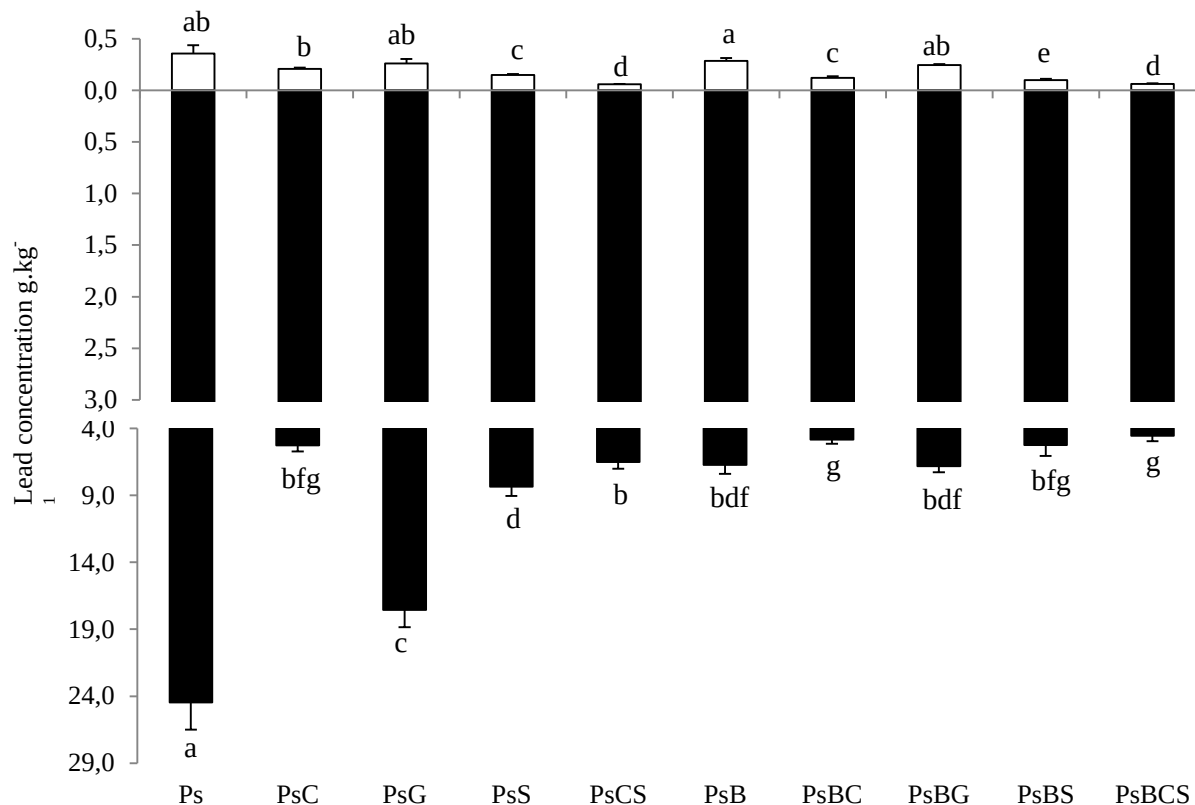


Figure 3.3: Lead concentrations (g.kg⁻¹) in dwarf bean organs (aerial parts (white column), roots (black column)) at the end of the experiment period (13 days). (P): Pontgibaud soil, (PC): P + Compost (C) 5%, (PG): P + Garden soil (G) 5%, (PS): P + Slag (S) 2.5%, (PCS): P + C 5% + S 2.5%, (PB): P + Biochar (B) 2%, (PBC): P + B 2 % + C 5% , (PGB): P + B 2% + G 5%, (PBS): P + B 2% + S 2.5%, (PBCS): P + B 2% + C 5% + S 2.5%. Results are expressed as the mean value and standard error (n=10), letters on bar graphs indicate a significant difference (p<0.05).

Finally, SPW Pb concentrations were significantly correlated with root tissue Pb concentration (0.95, Table 5.6). However, no significant correlations could be observed for arsenic concentrations in SPW and root tissues (0.24). The fact that Pb and As are mainly found in plant roots has been already emphasized by Lebrun *et al.*(2017) who found the same results when *Populus* or *Salix* trees were grown on metal-contaminated soils (Co, Cu, Pb and Zn).

The addition of a single amendment can result in reduced concentrations of metal(loid)s in plant tissues, but can also lead to the accumulation of metal(loid)s (Pérez-Esteban *et al.*, 2014).When added to Pontgibaud soil, the amendments allow a reduction of arsenic accumulation in the aerial parts. The chemical composition and sorption properties of soil

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

influence the mobility and bioavailability of metals. Generally, only a fraction of metal(loid)s in soils is bioavailable for uptake by plants. Metal(loid)s in soils are generally classified into three categories according to their bioavailability: (i) readily bioavailable (Cd, Ni, Zn, As, Se, Cu), (ii) moderately bioavailable (Co, Mn, Fe), and (iii) less bioavailable (Pb, Cr, U). (Prasad, 2003).

Gupta and Sinha. (2007) have shown that the process of metal(loid) accumulation in plants depends on the concentration of available metals in soils, their mobility, and the plant species that grow on these soils. The metal(loid)s considered to be available for plant uptake are those which exist as soluble components in the soil solution or which are readily desorbed or solubilized by root exudates, often representing only a small part of the total ions (Qasim *et al.*, 2015), as found in the present study.

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

Table 3.6: Correlations between pH, EC, DOC, As concentration, Pb concentration, As CaCl₂ or NH₄NO₃ selective extractant, Pb CaCl₂ or NH₄NO₃ selective extractant, organs dry weight and organs metal(loid)s concentrations.

	SPW						Selective extractant T0				Dry weight Tf		Organs metal(loid)s concentrations Tf			
	pH T0	DOC TF	[As] T0	[As] TF	[Pb] T0	[Pb] TF	As CaCl ₂	As NH ₄ N O ₃	Pb CaCl ₂	Pb NH ₄ N O ₃	AP	R	[As] _{AP}	[As] _R	[Pb] _{AP}	[Pb] _R
SPW pH	1.00	0.49	0.68	0.47	-0.98	-0.98	0.32	-0.03	-0.98	-0.99	0.95	0.91	0.31	-0.16	-0.75	-0.96
SPW DOC	0.49	1.00	0.88	0.87	-0.43	-0.45	0.04	0.45	-0.52	-0.49	0.45	0.51	0.10	0.01	-0.74	-0.50
SPW [As] T0	0.68	0.88	1.00	0.90	-0.58	-0.59	-0.02	0.52	-0.68	-0.71	0.69	0.74	0.30	0.27	-0.94	-0.66
SPW [As] TF	0.47	0.87	0.90	1.00	-0.39	-0.40	-0.01	0.59	-0.50	-0.49	0.48	0.54	0.32	0.24	-0.80	-0.43
SPW [Pb] T0	-0.98	-0.43	-0.58	-0.39	1.00	1.00	-0.32	0.16	0.98	0.96	-0.93	-0.85	-0.29	0.31	0.64	0.96
SPW [Pb] TF	-0.98	-0.45	-0.59	-0.40	1.00	1.00	-0.32	0.17	0.98	0.96	-0.93	-0.85	-0.27	0.31	0.65	0.95
As CaCl ₂ selective extractant T0	0.32	0.04	-0.02	-0.01	-0.32	-0.32	1.00	0.00	-0.20	-0.23	0.07	0.15	-0.37	-0.18	0.01	-0.29
As NH ₄ NO ₃ selective extractant T0	-0.03	0.45	0.52	0.59	0.16	0.17	0.00	1.00	0.12	0.01	-0.04	0.01	0.40	0.47	-0.41	0.01
Pb CaCl ₂ selective extractant T0	-0.98	-0.52	-0.68	-0.50	0.98	0.98	-0.20	0.12	1.00	0.98	-0.97	-0.90	-0.31	0.21	0.76	0.94
Pb NH ₄ NO ₃ selective extractant T0	-0.99	-0.49	-0.71	-0.49	0.96	0.96	-0.23	0.01	0.98	1.00	-0.97	-0.92	-0.34	0.10	0.80	0.96
Aerial parts dry weight	0.95	0.45	0.69	0.48	-0.93	-0.93	0.07	-0.04	-0.97	-0.97	1.00	0.93	0.42	-0.07	-0.79	-0.89
Roots dry weight	0.91	0.51	0.74	0.54	-0.85	-0.85	0.15	0.01	-0.90	-0.92	0.93	1.00	0.20	0.16	-0.82	-0.79
[As] _{AP}	0.31	0.10	0.30	0.32	-0.29	-0.27	-0.37	0.40	-0.31	-0.34	0.42	0.20	1.00	-0.12	-0.34	-0.33
[As] _R	-0.16	0.01	0.27	0.24	0.31	0.31	-0.18	0.47	0.21	0.10	-0.07	0.16	-0.12	1.00	-0.30	0.28
[Pb] _{AP}	-0.75	-0.74	-0.94	-0.80	0.64	0.65	0.01	-0.41	0.76	0.80	-0.79	-0.82	-0.34	-0.30	1.00	0.71
[Pb] _R	-0.96	-0.50	-0.66	-0.43	0.96	0.95	-0.29	0.01	0.94	0.96	-0.89	-0.79	-0.33	0.28	0.71	1.00

T0, beginning of the experiment; TF, end of the experiment (13 days)

AP, aerial part; R, root

2.5. Conclusion

The soil of the former mining site used for this study (Pontgibaud soil) presents high concentrations of As and Pb, which inhibit the growth of endemic plants and induce a high risk of the spread of environmental metal(loid)s. However, the addition of various amendments (compost, biochar or slag) improves the physico-chemical characteristics of the soil by immobilizing metals, which allowed plant growth, and could therefore reduce the environmental risks associated to these contaminated soils.

In soil ecosystem surveys, consideration should be given to the phyto-available fraction of metals that may be transferred to the trophic chain, irrespective of the total metal(loid) content. Various extraction agents were used to assess the phyto-availability of the metal(loid)s. The CaCl_2 and NH_4NO_3 extracting procedures were shown to be appropriate methods for evaluating the mobility of lead in soil, but no informative results were obtained for arsenic. Other extraction methods should be tested for this element.

The addition of amendments promoting plant growth was correlated to the improvement of soil fertility and the reduction of metal(loid) phytotoxicity. This decrease in negative effects due to metal(loid)s could be due to specific chemical linkage between metal(loid)s and soil amendments, and the modification of metal(loid) speciation. These last hypotheses are currently being studied.

In view of the present results, it appears that the best treatment for a field application of an assisted phytostabilization strategy for the technosol of Pontgibaud would be amendments containing either biochar and compost, or biochar associated with slag.

With such combinations of amendments, a better plant growth, a low metal(loid) translocations in plants, and a decrease in As and Pb concentration in SPW was observed, allowing the threshold limit value for As and Pb to be reached. This will also contribute to stabilizing polluted soils, thus reducing dispersion of metal(loid)s by wind-blown soil transport or mobilization in groundwater. However, it should be noted that the experiments described here were only carried out for a very short time. For these reasons a field test is in progress to observe the effects of the proposed amendments on As and Pb soil stabilization as well as on the capacities of tree growth (*Salicaceae*) in such conditions.

3. Capacité de différents amendements associés à une culture de trèfle pour favoriser la stabilisation de l'As et du Pb dans le technosol de Pontgibaud

Cette partie, rédigée sous la forme d'un article intitulé "Potential use of biochar, compost and iron grit associated with *Trifolium repens* to stabilize Pb and As on a multi-contaminated technosol", soumis actuellement pour publication à la revue scientifique *Ecotoxicology and Environmental Safety* (article inséré de façon presque intégrale dans le présent paragraphe), s'inscrit dans la continuité directe des résultats présentés dans la partie 2 de ce chapitre. Elle expose les résultats obtenus en mésocosme concernant le comportement du trèfle sur le technosol de Pontgibaud différemment amendé.

3.1. Résumé

Le développement d'une couverture végétale dans les zones polluées ajoute de la valeur aux sites abandonnés tout en réduisant la dispersion des polluants par érosion. Des amendements appropriés doivent être choisis afin de permettre à la fois une croissance efficace des plantes et l'immobilisation des contaminants dans le sol afin d'optimiser l'efficacité de ce processus. Dans cette étude, nous avons utilisé un technosol minier pour étudier l'effet de trois amendements (biochar, compost et grenaille de fer) sur (i) les propriétés physico-chimiques du sol et de l'eau interstitielle, (ii) la mobilité, la biodisponibilité et la bioaccessibilité des métaux (CaCl_2 et SBET) et (iii) la capacité de *Trifolium repens* à germer et se développer. Tous les amendements utilisés ont induit une augmentation du pH et de la conductivité électrique des eaux porales, entraînant une diminution de 90 % de la concentration en plomb dans l'eau porale, ainsi qu'une diminution de sa biodisponibilité. Les amendements ont permis l'établissement d'un couvert végétal, cependant, lorsqu'elle a été ajoutée seule, la grenaille de fer n'a pas permis la germination du trèfle. Pour le technosol de Pontgibaud, la combinaison des trois amendements a entraîné une diminution significative des concentrations d'As et de Pb dans les tissus du trèfle, principalement dans les organes aériens. Les amendements ont également permis à certains d'entre eux de réduire de moitié la fraction phytodisponible de l'arsenic. Toutefois, dans le cas du compost, les concentrations en As dans l'eau porale et la fraction biodisponible de l'As ont augmenté. Tous les amendements utilisés ont eu des effets contrastés sur les fractions bioaccessibles des métaux. La combinaison d'amendements la plus efficace a été l'ajout de 5 % de biochar et de 5 % de compost.

3.2.Introduction

To reduce the risks linked to contaminated soils, remediation methods such as controlled backfilling, soil fixation, or leaching can be very useful. However, these methods are generally expensive, and some may even have negative effects on the biodiversity, biological activities, soil structure, or fertility (*Ali et al., 2013*). In contrast, environment-friendly remediation options, such as “aided phytostabilisation”, could improve soil functionality and allow a vegetation cover to be established, at the same time as reducing the mobility and availability of pollutants (*Cundy et al., 2013, 2016*). Plant cover may also reduce contaminant leaching (*Houben et al. 2012*), as well as stabilizing soils, and it controls water and wind erosion (*Reubens et al. 2007*). The implementation of plants will stabilize contaminants by adsorption or accumulation in roots (*Vangronsveld et al. 2009*). However, the translocation to the shoot system should remain limited to avoid the transfer of contaminants into the food chain through grazing (*Henry et al., 2013; Pérez-de-Mora et al., 2011; Kidd et al. 2009*).

The selection of an appropriate metal tolerant vegetation cover is critical, as it affects the efficiency of the phytoremediation process.

Trifolium repens has characteristics which have led to it being selected for restoring plant cover. Clover mainly stores metals and metal(loid)s in its roots (*Bidar et al., 2009*), and it enriches poor soils by fixing atmospheric nitrogen, which allows the development of other plant species. In addition, it has a high germination rate and good resistance to environmental stress conditions. It appears that its stoloniferous growth makes *Trifolium repens* able to colonize bare spaces in lawns and it can therefore be used in various revegetation strategies (*Bidar et al., 2007*). Previous studies using *Trifolium repens* in contaminated zones have focused on metal uptake and remediation (*Bidar et al., 2007, 2009; Lopareva-Pohu et al., 2011*), and have shown that *Trifolium repens* could therefore play a positive role in the metal phytoremediation strategy.

However, the extreme conditions encountered on polluted sites, i.e the high concentrations of toxic elements, the low pH, and the low organic matter content, do not usually allow plant growth. It is therefore essential to add mineral and organic amendments that could reduce the mobility of soil pollutants, and therefore their (phyto)availability (*Houben et al., 2012; Kumpiene et al., 2008; Lambrechts et al., 2011; Mench et al., 2003*), at the same time as increasing soil fertility in order to improve plant development (*Lopareva-Pohu et al., 2011*).

Biochar, used as an organic amendment, has received increasing attention in recent

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

years. It is a calcined carbon material produced by heating biomass in a closed system with a limited oxygen supply, using thermochemical technologies such as pyrolysis, gasification, or hydrothermal technologies (Xu *et al.*, 2013). In degraded soils it is used for its potentially beneficial effects on the environment. This includes increased soil fertility through improvement of the soil microbial activity, and reduction of pollutant mobility. It can also help reduce the greenhouse effect by long-term sequestration of carbon in the soil (Inyang *et al.*, 2016). Biochar can adsorb pollutants from the soil due to its microporous structure, high pH, cation exchange capacity, and its surface functional groups (Jiang *et al.*, 2012; Ding *et al.*, 2017).

However, biochar does not generally contain enough nutrients to allow plant growth on polluted soils, which are often characterized by low nutrient content (Fischer and Glaser, 2012). Extra nutrients, such as those found in compost must therefore be added alongside the biochar. The addition of compost will allow plant growth as it contains N, P, K, Ca, Mg, and S, as well as humus and different kinds of microorganisms (Fischer and Glaser, 2012; Gil-Loaiza *et al.*, 2016). Moreover, it can reduce the phytoavailability of metal(loid)s due to their association with organic matter (OM), carbonates, or metal oxides (Mench *et al.*, 2000), resulting in a reduction in the plant uptake of metals. But the effect of compost on metal bioavailability depends on the nature of the organic matter, the mineral species content, the potential degradability by microbiota, the pH and redox potential of the soil, and the soil type and metal(loid)s concerned (Walker *et al.*, 2003).

Although the application of biochar and compost has been shown to improve soil agronomic characteristics, as well as its ability to sorb and reduce metal cation availability such as Pb in soil, neither amendment is effective in decreasing the mobility of metal anions, such as arsenic. They even tend to increase anion soil mobility due to the rise in soil pH (Beesley *et al.*, 2011). This can cause problems in soils polluted with both cationic and anionic metal(loid)s. In such polluted sites, one possible strategy would be to combine compost and biochar with iron-rich amendments, or Mn oxides for metal(loid) immobilization (Ruttens *et al.*, 2006). Among these amendments, zero-valent iron, in the form of iron grit, is the most relevant type of iron (Kumpiene *et al.*, 2006), because its high adsorption potential has proved valuable in immobilizing inorganic contaminants (Liu and Zhao 2007; Satapanajaru *et al.*, 2008; O'day and Vlassopoulos, 2010).

Thus, to demonstrate the effectiveness of amendments and revegetation, it is essential to study the metal(loid) concentrations in the soil, soil pore water and plants *continuum*. However, as Lebrun *et al.* (2018) observed, the metal(loid) concentration in soil pore water

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

did not always reflect the amount available for plants. It is therefore interesting to measure this phytoavailable quantity by simple extraction tests. These plant availability tests can be performed using extractant salts to determine the more or less mobile fraction of metal(loid)s, to understand their availability for plants (*Qasim et al., 2015; Black et al., 2011*).

However, the metal(loid) phytoavailability is not the only parameter to be measured, as human exposure to pollutants must also be taken into account. This exposure can include inhalation, oral ingestion or dermal absorption. One of the most common exposure pathways is the accidental ingestion of polluted soils (*Luo et al., 2012*). Such risk of metal(loid) exposure is often evaluated by a conservative approach in which the total metal(loid) content of the soil is measured. However, it is often pointed out that the risk for the exposed individual is only related to a small fraction of the total metal(loid)s, which is referred to as the bioaccessible fraction. To measure the bioaccessible fraction, various *in vitro* methods have been developed. They are usually simple and quick to manage, relatively inexpensive and do not raise ethical concerns (*Deshommes et al., 2012*). Some of these methods evaluate the fraction of ingested metal(loid)s that are soluble in the gastrointestinal tract (*Mendoza et al., 2017; Wijayawardena et al., 2017*) and therefore available in the blood flow. The SBET procedure consists of an acid extraction that imitates the gastric compartment where the bioaccessibility is the strongest (*Ruby et al., 1996; Casteel et al., 1997*).

The objectives of this study were to evaluate: (1) the capacity of biochar, compost and iron grit to reduce As and Pb phytoavailability when added to a multi-contaminated technosol by measuring their concentrations in soil pore water and by using a CaCl_2 neutral salt extractant; (2) whether clover can be used to set up a vegetative cover and (3) the bioaccessibility of Pb and As in soil and in the aerial part of clover plants grown on amended soil, using the SBET approach.

3.3. Materials and methods

3.3.1. Preparation of amended soils - Seed sowing and plant biomass

The soil chosen for this study came from the slag heaps of the former Pontgibaud mine site. Six different soil samples were tested: polluted soil (P_s), (P_s) amended with 5 % (w/w) of hardwood-derived biochar (P_sB), (P_s) amended with 5 % (w/w) of compost (P_sC), (P_s) amended with 1.5 % (w/w) of iron grit (P_sI); (P_s) amended with 5 % (w/w) of hardwood-derived biochar and 5 % (w/w) of compost (P_sBC) and (P_s) amended with 5 % (w/w) of hardwood-derived biochar and 1.5 % (w/w) of iron grit (P_sBI).

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

Three replicates of the different mixtures were placed in rectangular pots with a capacity of 5 liters, and a surface area of 360cm² (24cm x 15cm). The bases of the pots were covered with clay beads to keep the soil mixture in the pots when watering. Each pot was divided into 2 compartments: one non-vegetated (NV), and the other vegetated (V), with 500 clover seeds, which had a measured germination rate of 91%. The experiment was carried out in a controlled growth chamber under the following conditions: day/night temperatures (25°C/16°C), 16 hours of light/8 hours of darkness and with a light intensity of 800 µmol.m⁻².s⁻¹.

The experiment lasted 30 days. The plants were then separated from the soil. The roots were washed thoroughly with tap water and rinsed with distilled water to remove soil particles attached to the roots. Next, the plants were divided into two: the root system and the aerial parts (shoots and leaves). Finally, the plant organs were dried in an oven at 55 °C (until they were a constant weight), and the dry weight of the organs (DW) was determined.

3.3.2. Soil pore water (SPW) sampling and analysis

The sampling was done before sowing the clover seeds (T0) and at the end of the greenhouse experiment (TF) (30 days).

3.3.3. Metal(loid) bioaccessibility test for soil samples (SBET) and plant organs

According to the method developed by Mendoza *et al.* 2017, crushed dry material from tested soils or plant upper parts were put in a glycine solution 0.4 mol.L⁻¹ adjusted to pH 1.5 at a concentration of 1%. The suspension was shaken for 1 h at 37 ± 1 °C, then filtered through a 0.45 µm pore size membrane with syringe filter and stored at 4 °C until analysis. Metal(loid) concentrations were determined by ICP-AES (ULTIMA 2, HORIBA, Labcompare, San Francisco, USA).

3.3.4. Data processing and statistical analysis

The statistical tests were performed using the statistical software R version 3.1.2 (R Development Core Team, 2009) for the times studied (T0 and TF) and the plant effect (no vegetation, clover)

3.4. Results and discussions

3.4.1. Effect of amendments on soil characteristics

All tested amendments apart from iron induced an increase in WHC, averaging 10% for compost, and 30% for biochar. Biochar showed real efficiency in retaining water due to its structure, which contains a large volume of pores (*Pietikäinen et al., 2000; Warnock et al., 2007*). However, these results are inconsistent with those obtained when measuring WHC on isolated compost and biochar, which were 299% and 183% respectively (Table 3.7).

Table 3.7: Physico-chemical properties of amendments. EC: Electrical Conductivity ($\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$), Water holding capacity (WHC) (% mass). Results are expressed as the mean value $\pm$ standard error ($n = 3$).

	Compost	Biochar	Iron grit
Granulometry (mm)	ND	0.2 – 0.4	<1
pH	5.50 ± 0.02 b	8.98 ± 0.02 a	ND
EC ($\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$)	2083 ± 275 a	432 ± 2 b	ND
WHC (%)	299 ± 0 a	183 ± 3 b	ND

ND: Not Determined

This difference is certainly related to the fact that the compost is compressed when it is added to Pontgibaud soil, meaning it is no longer able to expand in order to retain such a large quantity of water. Biochar is less subject to compressive stress when added to the Pontgibaud soil due to its porous and rigid structure, and therefore maintains its water retention characteristics.

None of the treatments affected the As pseudo-total concentrations compared to P_s. The iron concentration in Pontgibaud soil was 6325 mg kg^{-1} , and the addition of amendments, apart the iron grit, did not induce a significant change in iron soil concentration. The iron grit addition in P_sI and P_sBI caused the pseudo-total Fe soil concentration to increase by approximately 3 times. Lastly, the pseudo-total Pb soil concentrations in the different tested soils were the same for P_s, P_sI, P_sC, P_sB and P_sBI, whereas for P_sBC, Pb concentration decreased by 30% compared to P_s due to a dilution effect produced by the addition of compost and biochar (Table 3.8).

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

Table 3.8: Physico-chemical characteristics of tested soils at the beginning of the experiment (T0). WHC: water holding capacity (% mass), TOC: total organic carbon (% mass) and soil As, Fe and Pb concentrations (mg.kg⁻¹) and CaCl₂-extractable fraction (%). Ps: polluted soil, PsI: Ps + iron grit (I) 1.5%, PsC: Ps + compost (C) 5%, PsB: Ps + biochar (B) 5%, PsBI: Ps + B 5% + I 1.5%, PsBC: Ps + B 5% + C 5%. Results are expressed as the mean value ± standard error (n = 5). Letters indicate treatment significant difference (p < 0.05).

treatments	WHC (%)	TOC (%)	Pseudo-total concentrations (mg.kg ⁻¹)			CaCl ₂ -extractable fraction (%)		
			[As]	[Fe]	[Pb]	[As]	[Fe]	[Pb]
Ps	29.80±0.47 e	0.04	1068±20 a	6325±114 b	23387±1020 a	0.11±0.01 a	0.06±0.02 a	2.15±0.19 b
PsI	28.11±0.38 f	0.04	1007±52 a	23248±4341 a	18420±1422 ab	0.07±0.01 b	0.08±0.01 a	2.75±0.06 a
PsC	32.75±0.49 d	0.87	906±44 a	5407±205 b	18882±670 ab	0.13±0.01 a	0.02±0.01 b	0.12±0.03 d
PsB	40.11±0.48 b	3.28	1003±18 a	5960±103 b	18927±555 ab	0.05±0.01 b	0.01±0.00 b	1.59±0.06 c
PsBI	36.83±0.26 c	4.03	990±17 a	20090±2410 a	18903±435 ab	0.05±0.01 b	0.06±0.01 a	1.60±0.09 c
PsBC	44.55±2.06 a	3.89	842±41 a	4973±296 b	16419±295 b	0.06±0.01 b	0.02±0.01 b	0.17±0.04 d

Results are expressed as the mean value ± standard error (n = 5). Letters indicate treatment significant difference (p < 0.05).

3.4.2. Effect of amendments and clover plants on SPW characteristics

At the beginning of the experiment, neither time nor the presence of clover significantly modified the SPW pH of Pontgibaud soil (Ps) which was approximately 4.08 (Table 3.9).

Table 3.9: Physico-chemical characteristics of the soil pore water of tested soils at the beginning of the experiment (T0) and after 30 days (TF). Non-vegetated soils corresponded to TF-NV and vegetated soils corresponded to TF-V. EC: Electrical Conductivity (mS.cm⁻¹), DOC: dissolved organic carbon (mg.L⁻¹) and As, Fe and Pb concentrations (mg.L⁻¹). Ps: polluted soil, PsI: Ps + iron grit (I) 1.5%, PsC: Ps + compost (C) 5%, PsB: Ps + biochar (B) 5%, PsBI: Ps + B 5% + I 1.5%, PsBC: Ps + B 5% + C 5%.

treatments		pH	EC (mS.cm ⁻¹)	DOC (mg.L ⁻¹)	[As] (mg.L ⁻¹)	[Fe] (mg.L ⁻¹)	[Pb] (mg.L ⁻¹)
Ps	T0	3.98±0.20 a	0.220±0.09 a	5.7±0.3 a	0.00±0.00 a	0.05±0.02 a	11.25±0.41 a
	TF-NV	4.02±0.16 a	0.916±0.063 b	5.9±0.6 a	0.03±0.00 b	0.09±0.02 a	8.08±1.60 a
	TF-V	4.24±0.18 a	0.761±0.067 b	5.4±0.1 a	0.02±0.00 b	0.02±0.01 a	5.46±1.52a
PsI	T0	4.51±0.03 a	0.315±0.025 a	4.8±0.2 a	0.00±0.00 a	22.47±0.45 a	5.92±0.25 a
	TF-NV	4.02±0.03 b	0.797±0.044 b	4.9±0.4 a	0.00±0.00 a	59.03±6.04 b	5.06±0.51 a
	TF-V	4.09±0.06 b	0.822±0.039 b	4.8±0.5 a	0.00±0.00 a	50.16±14.61 b	3.46±0.52 a
PsC	T0	6.32±0.15 a	0.926±0.095 a	23.4±0.2 a	0.09±0.01 a	0.01±0.01 a	0.61±0.12 a
	TF-NV	6.97±0.19 a	1.824±0.085 b	21.9±6.8 a	0.43±0.09 b	0.00±0.00 a	0.18±0.06 a
	TF-V	6.95±0.11 a	1.295±0.134 a	24.9±6.7 a	0.34±0.11 b	0.01±0.01 a	0.15±0.07 a
PsB	T0	6.70±0.04 a	1.176±0.079 a	2.0±0.2 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.58±0.04 a
	TF-NV	7.04±0.13 ab	2.785±0.042 b	2.1±0.5 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.54±0.01 a
	TF-V	7.16±0.13 b	2.433±0.082 c	1.9±0.1 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.61±0.07 a
PsBI	T0	6.60±0.10 a	1.088±0.035 a	5.7±0.5 a	0.00±0.00 a	2.51±0.33 a	0.88±0.21 a
	TF-NV	4.53±0.09 b	3.196±0.047 b	5.8±0.4 a	0.00±0.00 a	107.64±16.24 b	1.78±0.18 a
	TF-V	4.47±0.04 b	2.634±0.064 c	5.6±0.4 a	0.00±0.00 a	83.09±23.34 b	1.44±0.13 a
PsBC	T0	7.31±0.09 a	1.232±0.094 a	10.7±0.2 a	0.06±0.01 a	0.00±0.00 a	0.15±0.02 a
	TF-NV	7.64±0.15 ab	2.573±0.019 b	10.6±0.9 a	0.15±0.06 b	0.00±0.00 a	0.06±0.01 a
	TF-V	7.75±0.13 b	2.255±0.199 b	10.8±0.8 a	0.12±0.05 b	0.00±0.00 a	0.15±0.04 a

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

amendments effect T0	***	***	***	***	***	***
amendments effect NV	***	***	***	***	***	***
amendments effect V	***	***	**	***	***	***

Results are expressed as the mean value $\pm$ standard error ($n = 5$). For each treatment, letters indicate time and vegetation effect ($p < 0.05$). Amendments effect is represented by asterisk, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

Iron grit application to P_s allowed a 0.5 unit increase in SPW pH, whereas time and clover growth induced a significant decrease in SPW pH (0.5 units). Compost (C), biochar (B), biochar + iron grit in combination (BI) and biochar + compost in combination (BC) increased P_s SPW pH by 2.3 units, 2.7 units, 2.6 units and 3.3 units, respectively. It is noted that clover growth impacted SPW pH for P_sB and P_sBC by 0.45 units, whereas for these treatments on non-vegetated pots, time did not allow any significant pH modification. The alkalization of SPW due to the addition of biochar has already been demonstrated by Lebrun *et al.* (2018) when 5% pinewood biochar was added to Pontgibaud soil, inducing a 2.7 pH unit increase. Moreover, Beesley *et al.* (2014) showed that the SPW pH of a contaminated soil increased by more than three units when compost combined with biochar was added. The improvement in pH following the application of biochar or compost can be attributed to: (i) the alkalinity of the biochar (Table 3.7) which induced a liming effect (Lebrun *et al.*, 2017); (ii) the dissolution or addition of alkali metals, and (iii) the presence of functional groups on the surface of the biochar, such as carbonyls, phenols, carboxyls and pyrones (Marks *et al.*, 2014; Lebrun *et al.*, 2018c).

Finally, for P_sBI the pH decreased by two units over the time period of the treatment. This can be explained by the fact that the iron was oxidized during the experiment thus inducing the SPW pH decrease.

At T0, the SPW electrical conductivity (EC) for P_s and P_sI was 0.220 mS.cm⁻¹ and 0.315 mS.cm⁻¹ respectively. For the other treatments, at T0, EC value was approximately 1.1 mS.cm⁻¹. At the end of the experiment, an increase in EC was observed compared to T0 on all tested non-vegetated soils, and corresponded to 4.2 fold, 2.5 fold, 2 fold, 2.4 fold, 3 fold and 2.1 fold for P_s, P_sI, P_sC, P_sB, P_sBI, P_sBC, respectively. The presence of clover had no effect on P_s, P_sI and P_sBC, while for P_sC, P_sB and P_sBI it caused a 1.3 fold EC decrease when compared to the corresponding non-vegetated pots. Overall, biochar and compost significantly increased SPW EC ($p < 0.05$), which is consistent with previous studies (Lebrun *et al.*, 2017, 2018a). Indeed, organic matter and mineral compounds such as Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺ or inorganic carbonates present on biochar and compost can be released into the soil and thus increase SPW electrical conductivity (Chintala *et al.*, 2013). Kloss *et al.* (2014) demonstrated an increase in EC from 0.04 dS.cm⁻¹ to 0.19 dS.cm⁻¹ when 3% straw biochar was applied to a

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

planosol. Finally, iron grit must be solubilized and mostly precipitated in the form of iron oxide on soil particulates, which is why it did not induce a large increase in the specific EC value.

The DOC content of SPW at T0 (Table 3.9) for P_s was 5.7 mg.L⁻¹, which is identical to that of P_sBI. Moreover, the DOCs for P_sB and P_sBI were 2.8 fold and 1.2 fold smaller than P_s. On the contrary, DOC for P_sC and P_sBC were 3.7 and 1.9 fold higher than for P_s. It should be noted that neither the time nor the presence of clover modified the DOC.

A decrease in DOC was observed in previous studies when biochar was added to various soils (Lu *et al.* 2014; Kloss *et al.*, 2014; Jain *et al.*, 2014). This has been explained by the structure of the biochar, which contains sorption sites able to bind soluble organic compounds (Hass *et al.*, 2012). Treatments containing compost (i.e P_sC and P_sBC) showed higher levels of DOC, which could be explained by the fact that even though the compost is composed of refractory humified material, labile fresh organic matter is also present (Lefevre, 2015).

3.4.3. SPW metal(loid) concentrations and phytoavailable metal(loid)s

At T0 (Table 3.9), no As content was detected for P_s, P_sI, P_sB and P_sBI SPW whereas for P_sC and P_sBC, As concentrations were 0.09 mg.L⁻¹ and 0.06 mg.L⁻¹, respectively. Both the passage of time, and the presence of clover plants increased As SPW for these last two treatments, by 2 fold and 4 fold respectively. For P_s, at TF, As SPW concentration could be quantified, and corresponded to 0.03 mg.L⁻¹ and 0.02 mg.L⁻¹, for TF-NV and TF-V, respectively. The As soil phytoavailable fractions (CaCl₂-extractable fraction) for P_s and P_sC at T0 were not significantly different and corresponded on average to 0.11 % of the total soil As concentration (Table 3.8). Whereas for the other treatments P_sI, P_sB, P_sBI and P_sBC, As phytoavailability was 1.9 times smaller than P_s. Arsenic is usually found as an oxyanion in solutions, and presents specific challenges to sanitation, because its mobility increases when pH increases (Beesley *et al.*, 2011). It was shown that the addition of compost may increase the mobility and leachability of metal(loid)s, particularly arsenic (Mench *et al.*, 2003). In the present study, a significant increase in arsenic SPW concentration was observed when compost was added to soils, probably because DOC competed with arsenic for sorption sites, such as those present in iron oxides, resulting in its increased mobility (Bolan *et al.*, 2014). Compost with a high degradable organic matter content, associated to a neutral pH, present an active microbial activity which uses the organic matter as energy source (Balasoïu *et al.*, 2001). This means that compost and its microbiota could reduce the soil redox potential, and

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

consequently support the transformation of As(V) to As(III), which is more mobile (*Kim et al.*, 2003). This high mobility could also be explained by the presence of phosphorus. Indeed, *Fresno et al.* (2018) showed that phosphorus-Olsen had a significant effect on mobilizable As, as phosphate and arsenate have similar chemical properties, and they compete for organic and inorganic binding sites (*Adriano*, 2001; *Moreno-Jiménez et al.*, 2013; *Bolan et al.*, 2014). Other authors (*Clemente et al.*, 2012; *Moreno-Jiménez et al.*, 2013; *Beesley et al.*, 2014) have already reported that competition for mineral sorption sites between these anions can be expected, which will lead to arsenic mobilization from less labile soil fractions and increase its availability. It is important to note that the phytoavailable fraction of arsenic was identical for the P_s and P_sC treatments, suggesting that compost influenced the easily mobilizable fraction found in pore water, but not the CaCl₂ extractable fraction. Moreover, the decrease in As concentration observed between P_sB and P_sBC both at T0 and at TF (Table 3.9) could be explained by: (i) the mobile part of arsenic potentially being trapped in the biochar structure; (ii) DOC decrease after biochar addition resulting in less competition between dissolved organic matter and arsenate; and (iii) the calcite present in the biochar could form stable spherical compounds with arsenate anions on the biochar's surface (*Alexandratos et al.*, 2007; *Yin et al.*, 2016).

At T0, the SPW iron concentration (Table 3) for P_s was 0.05 mg.L⁻¹. No soluble Fe was quantified in SPW for P_sC, P_sC and P_sBC. As expected, Fe concentration in P_sI and P_sBI treatments were 450 times and 50 times higher than P_s, respectively. Moreover, for P_sI and P_sBI, no significant difference in SPW Fe concentration was observed at TF between non-vegetated and vegetated pots. Although at TF, SPW Fe concentration increased by 2.4 fold for P_sI and 38 fold for P_sBI. The values for the Fe-CaCl₂-extractable fraction (Table 3.8) for P_s, P_sI and P_sBI, were not significantly different, and were all between 0.06 % and 0.08 %. Finally, compost or biochar added to P_s soil, alone or in combination (P_sB, P_sC and P_sBC), led to a significant decrease in the Fe-CaCl₂-extractable fraction (3.5 fold).

As expected, lead was the most prevalent ion in Pontgibaud SPW (11.25 mg.L⁻¹), at T0, and on top of that, no significant difference was measured between T0 and TF for P_s, or any of the other studied treatments. The SPW Pb concentrations for P_sI, P_sC, P_sB, P_sBI and P_sBC were 4.8 mg.L⁻¹, 0.3 mg.L⁻¹, 0.6 mg.L⁻¹, 1.4 mg.L⁻¹ and 0.12 mg.L⁻¹, respectively. For the Pb-CaCl₂-extractable fraction (Table 1) four different significant groups were identified P_sI 2.75 %; P_s 2.15 %; P_sB and P_sBI 1.6 %; and P_sC and P_sBC 0.15 %.

Compost and biochar + compost appeared to be the treatments that decreased the

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

phytoavailable Pb fraction the most significantly, suggesting that the high pH and organic content of these amendments reduce the lead mobility in the soil. As is well known, SPW metal mobility is strongly influenced by organic carbon, which is brought to the soil by the biochar and compost (*Bolan et al., 2014*). Furthermore, higher pH values are known to increase the surface charges of soil particles including amendments, which induces the retention of metal (*Perez-Esteban et al., 2014; Boisson et al., 1999; Mench et al., 1998, 2000*). These amendments can immobilize metal(loid)s via three mechanisms (*Mench et al., 2000*): (i) adsorption of metals to highly accessible sites on the surface of modified aluminosilicates and soil components; (ii) precipitation with Al, Fe and Mn oxides and (iii) formation of minerals (such as metal silicates) and diffusion through mineral surfaces (*Lee et al., 2013*).

3.4.4. Metal(loid) bioaccessibility in soil

The SBET (Simple Bioaccessibility Extraction Test) was used to assess the oral bioaccessibility of As, Fe and Pb in soil samples (*Mendoza et al., 2017*). This method simulates the human gastric phase, and was validated by the EPA (*USEPA, 2012*). The results for the present study are presented in Table 3.10.

Table 3.10: As, Fe and Pb bioaccessible fractions (%) in tested soils using SBET (Simplified Bioaccessibility Extraction Test). Ps: polluted soil, PsI: Ps + iron grit (I) 1.5%, PsC: Ps + compost (C) 5%, PsB: Ps + biochar (B) 5%, PsBI: Ps + B 5% + I 1.5%, PsBC: Ps + B 5% + C 5%.

treatments	SBET bioaccessible fractions (%)		
	[As]	[Fe]	[Pb]
Ps	3.24±0.07 c	1.32±0.21 b	51.12±0.61 d
PsI	1.58±0.09 d	2.43±0.24 c	53.00±2.36 cd
PsC	4.38±0.20 b	2.12±0.14 bc	60.54±1.04 b
PsB	4.12±0.15 b	1.68±0.07 b	59.52±2.04 bc
PsBI	1.97±0.12 d	4.14±0.32 a	54.08±2.79 cd
PsBC	5.11±0.14 a	2.46±0.10 c	69.49±1.18 a

Results are expressed as the mean value ± standard error (n = 5). Letters indicate treatment significant difference (p < 0.05).

The bioaccessible arsenic concentration for Ps was 3.2% and decreased for PsI and PsBI treatments by 2.1 and 1.8 times respectively, compared to Ps. This is because the iron oxide formed strongly adsorbed As. Many studies (*Martin and Ruby 2003; Subacz et al., 2007*) have shown that use of Fe-rich amendments (FeCl₃, FeCl₂·4H₂O, Ferrihydrite, Fe⁰ and FeBr₃) could be an effective strategy for reducing bioavailability and bioaccessibility, and for remediating soils contaminated with As. Cui *et al.* (2010) demonstrated that the addition of FeSO₄ to a mining technosol decreased gastric and intestinal bioaccessibility of arsenic in all treatments. Finally, the bioaccessible arsenic fraction for PsC, PsB and PsBC treatments was

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

almost 1.4 times higher than for P_s . This could be explained by the fact that anions such as bicarbonate, phosphate, silicate, and organic acids present in the soil solution due to the addition of compost and biochar to P_s could compete with As for chemisorption sites, and thus mobilize As to the aqueous phase. The links between biochar and arsenic, and between compost and arsenic are weak and therefore easily broken by the glycine present in SBET solution. This would explain the greater As accessibility for P_sC , P_sB and P_sBC .

The iron bioaccessible fraction for P_s was 1.3 %, which demonstrates its high stability in soil. When compost and biochar were added to P_s (P_sC and P_sB), Fe accessibility was unchanged. As expected, the addition of iron to P_s or P_sB led to an increase in accessible-Fe, by 1.9 and 3.1 fold, respectively. Interestingly, for P_sBC , the iron bioaccessible fraction was almost twice the value measured for P_s . This was probably due to the destabilization of iron oxides by the increase in organic ligands following the addition of biochar and compost.

Finally, the bioaccessible Pb proportion was high regardless of the treatment. For the P_s treatment, just over half of the total lead (51 %) was bioaccessible, which shows its low stability in soil. This could be explained by the low pH (pH = 1.5) and the presence of organic ligands in the gastric solution which may have favored the dissolution and desorption of the minerals containing lead (Cui *et al.*, 2010). Iron did not affect the Pb accessible fraction when added to P_s or P_sB . Similarly, a recent study showed that a highly adsorbent Mn oxide added in large quantities (10% by weight) to a Pb polluted soil produced no change to the Pb bioaccessible fraction (McCann *et al.*, 2015). When compost or biochar were added to P_s , whether alone or in combination, the Pb accessible fraction increased between 1.2 and 1.4 times. This result was probably due to the establishment of even weaker links between the lead and compost and lead and biochar than those that may exist between lead and soil particles in the technosol P_s .

3.4.5. Plant growth and metal(loid) uptake

After 30 days of growth, the clover dry weight (DW) and the metal(loid) concentrations in the roots and aerial parts were measured for the different treatments (Figure 3.4).

Firstly, it was noted that when iron was added alone to P_s the seeds could not germinate.

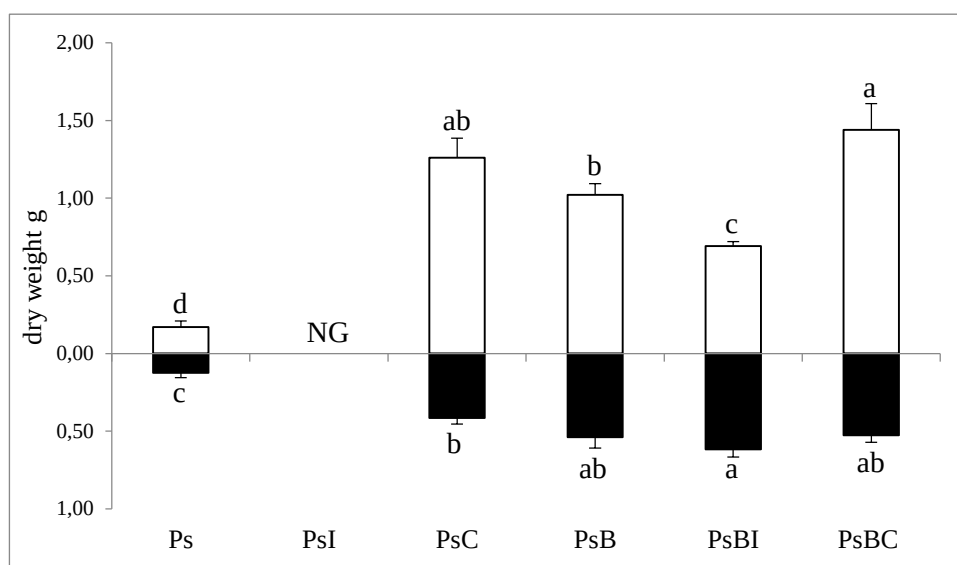


Figure 3.4: *Trifolium repens* dry weight (DW) (g) of organs collected at the end of the experiment (30 days); white columns: aerial parts, black columns: roots. Results are obtained from 500 seeds sown on tested soils. Ps: polluted soil, PsI: Ps + iron grit (I) 1.5%, PsC: Ps + compost (C) 5%, PsB: Ps + biochar (B) 5%, PsBI: Ps + B 5% + I 1.5%, PsBC: Ps + B 5% + C 5%. Results are expressed as the mean value and bars indicate standard error (n=5); letters indicate significant difference (p<0.05). NG: no germination.

This was probably due to the high iron concentration in the soil pore water at T0. Indeed, when just iron grit was added to Ps the concentration of Fe in the SPW was 22.5 mg L⁻¹, whereas when iron grit was added to Ps at the same time as biochar (PsBI), the Fe SPW concentration was 2.5 mg L⁻¹ due to the biochar's physico-chemical characteristics. Iron alone seemed to have an acidifying effect, certainly due to the oxidation of Fe(II) followed by the precipitation of Fe(OH)₃. Thus, the combination of high Fe supply and acidity induced a high solubility and Fe availability. In the presence of biochar, the pH effect was attenuated. However, it was noted that the smallest increase in the biomass of aerial parts was observed for PsBI treatment (0.623 g). For the Ps treatment, the dry weights of the roots and aerial parts were smaller, and corresponded to 0.124 g and 0.170 g, respectively. For the roots, PsC, PsB and PsBC DW were not significantly different and corresponded to four times the value for Ps.

For PsC, PsB and PsBC, the average DW of the aerial parts was 1.24 g, i.e. 7 times the value measured in Ps pots. The same beneficial effect for the DW of *Salix viminalis* and *Populus euramericana* cuttings was obtained by Lebrun *et al.* (2018a) when adding biochar produced from different feedstocks (hardwood, lightwood and pinewood, at 2% and 5% w/w) to Pontgibaud technosol. Fresno *et al.*, (2018) showed that iron combined with bio-char on an As and Cu contaminated technosol slightly increased lupine shoot biomass. In our case, even though biochar allowed a better biomass production of clover aerial parts, the compost addition to biochar improved DW production by 30%. Indeed, organic matter, provided by the compost improved the N, P, K nutrient cycle (Marques *et al.*, 2008), allowing better plant

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

growth, as observed by Marques *et al.* 2008 on *Solanum nigrum* and Gregory *et al.* (2014) on *Lolium perenne* grown on polluted soils

Concerning the concentrations of ions in clover organs (Figure 3.5), we noticed that the amendments systematically decreased the As and Pb concentrations in aerial parts by about 1.8 times for arsenic and between 1.8 and 3.8 times for lead, whereas As and Pb concentrations in P_s plants were 396 mg kg⁻¹ and 4577 mg kg⁻¹, respectively.

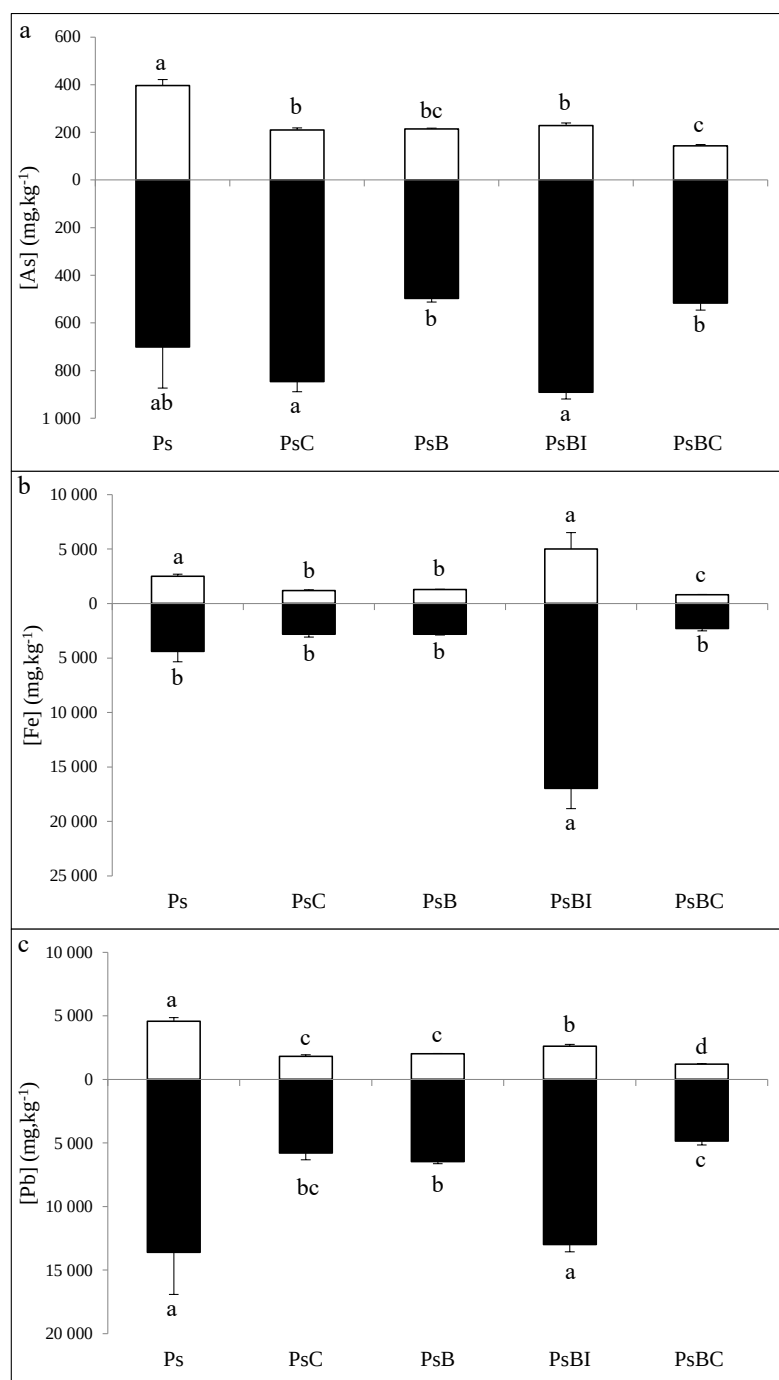


Figure 3.5 : Arsenic (a), iron (b) and lead (c) concentration (mg.kg⁻¹) in the different *Trifolium repens* organs collected at the end of the experiment (30 days); white columns: aerial parts, black columns: roots. Results are obtained from 500 seeds sown on tested soils. Ps: polluted soil, PsI: Ps + iron grit (I) 1.5%, PsC: Ps + compost (C) 5%, PsB: Ps + biochar (B) 5%, PsBI: Ps + B 5% + I 1.5%, PsBC: Ps + B 5% + C 5%. Results are expressed as the mean value and bars indicate standard error (n=5); letters indicate significant difference (p<0.05).

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

In roots, As concentrations were only decreased by P_sB and P_sBC treatments, and corresponded to 500 mg kg⁻¹, whereas for P_s, P_sC and P_sBI, As concentrations were approximately 812 mg kg⁻¹. For Pb concentrations in roots, P_s and P_sBI demonstrated the same accumulation i.e 13300 mg kg⁻¹, whereas P_sC, P_sB and P_sBC decreased root Pb concentration by 2.4 fold. As expected, iron concentration was highest in clover plants grown on the P_sBI soil, with concentrations of 5000 mg kg⁻¹ and 17000 mg kg⁻¹ in aerial parts and roots, respectively. Whereas for P_s, P_sC, P_sB and P_sBC treatments Fe concentrations in aerial parts were 2500, 1200, 1300 and 800 mg kg⁻¹, respectively. Finally, Fe concentrations in roots for P_s, P_sC, P_sB and P_sBC were not significantly different, and corresponded to 3100 mg kg⁻¹, which was 5.5 times lower than the Fe concentration measured in roots of plants grown on the P_sBI soil. In the present study, for all treatments, As, Fe and Pb concentrations were higher in the roots than in the aerial parts of clover. This is consistent with the results of Bidar *et al.*, (2007, 2009) and Lopareva-Pohu *et al.*, (2011) for *Trifolium repens* growing on metal(loid) contaminated soil. However, it is difficult to distinguish between the elements fixed to the root surface and those that are absorbed. We observed, a significant As, Fe and Pb concentration decrease in the aerial parts for all treatments, apart from for plant Fe accumulation levels on the P_sBI treatment. For Pb and Fe, this decrease could be associated to a significant diminution of the two ions in the soil pore water, correlated to the amendments. Interestingly we demonstrated that compost being added to P_sC and P_sBC soils was associated with an increase in As concentrations in the soil pore water, whereas As concentrations in the aerial parts decreased compared to P_s. Such results could be associated to a probable change in the chemical form of As, which is certainly less assimilable for clover plants. In fact, the plant metal(loid) absorption depends on different parameters, relative both to the plant (such as root exudations), and to the soil characteristics (such as oxidation-reduction processes in the soil, pH, cation exchange capacity, dissolved oxygen, and temperature), which modify the metal(loid) speciation (Cheng, 2003).

The high concentration of As in the roots for the P_sBI treatment compared to the P_sB and P_sBC treatments, which have similar biomasses and phytoavailable arsenic, could be due the mobilization of As by root exudates in soils treated with iron (Fresno *et al.* 2016). Another explanation could be that the precipitation of iron oxides on the roots causes an indirect increase in arsenic on the roots. The SBET bioaccessible fraction (Table 3.11) was only measured for the aerial parts of clover plants grown on amended soil. We were not able to do these measurements for aerial parts of clover grown on Pontgibaud soil (P_s) due to poor plant

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

biomass.

Table 3.11: As, Fe and Pb bioaccessible fractions (%) in *Trifolium repens* aerial parts collected at the end of the experiment (30 days) on amended soils. Results are obtained from 500 seeds sown on tested soils. PsC: Ps + compost (C) 5%, PsB: Ps + biochar (B) 5%, PsBI: Ps + B 5% + I 1.5%, PsBC: Ps + B 5% + C 5%.

treatments	SBET bioaccessible fractions (%)		
	As	Fe	Pb
PsC	8.2±0.5 a	2.3±0.2 b	34.6±2.2 b
PsB	5.5±0.7 b	2.3±0.4 b	34.7±1.8 b
PsBI	3.6±0.2 b	16.4±3.0 a	64.2±3.7 a
PsBC	9.5±0.6 a	2.9±0.2 b	42.5±2.6 b

Results are expressed as the mean value ± standard error (n=5); letters indicate significant difference (p<0.05).

The bioaccessible As fraction was significantly larger for clover plants grown on soils containing compost (Table 3.11). Thus, the SBET bioaccessible As fraction for clover plants collected on PsC and PsBC soils was 8.2 % and 9.5 %, respectively. These values were twice as high as those calculated for clover aerial parts collected on PsB and PsBI soils. The PsB and PsBI soils were the treatments with the lowest As SBET bioaccessible fraction. Finally, we demonstrated that the PsBI soil allowed the highest Fe and Pb bioaccessible fractions for clover aerial organs. On average this increase was 6.6 and 1.7 times the average value measured for the other amendments tested, respectively. It was also noted that lead was the most accessible element measured in the clover aerial organs. Between 34 % and 64% of all lead was part of the bioaccessible fraction and could therefore potentially be released into the gastric tract. In addition, our results for lead were significantly higher (2 to 6 times higher), than those obtained in the gastric phase for edible parts of spinach, lettuce, radish and carrot plant grown on a poly-metallic polluted soil (*Intawongse and Dean 2008*).

It has been explained that the SBET bioaccessible fraction of ions in plant organs is correlated to the chemical form, location and concentration of the ion, as well as the compounds to which it is potentially associated within the plant tissues, such as fibers, polyphenols and phytates (*Labronici-Bertin et al., 2016; Machado et al., 2017*). These specific tissue locations for As and Pb are linked to plant metal(loid) tolerance. Indeed, Chou and Shen (2007) and Fu and Cui (2013) proposed that metal(loid)s are mainly found in the vacuole and cell wall, which contains polysaccharides and proteins which are composed of many oxhydryl, carboxyl, aldehyde and phosphate groups, which show affinity with metal(loid)s. Therefore, these groups could form bonds to reduce metal(loid) activity, which could modify their bioaccessible fraction.

3.5. Conclusion

In the present study, we demonstrated that the addition of amendments (compost, biochar or iron grit, alone or combined) to an As and Pb polluted soil could be efficient in reducing As and Pb soil mobility and availability. In addition, the amendments allowed the establishment of a clover cover on a soil that had previously been resistant to any plant development. The most appropriate treatment for the studied technosol was 5 % biochar combined with 5 % compost. It resulted in a decrease in As and Pb concentrations in both clover roots and aerial parts. However, while the Pb concentration in SPW decreased significantly, the As concentration increased, although it did remain within environmentally acceptable values. It should also be noted that the bioaccessible As and Pb soil fractions increased significantly following the addition of amendments. In our case, the use of iron grit did not give the expected positive results, and in particular inhibited clover germination. The use of iron grit in our case is not a viable alternative for arsenic immobilization and will therefore have to be replaced by a more appropriate amendment.

Finally, field tests using the selected combination of amendments are currently being undertaken to demonstrate the role of clover leaf cover in stabilizing soil particles, and preventing the dispersion of arsenic and lead into the environment by wind or surface runoff.

4. Etude l'association du saule et du trèfle

Cette partie, également rédigée sous la forme d'un article "*Association of Salix and Trifolium for in-situ phytostabilisation of Pb and As in mine tailings amended with biochar*" (article inséré de façon presque intégrale dans le présent paragraphe), s'inscrit dans la continuité directe des résultats présentés dans la partie 3 de ce chapitre. Elle expose les résultats obtenus en mésocosme sur le comportement du trèfle et du saule en association sur le technosol de Pontgibaud amendé avec du biochar.

4.1. Résumé

Les terres contaminées représentent un risque important pour l'environnement et la santé humaine. Ces sols contiennent généralement une contamination multiple en éléments métalliques et métalloïdes, ce qui représente un important défi en phytomanagement. En effet, les espèces végétales possèdent souvent, individuellement, une gamme limitée de capacités face aux polluants. Ainsi, les principes de complémentarité fonctionnelle pourraient s'avérer

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

utiles pour la gestion des sols contaminés par plusieurs éléments métalliques et métalloïdes au moyen d'assemblages d'espèces. Des monocultures et polycultures de *Salix viminalis* et de *Trifolium repens* ont été cultivées pendant 105 jours sur des sols du site minier de Pontgibaud contaminés principalement par de l'As et du Pb. Dans ce contexte, les objectifs de la présente étude étaient d'étudier le potentiel de *Salix viminalis* associé à *Trifolium repens* pour la phytostabilisation de l'As et du Pb dans ce sol lors d'un amendement à l'aide de biochar, en évaluant (1) la capacité des deux espèces choisies à se développer ainsi que (2) la concentration des polluants dans les divers organes des végétaux.

L'efficacité de la phytostabilisation a également été évaluée par l'étude du transport des métaux et métalloïdes à la fois dans les eaux porales, dans les eaux de percolation ainsi que que la fraction particulaire associée en fonction du type de végétation. Les rendements en biomasse aérienne et souterraine et les concentrations d'éléments métalliques et métalloïdes dans les tissus ont également été mesurées. La polyculture de saule et trèfle a produit des biomasses sèches en trèfle inférieures à celle obtenues en monoculture. Les biomasses de saules n'ont quant à elles pas été impactées par la présence de trèfle. L'association du saule et du trèfle a provoqué une augmentation de la concentration du plomb et de l'arsenic dans le saule, alors qu'elle a diminué dans le trèfle. La polyculture de saule et de trèfle a également montré un impact sur la mobilité de l'As et du Pb dissous ou particulaire. La présence de trèfle permet de diminuer le plomb dissous dans l'eau de percolation, alors qu'aucun effet de la végétation n'a été observé pour l'arsenic dissous. Il semblerait que l'association du saule et du trèfle dans un contexte de phytomanagement soit plus appropriée que leur monoculture.

4.2.Introduction

For metal(loid)s-polluted soils, phytomanagement approaches appear to be an economically and aesthetically attractive *in situ* technique (Lone et al., 2008). Such methods are an alternative to conventional methods, with limited effect on the soil physico-chemical properties. Phytoremediation efficiency depends on the climate and soil properties of the site. For example, as demonstrated, pH will play a crucial role in lead mobility (Sauvé et al., 2000), as well as organic matter content and mineral composition (Sauvé et al., 2000; Holm et al., 2003). In some cases for such approaches, soil amendments can be applied to improve soil fertility, reduce toxicity by decreasing the metal(loid) mobility in soil, thus promoting plant development (Mench et al., 2010).

Beside the importance of amendment, the effectiveness of the phytoremediation process is strongly dependent on appropriate development of plants, which is one of the critical steps

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

(Arienzo *et al.*, 2004). Plant establishment in a phytoremediation process is determined by various properties such as (i) metal tolerance, (ii) size, growth rate and rooting depth, (iii) limited metal translocation to the aerial parts to avoid contaminants transfer into the food chain, (iv) climate adaptation and (v) pest resistance (Kidd *et al.*, 2009; Gerhardt *et al.*, 2017). Plant installation will stabilize soils and control water and wind erosion (Reubens *et al.*, 2007), but also will reduce contaminant leaching by stabilizing contaminants through adsorption or accumulation in roots, while promoting the biological regeneration of polluted soils (Houben *et al.*, 2012; Castaldi *et al.*, 2018). As demonstrated in many studies, the extent of metal(loid)s uptake by the plant can vary considerably between plant species (Bonanno, 2011; Kouki *et al.*, 2015). Over the years, several studies have been done to optimize the phytoremediation process and specially by finding the most appropriate plants.

One of the most studied plants in this regard is the willow, since it presents properties favorable to phytoremediation of metal(loid)s polluted soils. Indeed, in addition to be a fast-growing tree, it is usually well adapted to the climatic conditions of temperate regions. It presents particular physiological characteristics such as high transpiration rates and an important root system with effective nutrient absorption, necessary to intercept, immobilize and absorb contaminants in phytoremediation processes (Salam *et al.*, 2016). The potential of willow for phytoremediation has been established in many studies (Bart *et al.*, 2016; Salam *et al.*, 2016; Desjardins *et al.*, 2018; Lebrun *et al.*, 2017, 2018a, 2018b).

In temperate climates, the active contribution of phytoremediation is limited to the growing season. Thus winter seasons can cause problems through leaf fall and decomposition, but also due to the cessation of evapotranspiration. In order to extend the growing season (Margesin, 2004) and remediate different soil types (Laghlimi *et al.*, 2015) a combination of herbaceous plants with trees can be used. In the present work, one herbaceous species *Trifolium repens* (white clover), was studied alone or in combination with the willow. Most previous studies evaluating *T. repens* growth in metal polluted areas have been focused on symbiotic nitrogen fixation and only a few examined metal(loid)s uptake (Ben Rebah *et al.*, 2002; Broos *et al.*, 2004). The choice of *T. repens*, will not only contribute to improve the knowledge of metal(loid)s absorption by this plant and its relevance in a phytoremediation process, but also to assess the interactions which occur between two plant species, *Trifolium repens* and the willow *Salix viminalis*, growing together in a contaminated soil. Indeed, the use of combined plants technology could improve the efficient use of soil nutrients, light and water resources (Lu *et al.*, 2017), and increase stress resistance caused by metal(loid) contaminations (Li *et al.*, 2014a; Craven *et al.*, 2016).

In this context, the objectives of the present study were to investigate the potential of *Salix viminalis* associated with *Trifolium repens* for the phytostabilisation of contaminated soil amended with biochar, by assessing (1) the tolerance of both plants to metal(loid)s in contaminated soils as well as (2) the concentration of pollutants in the various plant's organs. The efficiency of phytostabilisation was also evaluated through the study of metal(loid)s transport in percolation water according to the type of vegetation.

4.3. Materials and methods

4.3.1. Experimental design

Biochar was used as an organic amendment, produced from hard wood biomass (La Carbonerie, Crissey, France). The main physico-chemical properties of the biochar are presented in table 3.12.

Table 3.12: Amendments physico-chemical properties. EC = electrical conductivity ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), WHC = water holding capacity (% mass). HW2 = hardwood biochar with particle size 0.5-1 mm.

	Biochar
Granulometry	0.5 – 1 mm
pH	8.98 ± 0.02
EC ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	432 ± 2
WHC (%)	183 ± 3
Specific area ($\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$)	43.91
Total pore volume ($\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$)	0.0364
Mean pore diameter (nm)	3.32

The Pontgibaud soil was homogenized and sieved to 2 mm. 4.5 kg of soil/biochar mixture (2% of biochar weight/weight) was prepared and distributed in 20 pots with a capacity of 4L with an area of 860 cm².

4.3.2. Mobility of metal(oids)

To assess the plant effects on metal(loid)s leachability, soil pore water (SPW) samples were collected at the beginning (T0), then after 28 days, at the time of clover sowing (T28), 54 days (T54) and 105 days, on the last day of the experiment (T105), using Rhizon pore water samplers (Rhizosphere Research Product, Wageningen, Netherlands).

4.3.3. Percolation test

To evaluate the effects of the plants on the percolation of the metal(loid)s, samples of percolation water were recovered on the first day and just before harvesting the plants, according to the following method. The pots were saturated with water, then a quantity of water was added corresponding to 33 % of the water holding content (WHC). The percolation water was collected in pre-weighed tubes. The test was carried out over a period of 4 hours, and then the tubes were weighed to determine the volume of collected water. Electrical conductivity and pH measurements were performed on samples according to Bart *et al.* (2016). Total dissolved metal(loid) concentrations (As and Pb) were determined by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES) (ULTIMA 2, HORIBA, Labcompare, San Francisco, USA), from collected samples previously filtered at 0.22 μm , and acidified with HNO_3 65 % (83.3 μL in 5 mL of porous water solution).

To determine the amount of suspended solids in the percolating water, the 0.22 μm cellulose filters were weighed before filtration and after filtration and drying in the open air for 72 hours.

The concentrations of pseudo-total elements on filters were determined by aqua regia digestion (Zhang *et al.*, 2008). The filters were placed in a 100 mL Teflon beaker. 9 mL of aqua regia (HNO_3 : HCl , 1: 3 v/v) were added. The digestion program (in microwave apparatus) consisted of a gradual increase of 15 minutes at 180 °C, a digestion step of 15 minutes at 180 °C followed by a cooling step stopping at 55 °C during 15 min. After cooling to room temperature, the samples were taken up in a volume of 50 mL with ultra-pure water (18 $\text{M}\Omega\text{ cm}$) and then filtered on a 0.45 μm nitrocellulose filter. The metal(loid)s concentrations in the solutions were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-AES) as described previously. Blank extractions (without sample) were carried out throughout the complete procedure.

4.3.4. Plants growth conditions

Pot experiments were conducted with Pontgibaud soil (P) either with single or combined species of willow and clover. The willow species used was *Salix viminalis* (subsequently noted S). The willow cuttings were 30 cm high and were planted (1 willow per pot), 15 days after filling the pots with P soil mixed with biochar. They came from the state nursery of Guémené-Penfao (ONF, France). The herbaceous species used is the white clover *Trifolium repens* (subsequently noted T). It was sown one month after the willow cuttings

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

were planted. 500 seeds per pot were sown over the entire surface of the pot, in other words 860 cm². The 4 studied modalities were named as follow: willow alone (S), willow + clover (S+T), clover alone (T), and a condition without vegetation (NV), with 5 repetitions per modality.

Willows were cultivated for 105 days, and clover for 78 days under controlled conditions (16 h light / 8 h darkness regime, 25 °C / 21 °C). The photoperiod was adjusted at 16 h day with an approximate photon flux of 800 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Soil water holding capacity (WHC) was measured to determine the amount of water needed to maintain soil moisture between 70 and 50 % of the WHC by measuring daily the weight of each pot. It was adjusted with deionized water throughout the experimental period.

4.3.5. Statistical analysis

The statistical tests for the times studied (day 0, day 28, day 54 and day 105), and the plant effect (no vegetation, clover, willow and clover + willow) were done using the statistical software R version 3.1.2 (R Development Core Team, 2009).

4.4. Results

4.4.1. SPW physico-chemical characteristics

Figure 3.6 summarize the physico-chemical characteristics determined for SPW collected from the different treatments during the experiment.

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

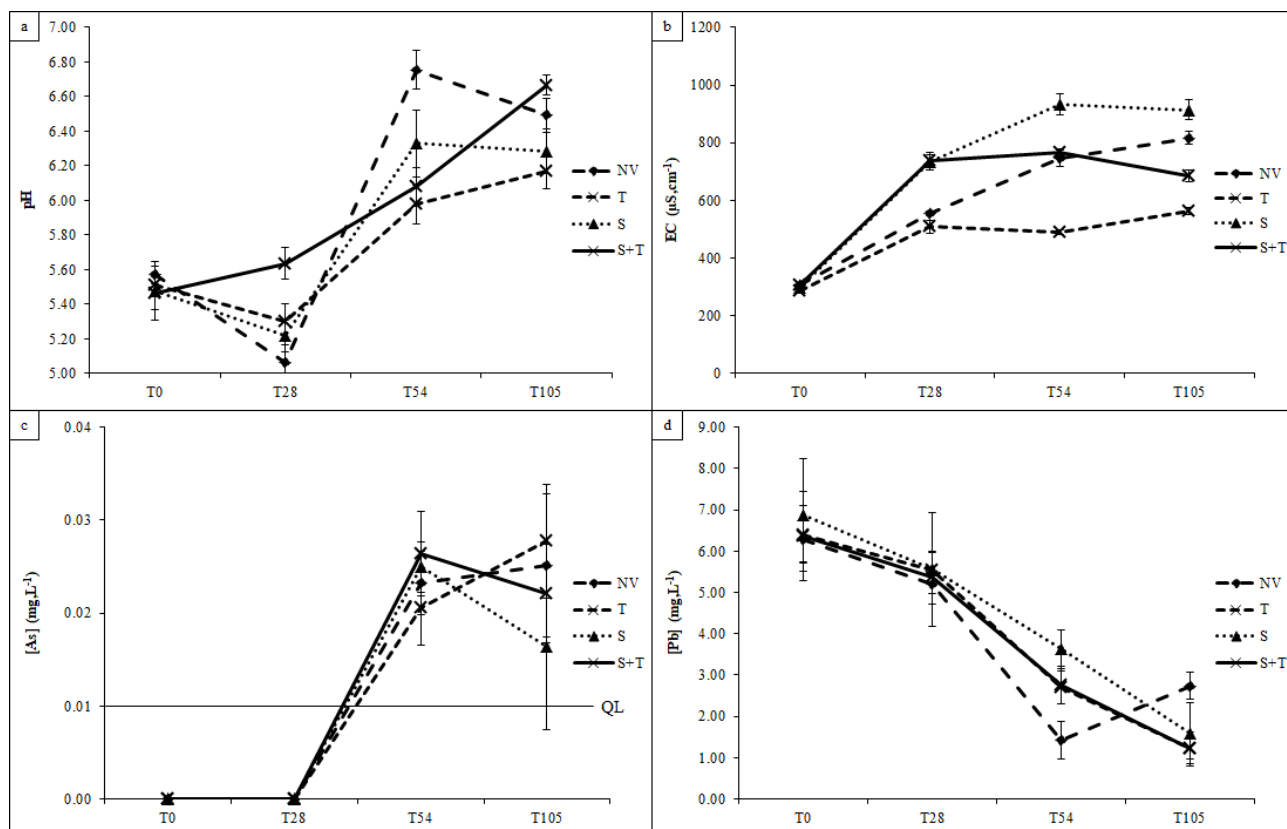


Figure 3.6 : SPW physical and chemical characteristics (pH (a) and EC (b)) and metal(loid) concentrations (As (c) and Pb (d)) of Pontgibaud soil amended with biochar for 4 modalities. At the beginning of the experiment (T0), at clover seeding (T28) at half of the experiment (T54) and at the end of the experiment (T105). not vegetated (NV), vegetated only with clover (T), vegetated only with willow (S) and the combination of willow and clover (S+T) QL : Quantification Limit.

At the beginning of the experiment, the pH values of the pore water for the different modalities did not show any significant differences. At T28 (at the sowing of the clover), the pH between the different modalities was not different for (NV), (S) and (T); however pH measured for (S+T) modality was higher than the other modalities. Between T28 and T54, a significant increase in pH was observed for all modalities (by 33%, 13%, 21% and 8% for (NV), (T), (S), (S+T), respectively). A significant increase in pH was observed for all modalities between T0 and T54 with an increase. Between T54 and T105 the pH increase stopped for the clover only (T) and willow only (S) modalities and a significant decrease of 0.26 points was observed for (NV). Finally, only the willow and clover (S+T) mode saw its pH increase significantly by 0.59 point. Overall, pH levels increased for all modalities between the beginning and the end of the experiment.

For the EC, at the beginning of the experiment, no significant difference was observed for all modalities (Figure 3.6b). Between T0 and T105 We observe an EC increase over time for all the modalities with rather marked variations between modality. The largest increase (207%) occurred for the willow modality (S); however this tendency stopped after T54. For (NV) modality we observed a 168% increase that was continuous from T0 to T105. Finally,

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

for the modalities including clover, despite a significant increase over time, they remain much less marked. For (T), the EC values increase by 95% between T0 and T105. For S+T, we observed an increase between T0 and T105 of 123% with a decrease between T54 and T105. The final S+T value was an intermediate value between modality (T) ($275 \mu\text{S.cm}^{-1}$) and modality S ($617 \mu\text{S.cm}^{-1}$).

Concerning metal(loid)s concentrations, arsenic was not present in SPW at T0 but at T28, T54 and T105, As concentrations increased significantly for all modalities ((NV), (T), (S+T) and (S)) (Figure 3.6c). There were no significant differences between modalities at T0 and T105.

For both lead and arsenic, at T0, there was no significant difference between the 4 modalities, but a significant decrease for all modalities was observed between T0 and T105 (Figure 3.6d). For the (NV) modality, Pb concentration decreased significantly (by 56%) between T0 and T105, but less importantly than compared to the other modalities for which a 76.7% decrease in Pb concentration was observed throughout the experiment.

4.4.2. Percolation water physico-chemical characteristics

At T0 the percolation tests were carried out on all pots without distinction of modality. An overall average was calculated on the various measured parameters such as pH, EC, As and Pb dissolved, MES, As and Pb particulate (Table 3.13).

Table 3.13: Physico-chemical characteristics (pH and EC), concentrations of dissolved metals (As and Pb), suspended solids (SM) and metal particles (loid) (As and Pb) of Pontgibaud soil percolation water amended with biochar for 4 modalities.

Modalities	Time	pH	EC ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)	Dissolve As (mg.L^{-1})	Dissolve Pb (mg.L^{-1})	SM (mg.L^{-1})	Particular As (mg.L^{-1})	Particular Pb (mg.L^{-1})
NV	T0	5.3±0.0 a, A	419±3 b, A	0.00±0.00 b, A	4.12±0.07 a, A	0.150±0.031 a, A	0.21±0.04 a, A	3.16±0.56 a, A
	T105	4.2±0.0 b, B	850±25 a, C	0.05±0.00 a, A	3.63±0.16 b, A	0.077±0.014 b, A	0.11±0.02 b, B	1.59±0.21 b, A
T	T0	5.3±0.0 a, A	419±3 b, A	0.00±0.00 b, A	4.12±0.07 a, A	0.150±0.031 a, A	0.21±0.04 a, A	3.16±0.56 a, A
	T105	4.6±0.1 b, A	781±25 a, C	0.06±0.01 a, A	2.86±0.21 b, B	0.011±0.004 b, B	0.09±0.02 b, B	0.37±0.11 b, C
S	T0	5.3±0.0 a, A	419±3 b, A	0.00±0.00 b, A	4.12±0.07 a, A	0.150±0.031 a, A	0.21±0.04 a, A	3.16±0.56 a, A
	T105	4.2±0.1 b, B	1198±77 a, A	0.06±0.01 a, A	3.09±0.09 b, AB	0.060±0.014 b, A	0.12±0.02 b, B	1.16±0.18 b, B
S+T	T0	5.3±0.0 a, A	419±3 b, A	0.00±0.00 b, A	4.12±0.07 a, A	0.150±0.031 a, A	0.21±0.04 a, A	3.16±0.56 a, A
	T105	4.1±0.0 b, C	1016±46 a, B	0.06±0.01 a, A	2.89±0.15 b, B	0.011±0.001 b, B	0.32±0.04 a, A	0.37±0.08 b, C

At the beginning of the experiment (T0), at clover seeding (T28) at half of the experiment (T54) and at the end of the experiment (T105). not vegetated (NV), vegetated only with clover (T), vegetated only with willow (S) and the combination of willow and clover (S+T). The lowercases letters indicate a significant difference for the different times of the same modality, the capital letters indicate a difference between the modalities at a given time.

A significant decrease in pH between T0 and T105 of 20% was observed for all

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

modalities (Table 3.13). In addition, at T105, the highest measured pH value was for modality (T). The pH measured for modalities (NV) and (S), which was not significantly different for these two modalities, had an intermediate value, and finally the lowest measured pH value was for modality (S+T).

Electrical conductivity increased over time (Table 3.13), with an increase of 129 % on average between T0 and T105 for all modalities. The highest value measured at T105 was on modality (S). This value gradually decreased for the modality (S+T), and also for modalities (NV) and (T).

As observed for the soil pore water (SPW), the arsenic dissolved concentration was under the detection limit at T0 and increased with time for all modalities (Table 3.13). No significant difference was observed between the different modalities. However, we noticed that for all treatments the As concentrations in the percolation water were significantly higher than in the soil pore water.

Dissolved lead concentration in the percolation water (Table 3.13) also followed the same trend as the SPW lead concentration, decreasing over time, with the concentration in percolating water being significantly lower at T105 than at T0. Lead decreased by 12% for (NV), and by 30%, 25% and 30% for (T), (S) and (S+T), respectively. Significant lower lead concentrations were measured for modalities (T) and (S+T).

Suspended matters (SM) decreased over time, with decreases of 49 %, 93 %, 60 % and 93 % for the modalities (NV), (T), (S) and (S+T), respectively (Table 3.13). Modalities containing clover gave significantly lower values than (NV) and (S) modalities.

Arsenic concentrations in suspended solids (Table 3.13) decreased significantly from T0 to T105 for NV, T and S, by 48%, 57% and 43%, respectively. However, a significant increase of 52% was recorded for the (S+T) modality. Pb Concentration in the suspended solids decreased significantly over time for (NV) by 49.7%. For modalities (T), (S) and (S+T), the decreases reached 88.3%, 63.3% and 88.3% respectively.

4.4.3. Plant growth and dry biomass measurements

The lengths of the willow stems were measured as soon as they were sufficiently developed; corresponding to day 16 and measures were performed every 7 days until day 105. There was no significant difference between the two modalities throughout the experiment (data not shown).

As observed with growth, the dry willow biomass obtained from the two modalities was not significantly different (Figure 3.7a).

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

Moreover the dry clover biomass (Figure 3.7b) was significantly lower for the (S+T) modality compared to the T modality, both for the aerial parts (56%) and for the root parts (70%).

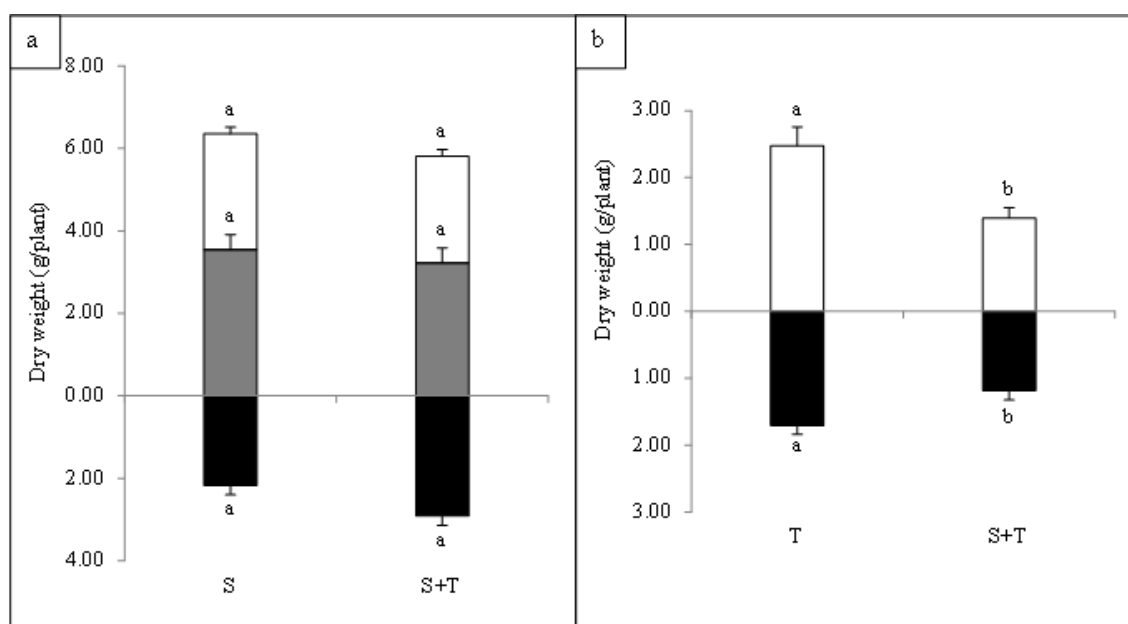


Figure 3.7 : Dry weight of *Salix viminalis* (a) leaves (white columns), stem (grey columns) and roots (black columns), dry weight of *Trifolium repens* (b) aerial parts (leaves and stems) (white columns) and roots (black columns) obtained from 500 seeds placed on the Pontgibaud soil amended with biochar for 3 modalities at the end of the experiment (T105). Vegetated only with clover (T), vegetated only with willow (S), and the combination of willow and clover (S+T). Lower-case letters indicate a significant difference in the terms and conditions.

4.4.4. Plants metal(loid)s accumulation and distribution

Arsenic was mainly present in the roots of willow (Figure 3.8). Arsenic concentrations in the willow aerial parts (leaves and stem) were 97 % and 99 % lower than the concentration of arsenic in the roots for (S) and (S+T), respectively (Figure 3.8a). No significant differences were observed for *Salix* between the (S) and (S+T) modalities either in roots or stems. However, in willow leaves, As concentrations in the willow + clover modality were significantly higher, by 226%, compared to leaf concentrations in the willow alone modality. For Pb (Figure 3.8b), we found general trends fairly similar to the one observed for arsenic i.e. a much higher Pb concentrations in the roots than in the aerial parts. Pb concentration in roots was approximately 96% higher than in leaves for willow plants grow alone or in combination with clover. Root Pb concentrations for (S) and (S+T) were not significantly different. Lead concentrations in willow leaves and stems were significantly higher in the willow + clover mode than in the willow alone mode, by 154% and 158%, respectively.

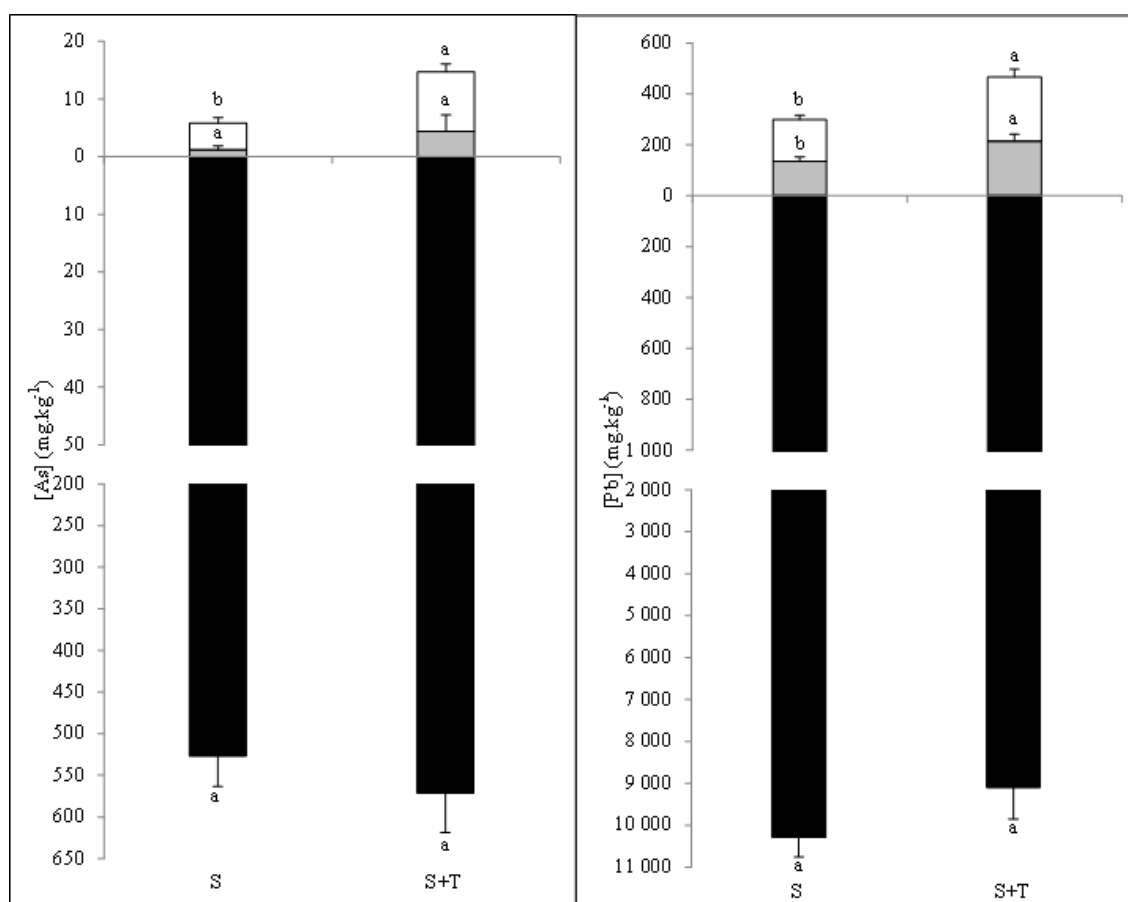


Figure 3.8 : Arsenic concentration (a) and lead concentration (b) (mg.kg⁻¹) in the different *Salix* organs: leaves (whites columns, stems (greys columns) and roots (blocks columns) placed on the Pontgibaud soil amended with biochar for 3 modalities at the end of the experiment (T105). Vegetated only with clover (T), vegetated only with willow (S), and the combination of willow and clover (S+T). The lowercases letters indicate a significant difference for modalities.

Finally, the bioconcentration factors for As and Pb (Table 3.14) were all below 1 for the willows aerial parts and for the roots. Moreover, they were not significantly different between the modalities (S) and (S+T). The willow As and Pb translocation factors value for modalities (S) and (S+T) were both inferior to 1.

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

Table 3.14 : Bioconcentration factor (BF) and translocation factor (TF) for *Salix* and *Trifolium repens* placed on the Pontgibaud soil amended with biochar for 3 modalities.

		<i>Salix viminalis</i>		<i>Trifolium repens</i>	
		S+T	S	S+T	T
As	aerial part BF	0.01±0.00 b	0.01±0.00 b	0.36±0.08 a	0.50±0.06 a
	root BF	0.51±0.05 B	0.53±0.04 B	0.83±0.8 A	0.91±0.04 A
	TF	0.03±0.01 b	0.01±0.00 b	0.40±0.04 a	0.55±0.05 a
Pb	aerial part BF	0.02±0.00 b	0.02±0.00 b	0.25±0.04 a	0.37±0.04 a
	root BF	0.47±0.03 B	0.54±0.02 B	0.67±0.04 A	0.73±0.03 A
	TF	0.05±0.01 c	0.03±0.00 d	0.35±0.04 b	0.51±0.06 a

At the end of the experiment (T105). Vegetated only with clover (T), vegetated only with willow (S), and the combination of willow and clover (S+T). The lowercases letters indicate a significant difference for aerial part BF, or TF; the capitals letters indicate a significant difference for root BF.

For clover, we observed a higher concentration of As in the root parts than in the aerial parts (Figure 3.9a) corresponding to 45 % for modality (T) and 64 % for modality (S+T). Moreover, for clovers plants growing on (S+T) modality, arsenic concentration for both root and aerial parts were lower by 81% and 53%, respectively compared to (T) modality.

Finally, for (S+T) and (T) modalities, the concentration of Pb in the aerial parts of the clover (Figure 3.9b) was 69% and 48% lower than the concentrations found in the roots, respectively. It should also be noted that lead concentrations for roots and aerial parts were significantly higher for modality (T) compared to modality (S+T), by 197% and 118% for aerial parts and roots, respectively.

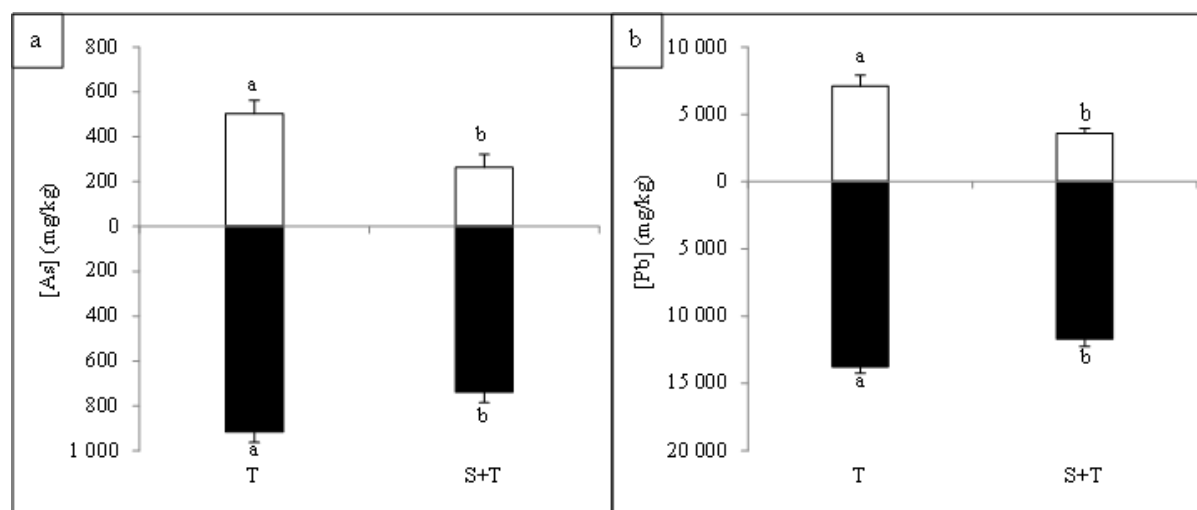


Figure 3.9 : Arsenic concentration (a) and lead concentration (b) (mg.kg⁻¹) in the different *Trifolium repens* organs: aerial parts (leaves, stems) (whites columns) and roots (blacks columns) obtained from 500 seeds placed on the Pontgibaud soil amended with biochar for 3 modalities at the end of the experiment (T105). Vegetated only with clover (T), vegetated only with willow (S), and the combination of willow and clover (S+T). The lowercases letters indicate a significant difference for modalities.

The clover bioconcentration factors for As and Pb in roots and aerial parts (Table 3.14) whatever treatments were inferior to 1. In addition, it is important to note that, in all cases, the

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

bioconcentration factors for clover were always higher than those calculated for willow plants, for both roots and aerial parts. In addition for arsenic, translocation factors showed no difference between the two tested plants whatever treatment applied. However, for clover, the lead translocation value factor for modality (T) was 69% higher than the one measured for modality (S+T). Finally lead translocation factor for willow plants on modality (S+T) was 60% higher than that of modality (S).

4.5. Discussion

4.5.1. SPW physico-chemical characteristics

The soil used in this experiment had extreme physico-chemical parameters with an acidic pH, a very low EC and very high Pb and As concentrations in the solid phase.

The characterization of SPW during the time course of the experiment demonstrated a pH, EC and arsenic concentration increase, while lead concentration decreased.

The pH increase when adding biochar had already been demonstrated by Lebrun *et al.* (2018a), using pinewood or lightwood biochar. This pH improvement can be attributed to the alkalinity of the biochar which induced a liming effect (Marks *et al.*, 2014). It could also be due to the presence of functional groups such as carbonyls, phenols, carboxyl and pyrones on biochar surface (Marks *et al.*, 2014). Based on the results observed during the experiment, we can hypothesize that plants also had an effect on pH by comparing vegetated soils to non-vegetated soil at T105. Indeed, for modalities (T) and (S), the increase in pH was less significant than that observed for the non-vegetated modality (NV). While the modality (S+T) had the highest pH. These differences between plant species (S, T and S+T) could be attributed to specific root exudates depending on growing conditions, the species studied and whether they are alone or combined (Kidd *et al.*, 2009; Shahid *et al.*, 2012).

Concerning electrical conductivity, its increase over time is probably due to the presence of soluble salts and cations on the surface of the biochar observed in Chintala *et al.* (2013) and Lebrun *et al.* (2018b). Moreover, we observed an influence of the two species on electrical conductivity. Indeed, the increase in the EC value for modality (S) compared to modality (NV) could be explained by the presence of root exudates that may mobilize some elements in the rhizosphere. Moreover, the decrease in EC of modalities (T) and (S+T) relative to (NV) modality could be due to the consumption by the clover of nutrients released by the biochar. Finally, the modality (S+T) had an intermediate value between the modality (S) and the modality (T), the presence of willow by excretion of root exudates could partially

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

compensate for the decrease in EC caused by mineral absorption due to the presence of clover.

As described in the literature, the mobility, toxicity and availability of As in the environment are strongly influenced by the physicochemical properties of the soil (EC, pH, ...) and are mainly controlled by adsorption-desorption processes (*Feng et al., 2013*). Moreover changes in organic matter can directly or indirectly alter the distribution and availability of metals in soils (*Bolan et al., 2014*).

In our study, we observed a significant increase for SPW arsenic concentrations over time, with no difference between modalities (willow alone, clover alone, willow and clover associated and unvegetated). Lebrun *et al.* (2018a) observed also a similar As SPW concentration evolution when biochar produced from softwood or pinewood was added to 2% to Pontgibaud technosol. Indeed, they observed an increase in arsenic concentration in SPW after 45 days, whether in pots vegetated with *Salix viminalis* or not. Similarly, this effect of biochar on As concentration in SPW has already been observed in Beesley *et al.* (2014) when applying 10 % biochar obtained from orchard residues in a soil collected at La Mina Monica mine site. This increase could be due to competition for adsorption sites between As and the presence of dissolved organic matter released by biochar (*Beesley et al., 2014*). The SPW pH increase, linked to biochar addition, could also explain the results observed in this study.

The mechanisms by which modifications of soil environment immobilize metals such as lead are often pH-related, in particular for sorption, precipitation and co-precipitation processes (*Mench et al., 2000*). In our study, biochar induced a decrease in Pb SPW concentration progressively over time, except for the modality (NV). As we observed an increase in pH over time, the decreases of Pb concentration could be explained by the fact that the rise in pH increases the surface charges of soil particles and then the retention of metals in the soil (*Pérez-Esteban et al., 2014; Yin et al., 2016*). This would explain the increase in Pb SPW concentration at T105 for modality (NV), with a pH decrease between T54 and T105. However, while the cessation of pH increase occurred at T54, the Pb SPW concentration continued to decrease for modalities including plants. This decrease could be due to Pb sorption by plants but also to root exudates excretion. Indeed, many studies have shown that some low molecular weight compounds released from plant roots (amino acids, carboxylic acids, sugars and simple phenolic compounds and flavonoids) (*Uren, 2007; Seshadri et al., 2015*) can play a role in the bioavailability of metals in the rhizosphere (*Seshadri et al., 2015*). These could affect physico-chemical properties such as soil redox potential and chelation conditions (*Seshadri et al., 2015*). Several hypotheses can be proposed to explain such

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

observations: (i) organic compounds can form stable complexes; (ii) organic acids could be adsorbed by soil particles, which modified the load on the soil surface and thus the ions adsorption; and (iii) organic acids could increased the bioavailability of soil or biochar phosphates and thus facilitate its combination with lead to form precipitated compounds such as lead phosphate (*Chen et al., 2016*).

4.5.2. Percolation water physico-chemical characteristics

The pH of percolation water was initially very close to that of soil pore water (SPW). However, it decreased over time, whereas SPW pH rather increased. This decrease of percolation water pH could be explained by the fact that it is mainly composed of free water than SPW, which would correspond to the part of the water maintained by capillarity between the solid particles of the soil. The contact time of percolation water with biochar, which is the source of alkalinity, was therefore lower than that of SPW. In addition, the decrease of percolation water pH could also be due to the migration of small particles of acidifying minerals over time in the bottom layer of the pots. In fact, the soil pore water was sampled in the middle zone of the pot, whereas percolation water was in contact with the underlying material.

With regard to electrical conductivity, the same explanation as the electrical conductivity of SPW can be given for percolation water. Indeed, the increase in the EC value for modalities (S) and (S+T) compared to (NV) could be explained by the presence of *Salix* root exudate. In addition, we were able to observe a time effect for modality (NV); this EC increase could be explained by a progressive dissolution of minerals present in the soil or biochar, increasing the concentration of diverse ions in the percolation water.

Dissolved arsenic concentration in the percolation water increases, as did SPW arsenic concentrations. In addition, the circulation of free water could have mobilized As-bearing colloids, not retained by the 0.22 μm filters, which could cause an increase in the amount of the arsenic found in the percolating water.

The same explanations can be given for lead, as the concentration of Pb in percolation water was also higher in percolation water than in SPW.

A decrease in the suspended matter (SM) concentration occurred between the beginning of the experiment T0 and the end at T105. This could be explained by the stabilization of soil particles over time and thus a lower flow of suspended matter in the percolation water. This decrease was accentuated in the modalities containing clover. Indeed clover, conversely to willow, covers the soil surface of the ground and develops a dense root system located just

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

beneath the soil surface. These two parameters allowed the mobility of soil particles to be limited during watering. The quantity of lead-associated particles decreased with the amount of suspended matter, which is as expected except for (S+T) where the flux of arsenic in particles was higher, suggesting that the remaining suspended particles were enriched in arsenic compared with those of the reference NV condition.

This enrichment could be due to the formation of Fe-organic ligand-As colloids in relation with the production of root exudates, which are probably more abundant in such modality (S+T) corresponding to the combination of the two species.

Finally, we observed that the concentration of lead-bearing particles decreased concomitantly with suspended matter (SM) content. This result suggests that lead and arsenic are transported by different types of soil components. Indeed, a lower amount of MS seems to result in fewer particles potentially charged with lead and would therefore cause a decrease in particulate lead in the percolating water.

4.5.3. Plant growth and metal(lloid)s uptake

In the present study, willow dry weight was not affected by the presence of clover, while clover biomass decreased when co-cultivated with willow. Desjardins *et al.* (2018) also observed that willow biomass (*Salix miyabeana*) was not affected by the presence of other species (*Medicago sativa* and *Festuca arundinacea*). However they observed a significant increase in herbaceous biomass when associated with *Salix miyabeana*. It should be noted that the experiments were carried out in pots, unlike that of Desjardins *et al.* (2018), which was carried out in the field. Indeed, in a spatially limited system, with a low nutrient technosol, plants with a larger root system may benefit from a larger sorption area, allowing more nutrients to be absorbed and therefore a better growth. Indeed, the willow having been placed alone (one cutting per pot) before the clover, the willows could then develop well without competition unlike the clover. When clover developed, intraspecific and interspecific competition with the willow for nutrients and space occurred because the stock of nutrients having already been partially removed by the willows. According to Luo *et al.* (2017) interspecific competition for nutrients induced a larger decrease in growth in co-culture than intraspecific competition.

Metal(lloid)s concentrations in willows and clovers were higher in the roots than in the aerial parts, which is consistent with the results found by Desjardins *et al.* (2018), Lebrun *et al.* (2018a), Salam *et al.* (2016), and Bidar *et al.* (2009). In the present study, no difference

was observed between metal(loid)s absorption and adsorption.

Overall, although for both species, metal(loid) concentrations in the roots were higher than those in the aerial parts, these were significantly higher in the roots of *T. repens* than in the roots of *Salix viminalis*. This could be explained by root exudates, which differ according to species and growing conditions (Kidd *et al.*, 2009), and could modify the physico-chemical and microbiological properties of the rhizosphere (Dong *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2016). Indeed, microbial activity has been shown to play an important role in the fate of metal(loid)s through the production of organic substances that can bind and sequester them (Dong *et al.*, 2007).

For both plants species the As concentration in the aerial parts was lower than in the roots, this could suggest that the plant species studied can tolerate As toxicity by accumulating more arsenic in the roots, thus limiting the translocation of metal(loid)s to the aerial parts (Chen *et al.*, 2014b).

In Zimmer *et al.* (2011), it was suggested that for willow roots As accumulation could be partially attributed to the Fe-Mn precipitates that cover this organ, which would reduce its absorption, and thus its translocation. In addition, Chen *et al.* (2014b) reported that most plants detoxify arsenate by reducing it to arsenite through reactions with glutathione or arsenate reductase activity (Dhankher *et al.*, 2002) in the roots, limiting its translocation.

For lead, its negative effects on photosynthetic processes, on membrane ion permeability and on mineral nutrition (Nagajyoti *et al.*, 2010), will generate defense mechanisms at the root level. Such mechanism will act as a physical barrier through the Caspary framework in the endoderm (Pourrut *et al.*, 2011; Emamverdian *et al.*, 2015) or creating a chemical barrier by bonds between Pb and carboxyl groups in cell walls (Chen *et al.*, 2013).

Finally, metal(loid) concentration in organs differed according to the co-culture of clover and willows, compared to monoculture, as observed by Desjardins *et al.* (2018) for other plant species.

4.6. Conclusions

An assisted phytoremediation study was checked out using two species (*Salix viminalis* and *Trifolium repens*), alone or associated, growing on a former technosol mine, mainly polluted by As and Pb and amended with biochar.

The present work demonstrated that the monoculture or co-culture of clover and willow,

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

had an influence on the physico-chemical characteristics of the soil pore water, of the percolation water and on metal(loid)s concentrations in SPW, percolation water and plant organs. Co-culture of *Salix* and *Trifolium repens* species improved Pb soil immobilization without affecting arsenic mobility. It has also reduced the transport of suspended solids and, ultimately, the transport of lead. In addition, a promising potential for phytostabilization has been demonstrated since the two species studied have mainly accumulated As and Pb in their root systems. However, clover translocated more As and Pb than willow, and the translocation of metal(loid) in willow increased when it was associated with clover. In conclusion the studied species were clearly potential phytostabilizers and their association would induce the development of a persistent plant cover, able to fix nitrogen, both assets for the success of sustainable phytomanagement.

5. Expérience complémentaire d'amendement à l'aide de sulfate de fer

Les résultats du premier article (paragraphe 2) (article : *Effect of biochar and amendments on Pb and As phytotoxicity and phytoavailability in a technosol*) ont montré que la combinaison d'amendements la plus favorable pour la croissance de *Phaseolus vulgaris* était l'association biochar-compost. Toutefois ce mélange bien que diminuant fortement les concentrations en Pb dans les eaux porales, mobilisait l'arsenic de façon non négligeable, phénomène probablement dû à l'augmentation de pH. Il était donc nécessaire de réaliser une seconde expérience similaire à la première pour déterminer une combinaison d'amendements capable à la fois de promouvoir la croissance des végétaux tout en limitant à la fois la mobilité du plomb et de l'arsenic. Le premier amendement testé pour stabiliser l'arsenic était la grenaille de fer, mais les résultats présentés dans l'article 2 (*Potential use of biochar, compost and iron grit associated with Trifolium repens to stabilize Pb and As on a multi-contaminated technosol*) ont montré que ce matériau n'était pas adapté car il induisait une inhibition de la germination du trèfle. Le choix d'un nouvel amendement susceptible de stabiliser l'arsenic s'est alors porté sur le sulfate de fer (Fresno et al., 2016).

5.1. Matériels et méthodes

Pour cette expérience, le protocole expérimental adopté était identique à celui du test présenté dans l'article « *Effect of biochar and amendments on Pb and As phytotoxicity and phytoavailability in a technosol, CLEAN, Soil, Air, Water* » avec la même durée d'expérience,

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

la même variété de haricots nains, mais également avec le même biochar et le même compost, seul le sulfate de fer a été ajouté, à raison de 0,15% (m/m) (concentration déterminée par des tests préliminaires, permettant d'éviter une acidification du sol). Ce dernier était un produit commercial (E-Leclerc).

La préparation des différents traitements a été identique à celle du premier phytotest. Les échantillons ont été mélangés au technosol de Pontgibaud selon les combinaisons suivantes : (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar (B) 2%, (PC) : P + Compost (C) 5%, (PBC) : P + B 2 % + C 5%, (PBCS) : P + B 2% + C 5% + Sulfate de fer 0,15 %. Chaque traitement a ensuite été réparti dans 5 pots de 300 ml, et enfin 2 graines de haricots ont été placées dans chaque pot.

5.2. Résultats et discussion

Les résultats des mesures du pH et des concentrations de plomb et d'arsenic des eaux porales, pour chaque modalité, sont rassemblés dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Caractéristiques physico-chimiques de l'eau porale : pH, concentrations en plomb et arsenic (mg.L^{-1}) dans les différents traitements

Traitements	pH	[Pb] (mg.L^{-1})	[As] (mg.L^{-1})
P	4.43±0.08 c	14.21±1.02 a	0.08±0.01 b
PB	6.86±0.03 b	0.24±0.02 d	0.03±0.00 c
PC	6.76±0.07 b	0.16±0.01 d	0.22±0.08 a
PBC	7.51±0.03 a	0.48±0.02 c	0.31±0.09 a
PBCS	7.49±0.02 a	0.74±0.05 b	0.04±0.01 c

(P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar (B) 2%, (PC) : P + Compost (C) 5%, (PBC) : P + B 2 % + C 5%, (PBCS) : P + B 2% + C 5% + Sulfate de fer 0,15 %. Les lettres indiquent une différence significative ($p < 0,05$) ($n = 5$)

La concentration du plomb dans l'eau porale a diminué de 97 % en moyenne dans tous les traitements, comme cela a été observé précédemment. Le sulfate n'a pas eu d'effet supplémentaire ; la concentration de plomb a même légèrement augmenté lorsqu'il est présent. Cette diminution a déjà été expliquée précédemment : l'immobilisation exercée par les amendements est basée sur leurs propriétés alcalines, via des phénomènes comme la sorption à des sites accessibles à la surface des amendements ou du sol, la co-précipitation avec les oxydes de Fe, Al, Mn, ou la formation de minéraux (Boisson *et al.* 1999 ; Mench *et al.* 2000).

L'observation des concentrations d'arsenic dans l'eau porale (Tableau 3.1) à T0 a montré une diminution de 62,5 % pour PB et de 50 % pour PBCS par rapport au sol de Pontgibaud. Une diminution de la concentration d'arsenic dans l'eau porale avec l'addition de sulfate de fer

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

dans un sol contaminé par l'arsenic et le cuivre a également été observée dans Fresno *et al.* (2018). Comme observé et expliqué précédemment, la concentration en arsenic dans l'eau porale a augmenté avec l'ajout de compost seul ou associé avec le biochar, de 175 % et de 288 %, respectivement. Cette mobilisation de l'arsenic lors de l'ajout d'amendements organiques, comme le compost ou le biochar, a déjà été signalée (Beesley *et al.*, 2013 ; Clemente *et al.*, 2010 ; Yin *et al.*, 2016).

Dans cette expérience, nous avons pu observer pour PBCS que l'augmentation du pH du sol provoquée par l'ajout d'amendements n'a pas conduit à une augmentation de la concentration d'arsenic dans l'eau porale. Ceci suggère que l'ajout de sulfate de fer à la combinaison biochar / compost a augmenté la capacité de sorption de l'As dans le sol, limitant ainsi les effets du pH et surtout du carbone organique dissous. En effet, l'application de sulfate de fer aux sols entraîne la formation rapide d'oxydes de fer qui adsorbent et stabilisent l'arsenic à long terme (Cutler *et al.*, 2014 ; Miretzky et Fernandez-Cirelli, 2010 ; Fresno *et al.*, 2018).

La biomasse végétale des organes des haricots a été mesurée à la fin de l'expérience (Figure 3.10).

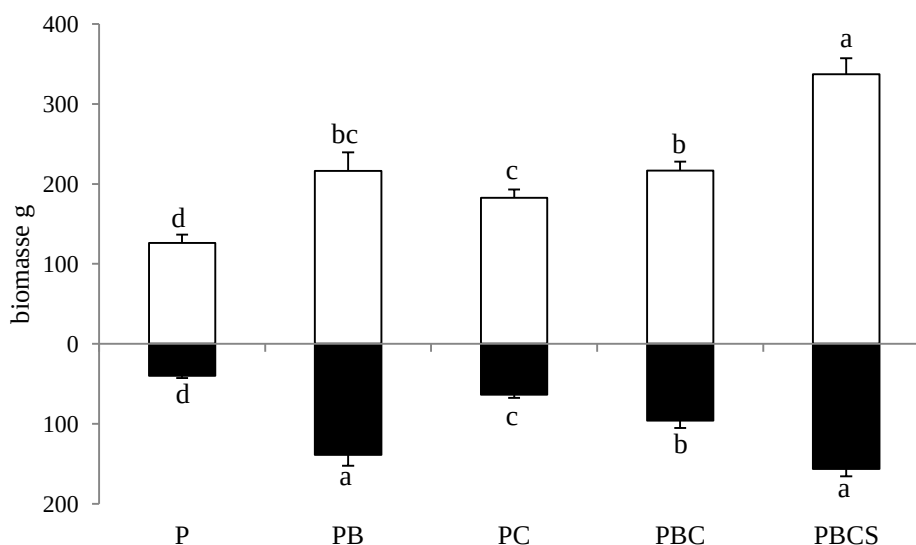


Figure 3.10 : Biomasses sèches (mg) des organes des haricots nains (parties aériennes (colonne blanche), racines (colonne noire)) à la fin de la période expérimentale (13 jours). (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar (B) 2%, (PC) : P + Compost (C) 5%, (PBC) : P + B 2 % + C 5%, (PBCS) : P + B 2% + C 5% + Sulfate de fer 0,15%. Les résultats sont exprimés sous forme de valeur moyenne et d'erreur type (n=10), les lettres sur les histogrammes indiquent une différence significative ($p < 0,05$).

Les biomasses racinaire et aérienne les plus faibles de haricot ont été mesurées sur P seul et étaient de 39,9 mg et 126,3 mg respectivement. Tous les traitements ont amélioré la biomasse racinaire. Ainsi, les traitements PB et PBCS ont pu être regroupés, ces plantes ne présentaient aucune différence statistique significative en termes de biomasses racinaires. Ces

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

dernières, sèches, se situaient entre 138 et 156 mg. Venait ensuite le traitement PBC avec une biomasse intermédiaire de 95 mg, et enfin le traitement PC avec la biomasse racinaire la plus faible (63 mg). La biomasse aérienne a également augmenté pour toutes les modalités comparées à P. Cette fois, ce sont les traitements PC et PBC qui ont pu être regroupés avec une biomasse sèche d'environ 215 mg. La plus faible biomasse (176 mg) a été mesurée sur PB, la plus forte étant mesurée sur PBCS (341 mg).

Dans cette étude, l'ajout d'amendements a été bénéfique pour la croissance des plantes. En ce qui concerne le sulfate de fer (PBCS), la biomasse du PBCS était identique à celle du traitement PB, mais supérieure à celle du traitement PBC, montrant ainsi l'intérêt du sulfate de fer. En effet, les paramètres physico-chimiques de l'eau porale entre les traitements PBC et PBCS sont très proches, sauf pour la concentration en As. Ces résultats montrent donc que la diminution de la mobilité de l'arsenic, très facilement mobilisable, permet de réduire la toxicité du technosol et donc d'améliorer la croissance du haricot.

5.3. Conclusion

Au vu des résultats de cette expérience avec sulfate de fer, il apparaît que la combinaison biochar + compost + sulfate de fer est la combinaison adéquate pour une application sur le terrain dans un contexte de phytostabilisation assistée du technosol de Pontgibaud. Avec cette combinaison d'amendements, nous avons pu observer la meilleure croissance des végétaux, et une diminution des concentrations en As et Pb dans l'eau interstitielle du sol.

Conclusion du chapitre III

Ce chapitre portait à la fois sur le choix des amendements à incorporer *in situ* au technosol de Pontgibaud et sur le comportement des végétaux vis-à-vis de ces technosols amendés. Nous avons ainsi montré que les différents amendements utilisés ont permis d'améliorer les propriétés agronomiques par élévation du pH, de la teneur en matière organique et des capacités de rétention en eau. De plus, la mesure des concentrations en As et Pb dans les eaux porales a montré des comportements différents en fonction des amendements utilisés. En effet, les amendements organiques comme le biochar notamment ont permis d'abaisser de plus de 90 % la concentration en plomb dans l'eau porale mais ils ont dans le même temps augmenté la concentration en arsenic. Ces résultats ont montré qu'il était nécessaire, dans notre cas, d'associer aux amendements organiques, essentiels à

Chapitre III. Etudes préalables à la mise en place d'un procédé de phytostabilisation aidé *in situ* : expériences en mésocosme

l'amélioration agronomique du technosol, un amendement inorganique à base d'oxyde de fer pour limiter la mobilité de l'arsenic. Le choix des amendements à incorporer au technosol de la parcelle expérimentale (chapitre IV) s'est donc porté sur une combinaison associant biochar, compost et sulfate de fer.

Les résultats ont mis en évidence la capacité du trèfle à contribuer à la phytostabilisation de l'As et du Pb, au niveau des racines. De plus, nous montrons que le trèfle ou le saule, qu'ils soient associés ou non, impactaient les caractéristiques du technosol. La combinaison saule et trèfle améliore l'immobilisation du plomb, réduisant sa concentration en solution, sans augmenter la mobilité de l'As. Cette combinaison d'espèces a également réduit le transport des particules en suspension et le transport du plomb particulaire. De plus, l'association du saule et du trèfle a permis le développement d'un couvert végétal persistant, et pourrait permettre la fixation de l'azote atmosphérique.

Finalement, ces différentes expériences ont permis de définir pour le contexte particulier du technosol minier de Pontgibaud, une combinaison optimale d'amendements (biochar + compost + sulfate de fer), ainsi qu'une association d'espèces végétales adéquates (saules et trèfle) pour un procédé de phytostabilisation assistée.

Ces résultats ont été exploités afin de mettre au point un programme expérimental visant à transposer *in situ* (chapitre IV) le procédé de phytomanagement et vérifier son efficacité en recherchant individuellement ou en association l'effet des trois amendements.

**Chapitre IV : Suivi du procédé de
phytostabilisation mis en place sur le site
minier de Pontgibaud**

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

Introduction au chapitre IV

Dans le chapitre précédent, les expériences menées ont permis d'identifier la combinaison d'amendements pouvant améliorer les caractéristiques du technosol, tant d'un point de vue agronomique que de sa phytotoxicité, pour sa végétalisation. Elles ont également permis de valider l'utilisation du trèfle et de mettre en évidence le potentiel de remédiation de l'association du trèfle et du saule en phytomanagement. Par ailleurs, des études antérieures menées sur le saule placé sur le technosol de Pontgibaud avaient déjà validé le potentiel de ce genre dans un tel contexte (*Lebrun et al., 2017*). Dans cette optique, un essai de phytostabilisation aidée sur une parcelle expérimentale a été mené, permettant de déterminer le potentiel des amendements et des deux espèces végétales associées.

Dans notre cas, cet essai a consisté à :

- Evaluer l'évolution du technosol de la parcelle expérimentale, notamment en termes de mobilité du Pb et de l'As et d'amélioration de sa qualité agronomique .
- Evaluer le comportement des saules et du trèfle sur les différents amendements, en termes de production de biomasse et de transfert du Pb et de l'As vers leurs parties aériennes.

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

1. La parcelle expérimentale

1.1. Présentation du dispositif

Le choix de l'implantation de la parcelle expérimentale s'est porté sur la lagune 2. La parcelle expérimentale présente une longueur de 24 m et une largeur de 10 m. Elle a été divisée en 5 blocs, 4 d'entre eux mesurant 9,6 m de longueur et de 4,5 m de largeur et le dernier de 3,8 m de longueur et 10 m de largeur. Ces blocs sont séparés par des corridors d'une largeur d'un mètre qui n'ont pas été amendés (Figure 4.1). Les 4 blocs de mêmes dimensions ont été amendés le 31 mars 2017 (T0) (Figure 4.4) avec différentes combinaisons d'amendements, dont les caractéristiques sont détaillées dans le paragraphe 1.2. Les amendements ont été incorporés à l'aide d'un motoculteur sur une profondeur d'environ 25°cm. Le bloc PB, qui est situé le plus en amont d'un point de vue hydrographique a été amendé par du biochar de bois dur de granulométrie 0,5-1 mm provenant de La carbonerie (Crissey, France) à un taux de 2 % (m/m) ; le bloc PC a été amendé avec du compost à 5 % de marque Algoflash (support de culture NF U 44-551) composé de tourbe de sphaignes, compost d'écorces de résineux, compost vert, algue, engrais CE ; le bloc PBC a été amendé par une combinaison de biochar à 2 % et de compost à 5 % et enfin le bloc PBCS a été amendé par la combinaison de 3 amendements, le biochar à 2 %, le compost à 5 % et du sulfate de fer à 0,15 % produit commercial (E-Leclerc).

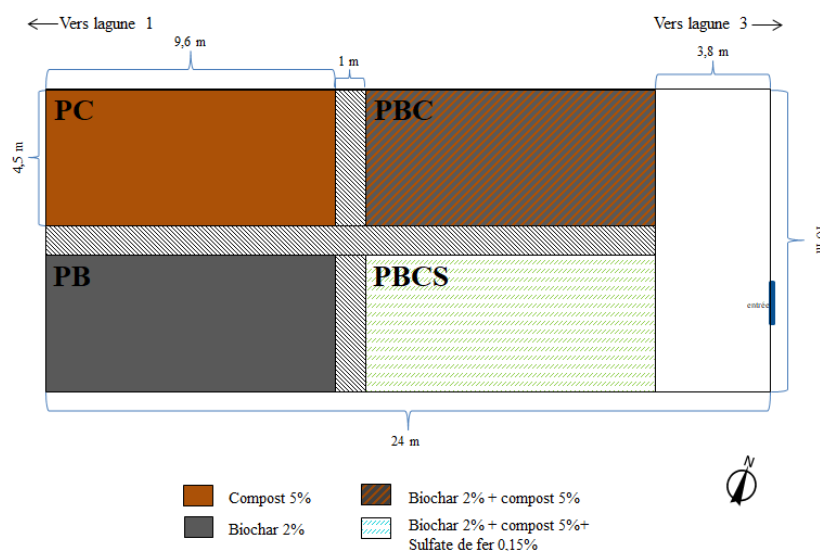


Figure 4.1 : Schéma conceptuel de la parcelle expérimentale avec séparation en 4 blocs amendés. PB : P + Biochar 2%, PC : P + Compost 5%, PBC : P + Biochar 2% + Compost 5%, et PBCS : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%.

Les blocs différemment amendés ont été subdivisés en 3 sous-blocs de la manière suivante : (1) un sous-bloc non végétalisé (NV), (2) un sous-bloc végétalisé avec du trèfle (Tr)

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

et (3) un sous-bloc végétalisé avec l'association du saule et du trèfle (STr) (Figure 4.2). Les sous-blocs (NV) et (Tr) présentent les mêmes dimensions, avec une longueur de 4,8 m et une largeur de 2 m, et séparés l'un de l'autre par un corridor de 50 cm de large ; par contre, le troisième sous-bloc (STr) possède des dimensions plus importantes, avec une longueur de 4,8 m et une largeur de 4,5 m. Sur chacun des sous-blocs, un piézomètre de 2 m de profondeur a été installé. Deux autres piézomètres ont été mis en place, l'un à l'amont et l'autre à l'aval de la parcelle expérimentale.

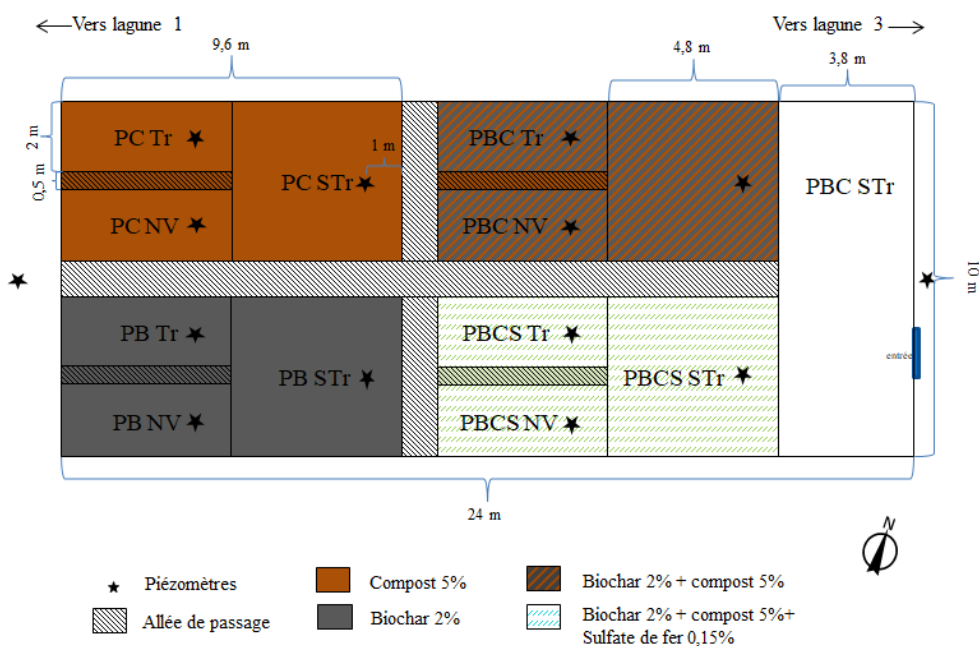


Figure 4.2 : Schéma conceptuel de la parcelle expérimentale avec emplacement des piézomètres (étoiles en noir) sur les différents blocs amendés et emplacement des piézomètres. PB : P + Biochar 2%, PC : P + Compost 5%, PBC : P + Biochar 2% + Compost 5%, et PBCS : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%.

Six espèces de saules, dont la préparation est détaillée paragraphe 1.3, ont été implantées le même jour que l'incorporation des amendements (31/03/2017) (à T0) (Figure 4.4) sur les sous-blocs (STr) de manière aléatoire, avec un espacement entre individus de 75 cm correspondant à 42 plants par sous-bloc (soit précisément 19 444 plants à l'hectare) (Figure 4.3). Cet espacement correspond aux normes d'implantation utilisées lors d'une culture d'un taillis à très courte rotation qui doit comprendre entre 10 000 et 20 000 plants par hectare (source : biomasse Normandie).

Quatre espèces de saules déjà étudiées en mésocosme montrant un bon potentiel en phytoremédiation (Lebrun et al., 2017) ont été implantées : (1) *Salix alba* est représenté par 10 plants par sous-bloc, (2) *Salix purpurea* par 6 plants par sous-bloc, (3) *Salix triandra* par 12 plants par sous-bloc, et (4) *Salix viminalis* par 10 plants par sous-blocs. Cependant, un « défaut » de 4 plants par bloc a dû être comblé par l'implantation de 3 saules endémiques,

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

d'espèce non identifiées, provenant de boutures d'un saule autochtone situé sur la lagune 2 en aval de la parcelle expérimentale et 1 *Salix atrocinerea* par bloc. Les espèces *Salix alba*, *Salix atrocinerea*, *Salix purpurea*, *Salix triandra*, et *Salix viminalis* provenaient de la pépinière ONF de Guémené-Penfao (Loire-Atlantique, France). Lors de la plantation, les jeunes plants issus de boutures étaient enracinés et âgés de 11 mois.

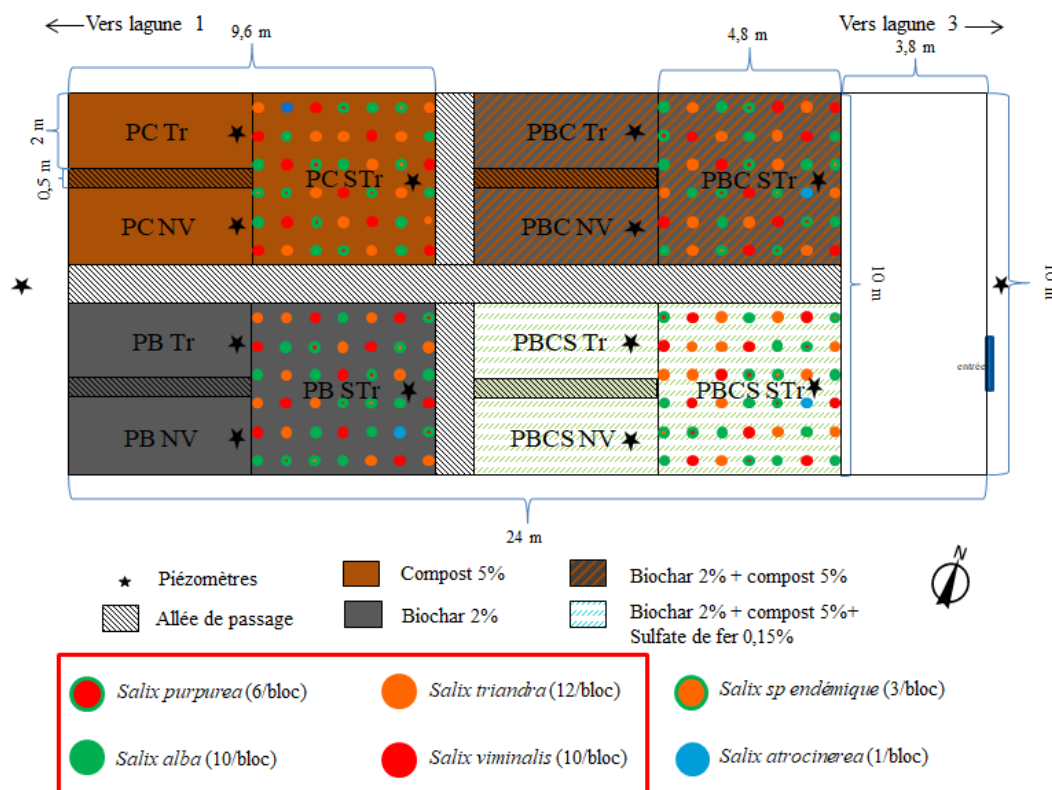


Figure 4.3 : Schéma conceptuel de la parcelle expérimentale avec emplacement des espèces de saules (*Salix purpurea*, *Salix alba*, *Salix triandra*, *Salix viminalis*, *Salix sp* autochtone et *Salix atrocinerea*) sur les différents blocs amendés et emplacement des piézomètres. PB : P + Biochar 2%, PC : P + Compost 5%, PBC : P + Biochar 2% + Compost 5%, et PBCS : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%.

Le trèfle blanc (*Trifolium repens*) a été semé sur les sous-blocs (Tr) et (STr) un mois et demi après incorporation des amendements (15/05/2017) (T1) (Figure 4.4), à une densité de 7 kg par hectare, ce qui correspond au double des densités de semis conventionnelles utilisées en agriculture (source Arvalis). Les graines de trèfle utilisées sont des graines commerciales (Caillard, Avignon, France).

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

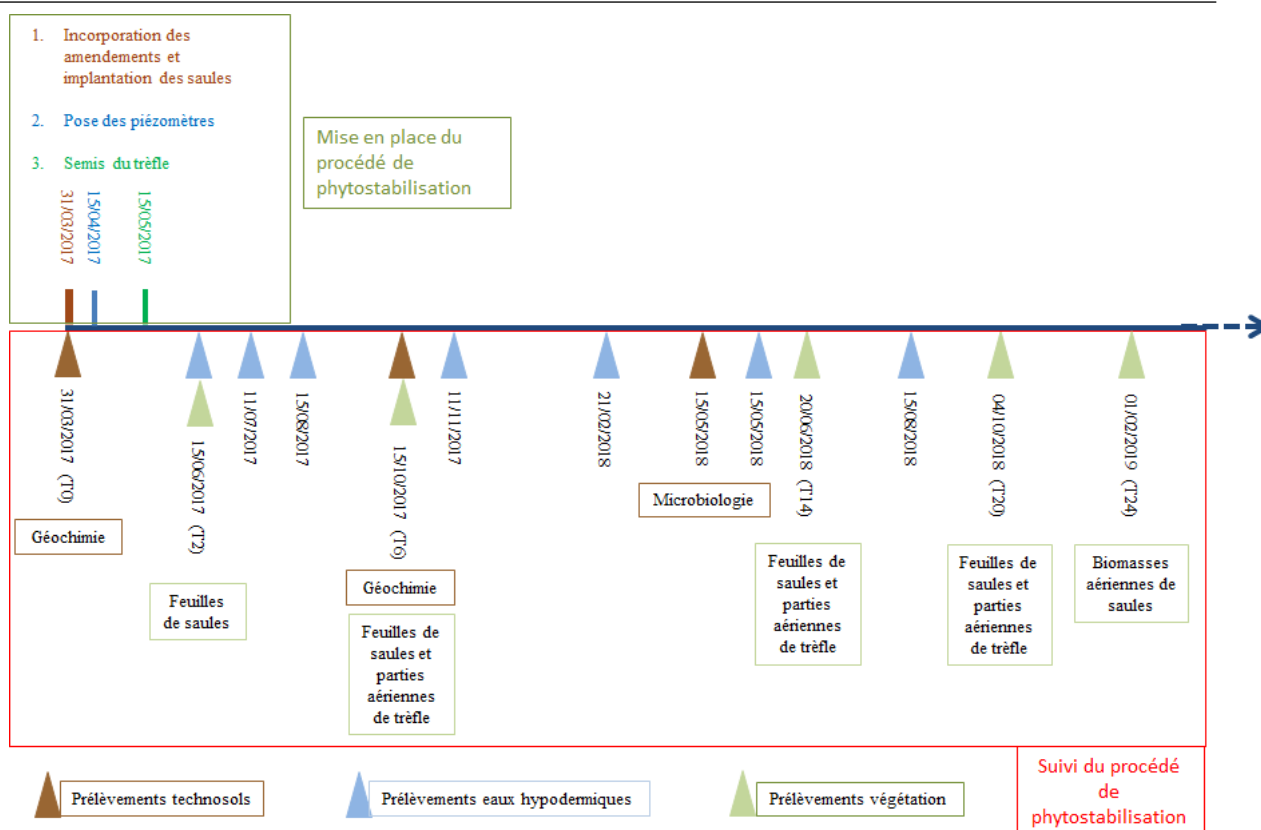


Figure 4.4 : Chronologie de la mise en place et de suivi du procédé de phytostabilisation assistée sur la parcelle expérimentale de Pontgibaud

1.2. Les amendements

Les trois amendements utilisés dans notre étude possèdent des caractéristiques physico-chimiques différentes (Tableau 4.1), s'expliquant de par leurs natures. En effet, deux sont des amendements organiques, le biochar et le compost ; le sulfate de fer quant à lui est un amendement inorganique. Des mesures du carbone organique menées sur le biochar et le compost ont permis de mettre en évidence les taux de C_{org} contenu dans ces deux amendements. Ainsi, parmi les amendements organiques, le biochar possède le plus fort taux de carbone organique (près de 80 %), alors que celui du compost est plus de 3 fois inférieur. Ce taux de 80 % est souvent retrouvé dans la littérature (*Wang et al., 2017*). Cette forte teneur en C combinée à un très faible taux d'azote total entraîne un rapport C/N très élevé (96,8) supérieure à 20 qui est la valeur limite précautionnée en agriculture. Au contraire, le compost possède un ratio C/N inférieur à 15 traduisant une possible vitesse de décomposition élevée, et donc un apport en nutriments pour les végétaux plus rapide. La capacité d'échange cationique (CEC) la plus forte a été mesurée pour le compost, et était 14 fois plus élevée que celle du biochar. Cette CEC élevée peut s'expliquer par la présence de nombreux groupements fonctionnels dans le compost (cf chapitre I). Le pH alcalin du biochar a déjà été observé dans

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

Lebrun *et al.* (2017, 2018), et Nandillon *et al.* (2019) et peut s'expliquer par sa composition comprenant des éléments alcalins tel que le calcium (cf chapitre I). Le pH du compost utilisé est légèrement acide, ceci peut s'expliquer par certains de ces composés tels que la tourbe de sphaignes ou le compost d'écorces de résineux. Le phosphore et le potassium phytodisponibles sont présents à des taux variables en fonction des amendements. L'amendement fournissant le plus de nutriments est, comme attendu, le compost, avec des teneurs phytodisponibles de 10 à 29 fois plus élevées pour P et de 1,8 à 174 fois plus élevées pour K par rapport au biochar et au sulfate de fer (Tableau 4.1). Ceci s'explique par la nature même de l'amendement qui contient de l'engrais rajouté par le fabricant. Enfin, les valeurs de concentrations phytodisponibles de l'arsenic et le plomb étaient faibles pour le biochar et le compost, de l'ordre de quelques milligrammes. Le sulfate de fer possédait des concentrations de Pb et d'As 20 fois plus élevées que celles obtenues pour le biochar et le compost. Comme attendu, la concentration en fer libérée par le sulfate de fer en conditions non tamponnées était plusieurs milliers de fois supérieure à celles des deux autres amendements.

Tableau 4.1 : propriétés physico-chimiques des amendements. Mesures de la capacité d'échange cationique (CEC), du carbone organique total (C_{org}), de l'azote total (N_{tot}), calcul du rapport C_{org}/N_{tot} , concentrations phytodisponibles ($mg.kg^{-1}$) du phosphore, du potassium, de plomb, de l'arsenic et du fer. Les résultats sont exprimés par la valeur moyenne $\pm$ l'erreur standard ($n = 3$).

	biochar	compost	sulfate de fer
C_{org} %	77,4 $\pm$ 1,6 a	24,7 $\pm$ 1,5 b	ND
N_{tot} %	0,8 $\pm$ 0,1 b	2,0 $\pm$ 0,2 a	ND
C_{org}/N_{tot}	96,8	12,4	ND
CEC ($cmol.kg^{-1}$)	0,5 $\pm$ 0,0 c	7,0 $\pm$ 0,0 a	ND
pH	9,0 $\pm$ 0,0 a	5,5 $\pm$ 0,0 b	2,6 $\pm$ 0,0 c
[P] ($mg.kg^{-1}$)	8,4 $\pm$ 0,6 c	240,9 $\pm$ 29,6 a	25,4 $\pm$ 1,2 b
[K] ($mg.kg^{-1}$)	752,3 $\pm$ 27,9 b	1374,8 $\pm$ 99,3 a	7,9 $\pm$ 0,7 c
[As] ($mg.kg^{-1}$)	0,9 $\pm$ 0,1 b	0,7 $\pm$ 0,3 b	16,5 $\pm$ 0,5 a
[Pb] ($mg.kg^{-1}$)	1,6 $\pm$ 0,1 b	0,4 $\pm$ 0,0 c	22,2 $\pm$ 0,9 a
[Fe] ($mg.kg^{-1}$)	17,9 $\pm$ 5,1 b	1,3 $\pm$ 0,3 c	23265,2 $\pm$ 299,4 a

ND = Non Déterminé. Les lettres minuscules indiquent des différences significatives entre les amendements.

1.3. Obtention des boutures enracinées de saule

Pour chaque espèce étudiée, 50 boutures ligneuses (ONF, Guémène PENFAO) mesurant 15 cm de long et environ 1,2 cm de diamètre ont été placées à enraciner le 26 avril 2016 en serre dans du sable. Après 16 jours de développement, les boutures disposant d'un système racinaire et d'au moins un bourgeon axillaire en croissance ont été placées individuellement dans des pots de 400 ml contenant un mélange sable (75 %) – terreau (25 %). Enfin, 69 jours plus tard les plants ont été transférés dans des pots de 2 litres avec un mélange terre végétale

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

(75 %) et terreau (25 %) et déposées à l'extérieur jusqu'à implantation sur la parcelle. Lors de leur implantation ces derniers ont été recépés. Le temps total écoulé entre le bouturage et l'installation sur site a été de 11 mois.



a



b



c



d

Figure 4.5 : Photos des différentes étapes de la mise en place de la stratégie de phytomanagement sur la parcelle expérimentale. (a) photo de la parcelle à l'état initial, (b) photo de la parcelle en février 2017 après labour du technosol, (c) photo du 31 mars 2017 de la parcelle expérimentale en cours d'amendement bloc PBC et (d) photo du 31 mars 2017 de la parcelle expérimentale après implantation des saules.

1.4. Mise en place de la végétation

La végétation implantée au 30 mars 2017 pour les saules et au 15 mai 2017 pour le trèfle s'étaient rapidement développée sur les différents blocs six mois après leur implantation, comme le montre la figure 4.6. Il faut toutefois noter que le trèfle sur le bloc PB n'a pas germé, qu'il soit combiné avec le saule ou seul, laissant le sous-bloc PB Tr sans végétation. Dans tous les autres sous-blocs plantés, la végétation n'a pas été impactée par les conditions météorologiques locales des deux dernières années, un hiver rigoureux (jusqu'à -15°C) et des fortes chaleurs en été (35°C). En effet, aucune mortalité de saule n'a été observée entre la première année de végétation et la deuxième. De même le trèfle n'a pas subi de dégât lié au gel ou aux fortes chaleurs.

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

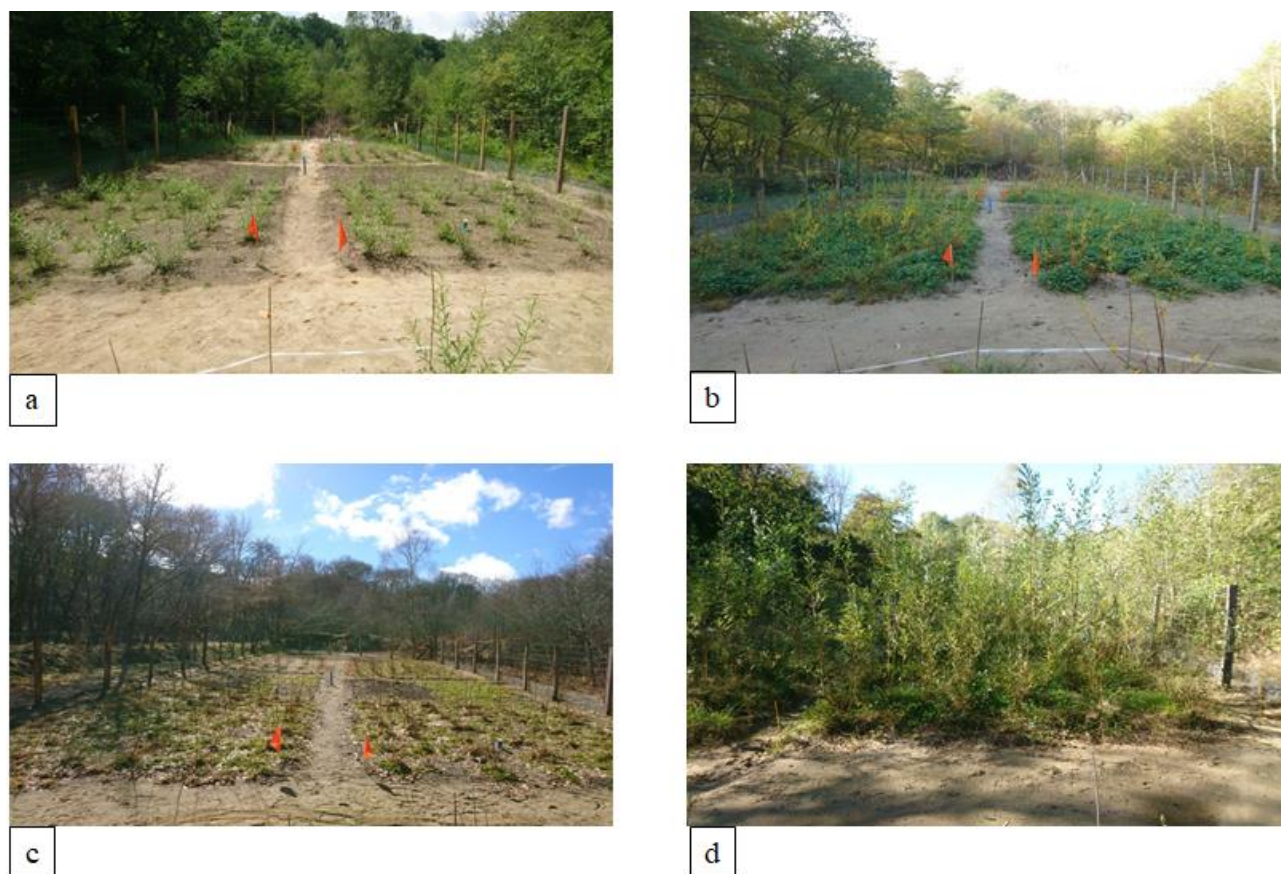


Figure 4.6 : Photos de l'évolution de la végétation de la parcelle expérimentale (a) photo lors du prélèvement de feuilles de saule en juin 2017 (T2), (b) photo lors du prélèvement de feuilles de saule en octobre 2017 (T6), (c) photo du 15 mars 2018 et (d) photo du bloc PBC lors du prélèvement de feuilles de saule en octobre 2018 (T20).

2. Caractérisation géochimique de la parcelle expérimentale lors de la première année

Les prélèvements d'échantillons pour évaluer les paramètres géochimiques du technosol ont été réalisés juste après l'incorporation des amendements (T0) et six mois et demi après (T6) (Figure 4.4).

2.1. Caractérisation agronomique de la parcelle expérimentale

L'analyse des paramètres physico-chimiques mesurés sur le sol de Pontgibaud (cf. chapitre 2) avait démontré qu'il s'agissait d'un sol de mauvaise qualité d'une part d'un point de vue agronomique avec un taux de MO, ainsi qu'un pH, une CEC et des teneurs en P et K phytodisponibles inférieures aux valeurs recommandées et d'autre part du point de vue phytotoxique du fait qu'il présentait des concentrations très élevées d'As (550 mg.kg^{-1}) et de Pb ($9\,900 \text{ mg.kg}^{-1}$). Il a donc été essentiel de mesurer l'évolution de ces paramètres après ajout d'amendements (Tableau 4.2).

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

Tableau 4.2 : Paramètres agronomiques du technosol : mesures de la capacité d'échange cationique (CEC), du carbone organique total (C_{org}), de la matière organique (MO), de l'azote total (N_{tot}) et du rapport C_{org}/N_{tot} après ajout d'amendements (T0) et 6,5 mois après l'apport d'amendements (T6) pour les différents blocs. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. NV : non végétalisé, Tr : végétalisé avec *Trifolium repens* STr : végétalisé avec *Salix* et *Trifolium repens*.

Blocs	pH	CEC ($cmol.kg^{-1}$)	C_{org} %	MO %	N_{tot} %	C/N
P T0	4,8±0,1 c	0,7±0,0 c	0,3±0,0 d	0,47±0,04	< LQ d	ND
PB T0	5,7±0,1 b	0,6±0,0 c	3,7±0,0 b	6.4	< QL d	ND
PB T6 NV	5,7±0,2 B	0,9±0,0 B	2,8±0,0 C	4.8	< QL C	ND
PB T6 Tr	5,4±0,2 β	0,7±0,0 γ	3,2±0,1 γ	5.5	< QL δ	ND
PB T6 STr	5,9±0,3 ²	0,8±0,0 ²	2,3±0,0 ³	4.0	< QL ³	ND
PC T0	5,6±0,0 b	1,4±0,1 b	2,1±0,1 c	3.6	0,1±0,0 c	16
PC T6 NV	5,6±0,1 B	1,6±0,0 A	2,9±0,0 C	5.0	0,1±0,0 B	21
PC T6 Tr	5,6±0,1 β	1,5±0,0 β	2,5±0,0 δ	4.3	0,1±0,0 β	18
PC T6 STr	5,7±0,2 ²	1,6±0,0 ¹	3,1±0,1 ³	5.3	0,1±0,0 ^{1,2}	21
PBC T0	6,9±0,1 a	1,8±0,1 a	6,4±0,2 a	11.0	0,2±0,0 a	37
PBC T6 NV	7,1±0,2 A	1,6±0,1 A	6,5±0,1 A	11.2	0,2±0,0 A	39
PBC T6 Tr	6,9±0,1 α	1,7±0,1 α	4,0±0,1 β	6.9	0,1±0,0 γ	42
PBC T6 STr	6,9±0,3 ¹	1,7±0,0 ¹	4,5±0,1 ²	7.7	0,1±0,0 ²	37
PBCS T0	5,6±0,1 b	1,6±0,0 ab	6,1±0,3 a	10.5	0,1±0,0 b	44
PBCS T6 NV	5,1±0,4 B	1,5±0,0 A	4,8±0,1 B	8.3	0,1±0,0 B	36
PBCS T6 Tr	5,2±0,2 β	1,5±0,0 αβ	5,9±0,1 α	10.1	0,1±0,0 α	44
PBCS T6 STr	6,0±0,3 ²	1,5±0,0 ¹	5,4±0,1 ¹	9.3	0,1±0,0 ¹	36
Effet amendements	*	*	*	ND	*	ND
Effet temps	ns	ns	ns	ND	ns	ND
Effet plante	ns	ns	ns	ND	ns	ND

Les lettres minuscules indiquent des différences significatives entre les traitements à T0 ; les lettres majuscules indiquent des différences significatives entre les traitements sans végétation à T6 ; les lettres grecques indiquent des différences significatives entre les traitements avec *Trifolium repens* à T6 et les chiffres en exposant indiquent des différences significatives entre les traitements avec *Trifolium repens* et *Salix* à T6 ($p < 0,05$) ($n = 3 \pm SE$). Niveau d'importance : * $p < 0,05$, ns = non significatif, LQ = Limite de Quantification, ND = Non Déterminé.

Le pH du sol de Pontgibaud était de 4,8, avant ajout des amendements. Celui-ci a augmenté significativement de 1,17 fois pour PB, PC et PBCS et de 1,44 fois pour PBC (Tableau 4.2). Cette augmentation du pH était attendue compte tenu du pH des différents amendements (Tableau 4.1). En outre, aucun effet temps ni effet végétation n'a été observé. L'observation de la modification du pH par les amendements est conforme à celle d'autres études (*Jones et al., 2012 ; Beesley et al., 2014 ; Lebrun et al., 2017, 2018a, 2018b 2018c*). Deux mécanismes peuvent expliquer cette variation du pH (cf chapitre I partie 4.2.2). De plus, la baisse de pH de 1,3 unités entre le bloc PBC et le bloc PBCS s'explique par l'ajout de sulfate de fer qui acidifie le sol en générant des protons ($4FeSO_4 + O_2 + 6H_2O \rightarrow 4FeOOH + 4SO_4^{2-} + 8H^+$) (*Komárek et al., 2013*).

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

La capacité d'échange cationique (CEC) d'un sol est un paramètre important pour informer sur la capacité de ce dernier à retenir les nutriments inorganiques tels que le K^+ et le NH_4^+ dans le sol (*Lee et al.*, 2013). Dans le cas présent, une augmentation de la CEC de 2,3 fois en moyenne par rapport au technosol de Pontgibaud non amendé peut être observée sur les blocs PC, PBC et PBCS. Aucune augmentation n'a été observée sur le bloc PB. Ces résultats obtenus peuvent s'expliquer par les valeurs de CEC trouvées pour les différents amendements où seul le compost a une CEC supérieure à celle du sol (Tableau 4.1). Ces résultats concordent avec l'étude d'Agegnehu *et al.* (2015) qui démontrait que l'ajout de biochar et de compost permettaient d'améliorer la CEC d'un oxisol développé sur un basalte, indiquant que la rétention des cations dans le sol augmentait. Il faut également noter que pour les différents blocs, la CEC n'a pas évolué au cours du temps et n'a pas été impactée par la présence de végétaux. Et, malgré l'apport d'amendements, l'augmentation de la CEC pour les blocs PC, PBC et PBCS demeurerait toutefois insuffisante pour un sol agronomiquement viable. En effet, les valeurs obtenues étaient toutes inférieures à 4 cmol.kg^{-1} correspondant à une fertilité très faible (*Doucet 2006*).

Lorsque les différents amendements ont été ajoutés au technosol, le taux de matière organique (MO) à T0 a augmenté sur tous les blocs et ce de façon significative. En effet, nous avons constaté une augmentation de 31,5 ; 15,5 ; 49,5 et 49 fois pour les blocs PC, PB, PBCS et PBC respectivement, par rapport à P (Tableau 4.2). Enfin, le suivi à T6 des sous-blocs végétalisés et non végétalisés n'a montré aucun impact de la végétation sur la teneur en MO. Ce taux de matière organique est cette fois-ci supérieur au taux recommandé de 2,5 % (*Doucet 2006*). L'augmentation de la MO à la suite de l'ajout de biochar est bien connue (*Lebrun et al.*, 2018b). Par exemple, *Laghari et al.* (2015) ont observé une augmentation de 25 % de la matière organique d'un sol désertique après avoir appliqué 45 t.ha^{-1} de biochar issu de sciure de pin. De même, *Madéjon et al.* (2018) ont observé une augmentation de 78 % du carbone organique total lorsque du compost de biosolides à $30 \text{ t.ha}^{-1}.\text{an}^{-1}$ a été ajouté pendant 2 ans sur des boues liées à un déversement accidentel d'une mine. Cette augmentation peut s'expliquer par deux mécanismes combinés : un effet propre au biochar et au compost, mais également un effet lié du au développement des végétaux. Il a été démontré que le biochar contient des niveaux élevés de carbone organique (*Bian et al.*, 2014 ; *Beesley et al.*, 2014), tout comme le compost (*Fischer et Glaser*, 2012) (Tableau 4.1). Dans le cas du technosol de Pontgibaud, il n'y a pas eu d'impact de la végétation sur le taux de matière organique. D'une façon générale il a été montré que l'augmentation du taux de MO dans un sol favorise : son

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

aération, l'apport de nutriments, la rétention d'eau et en sus fournit un bon support de croissance aux microorganismes du sol, permettant ainsi une amélioration de la croissance des végétaux (*Agegnehu et al., 2015*). Cette amélioration de la croissance des végétaux apportera une augmentation de MO au sol par la libération d'exsudats racinaires d'une part et par un retour de MO produite par la décomposition de tissus végétaux d'autre part (*Ciadamidaro et al., 2014*).

La teneur en azote total à T0 a augmenté de façon significative avec l'ajout des amendements, sauf avec le biochar seul (PB). L'observation à T6 des sous-blocs Tr et STr et du sous-bloc NV des différents blocs n'a démontré aucun effet de la végétation sur la teneur en azote totale du technosol. Le trèfle, qui est une plante fixatrice d'azote, n'a pas permis d'améliorer la teneur en azote du sol après 6 mois de développement.

Enfin, les taux de carbone et les taux d'azote dans les sols nous ont permis de calculer le rapport C/N pour les blocs PC, PBC et PBCS. Le rapport C/N pour le bloc PB tout comme pour le technosol P n'a pas pu être calculé du fait des teneurs en N inférieures aux limites de quantification de l'appareil de dosage. Pour le bloc PC contenant du compost, le rapport C/N était le plus faible (aux alentours de 20), mais restait relativement élevé par rapport à un C/N de sol agricole qui est généralement proche de 10. Ce rapport C/N pour PC montre un apport en azote suffisant aux plantes et microorganismes et ainsi permettre une bonne décomposition de la matière carbonée. Pour les deux autres blocs, PBC et PBCS, le rapport de C/N était plus de 2 fois supérieur à 20, mais cela est probablement lié à la présence de matière organique non biodégradable, ce qui surestime le réel rapport C/N utilisable par les organismes vivants.

Le phosphore est un élément essentiel pour les plantes en exerçant divers rôles et notamment la production d'énergie en étant le composant principale de l'adénosine triphosphorique (ATP). Il est parfois en quantité faible dans les sols il est alors nécessaire d'en apporter pour la bonne croissance des végétaux. Les analyses des concentrations de P phytodisponible à T0 obtenu par extraction à l'aide d'une solution de nitrate d'ammonium ont montré une augmentation par rapport au technosol non amendé (P) de 3,5 fois après l'ajout de biochar et de 12 fois à 13,3 fois avec du compost seul ou en combinaison avec du biochar (Tableau 4.3). Ceci est conforme aux résultats obtenus sur la phytodisponibilité du P dans le biochar (8,4 mg.kg⁻¹) et le compost (240 mg.kg⁻¹) (Tableau 4.1).

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

Tableau 4.3: Concentrations phytodisponibles de P, P₂O₅, K et K₂O (mg.kg⁻¹), après ajout d'amendements (T0) et 6,5 mois après l'apport d'amendements (T6) pour les différents blocs. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. NV : non végétalisé, Tr : végétalisé avec *Trifolium repens* STTr : végétalisé avec *Salix* et *Trifolium repens*.

Blocs	[P] (mg.kg ⁻¹)	[P ₂ O ₅] (mg.kg ⁻¹)	[K] (mg.kg ⁻¹)	[K ₂ O] (mg.kg ⁻¹)
P T0	1,1±0,1 d	2,4±0,3 d	15,6±0,2 d	19,0±0,3 d
PB T0	3,9±0,4 c	9,0±0,9 c	42,5±2,4 c	51,2±2,9 c
PB T6 NV	1,7±0,1 C	3,9±0,2 C	41,4±0,3 C	49,9±0,4 C
PB T6 Tr	2,0±0,3 γ	4,6±0,7 γ	22,7±0,5 β	27,3±0,6 β
PB T6 STTr	3,3±0,1 ²	7,6±0,2 ²	22,8±0,1 ²	27,4±0,1 ²
PC T0	13,2±2,3 a	30,2±5,2 a	114,0±13,2 b	137,3±18,6 b
PC T6 NV	3,3±0,1 B	7,6±0,2 B	59,4±1,0 B	71,6±1,3 B
PC T6 Tr	5,0±0,3 α	11,5±0,6 α	49,1±1,5 α	59,1±1,8 α
PC T6 STTr	4,5±0,1 ¹	10,3±0,3 ¹	42,4±1,0 ¹	51,1±1,2 ¹
PBC T0	14,6±2,4 a	33,5±5,4 a	182,2±42,3 a	219,5±51,0 a
PBC T6 NV	5,4±0,6 A	12,4±1,4 A	98,1±3,2 A	118,2±3,9 A
PBC T6 Tr	3,2±0,2 β	7,4±0,4 β	47,3±2,4 α	57,0±2,9 α
PBC T6 STTr	4,6±0,2 ¹	10,5±0,5 ¹	53,6±4,2 ¹	64,5±5,1 ¹
PBCS T0	7,4±0,7 b	17,0±1,5 b	171,2±15,4 ab	206,3±18,6 ab
PBCS T6 NV	2,3±0,1 B	5,2±0,2 B	51,6±4,0 C	62,2±4,9 C
PBCS T6 Tr	3,5±0,2 β	8,0±0,5 β	35,8±1,7 α	43,2±2,0 α
PBCS T6 STTr	4,7±0,5 ¹	10,9±1,1 ¹	38,3±3,8 ^{1,2}	46,2±4,6 ^{1,2}
Effet amendements	*	*	**	*
Effet temps	*	*	**	*
Effet plante	ns	ns	*	ns

Les lettres minuscules indiquent des différences significatives entre les traitements à T0 ; les lettres majuscules indiquent des différences significatives entre les traitements sans végétation à T6 ; les lettres grecques indiquent des différences significatives entre les traitements avec *Trifolium repens* à T6 et les chiffres en exposant indiquent des différences significatives entre les traitements avec *Trifolium repens* et *Salix* à T6 (p < 0,05) (n = 3 ± SE). Niveau d'importance : ** p < 0,01, * p < 0,05, ns = non significatif

Fresno *et al.* (2016) ont observé dans un technosol amendé avec du sulfate de fer une augmentation du phosphore phytodisponible plus importante lors de l'ajout de compost que lors d'un apport de biochar. Dans notre cas, pour la modalité PBCS (combinaison de compost de biochar et de sulfate de fer), une diminution de la phytodisponibilité du phosphore par rapport au bloc PBC a été observée. Ceci est d'autant plus étonnant que la quantité de P phytodisponible avec le sulfate de fer était supérieure à celle du biochar. Cette diminution de phosphore phytodisponible a également été constatée dans l'étude d'Oustrière *et al.* (2016) lorsque la grenaille de fer a été associée au biochar et au compost dans un sol contaminé au cuivre. Cette diminution pourrait s'expliquer par le fait que le phosphore, tout comme l'arsenic, peuvent être immobilisés par adsorption sur les oxydes de fer, qui sont les principaux minéraux contrôlant la mobilité du phosphore (Yan *et al.*, 2017).

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

Il faut également noter que toutes les concentrations de phosphore disponibles dans les blocs, tous sous-blocs confondus, ont diminué en moyenne de trois fois entre avril 2017 (T0) et octobre 2017 (T6), ce qui indique un effet temps. Deux hypothèses peuvent être formulées concernant cette diminution : (1) soit une partie du phosphore apporté a été lessivée durant cette période, (2) soit la part de phosphore phytodisponible a diminuée par des phénomènes de précipitation avec le plomb et d'absorption par les végétaux (*Bolan et al., 2014*). Contrairement à ce qui a été montré par *Chen et al., 2016*, il ne semble pas que dans notre cas il y ait eu une sécrétion suffisamment importante et efficace d'exsudats racinaires pour rendre disponible le P présent, en effet, aucune différence significative n'a été observée entre les sous-blocs végétalisés et non végétalisés.

Comme pour le phosphore, la concentration de potassium disponible à T0 était supérieure de 2,7 fois pour PB, à plus de 11 fois pour PBC et PBCS par rapport au technosol de Pontgibaud. Le bloc PC présente une teneur en K phytodisponible intermédiaire entre PB d'un côté et PBC et PBCS de l'autre (Tableau 4.3). Ceci est cohérent avec les concentrations de K disponibles dans les différents amendements apportés (Tableau 4.1). En effet le compost possède une teneur phytodisponible en K supérieure au biochar, ce qui explique que la teneur en K phytodisponible pour PC soit plus élevée que celle de PB. Les concentrations de K phytodisponible ont diminué de 1,9 fois en moyenne au cours du temps pour le PC et le PBCS et de 3,3 fois pour le PBCS. Par contre, aucune diminution n'a été observée pour le bloc PB. De plus, un effet des plantes a pu être observé. En effet, les concentrations de potassium phytodisponible ont diminué lors de la présence des végétaux, de 1,6 fois en moyenne pour l'ensemble des modalités.

Dans notre étude, les teneurs mesurées de P et K disponibles ont été obtenues *via* une extraction à l'aide d'une solution saline possédant un pouvoir extracteur supérieur à l'eau. En se référant aux valeurs indiquées par Védie (2008), les teneurs en P_2O_5 obtenues pour tous les blocs sont considérées comme des teneurs faibles pour des sols de qualité correcte. Les teneurs en K_2O quant à elles, pour une CEC inférieure à 8 cmol.kg^{-1} , sont considérées, toujours d'un point de vue agronomique, comme des teneurs élevées pour PC voire très élevées pour PBC et PBCS pour un sol de type agricole. Toutefois, pour les blocs PB, PC et PBCS, les teneurs en K_2O diminuent au cours du temps et deviennent de nouveau inférieures aux teneurs souhaitables pour un sol agronomiquement viable. Celles-ci diminuent encore davantage en présence de végétaux sans doute dû à son absorption faisant passer les teneurs en K_2O en-dessous des teneurs souhaitables attendues pour tous les blocs.

Les résultats des teneurs en P et K montrent que les amendements ont permis d'améliorer le pool de ces deux éléments dans le technosol et ainsi de remédier aux

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

principales carences en nutriments pour les plantes. Cependant, ces concentrations restent trop faibles pour le phosphore ($< 50 \text{ mg P}_2\text{O}_5/\text{kg}$) et une diminution de sa concentration est observée au cours du temps. Au vu des résultats, il semblerait qu'un apport régulier de phosphore et de potassium soit nécessaire pour maintenir un stock suffisamment important pour le bon développement des végétaux, au moins en début de plantation. Il est possible que le retour de la matière organique lors de la chute des feuilles réduise cet effet.

2.2. Comportement géochimique des métaux et métalloïdes dans le sol

2.2.1. Répartition spatiale du plomb et de l'arsenic sur la parcelle expérimentale

La figure 4.7 présente les répartitions spatiales des valeurs des concentrations en plomb (a) et arsenic (b) du technosol de la parcelle expérimentale. Le tableau 4.4 rassemble quant à lui les concentrations moyennes en As et Pb sur les différents blocs à T0 c'est-à-dire juste après l'apport des amendements et pour les différents sous-blocs, 6 mois après ajout des amendements.

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

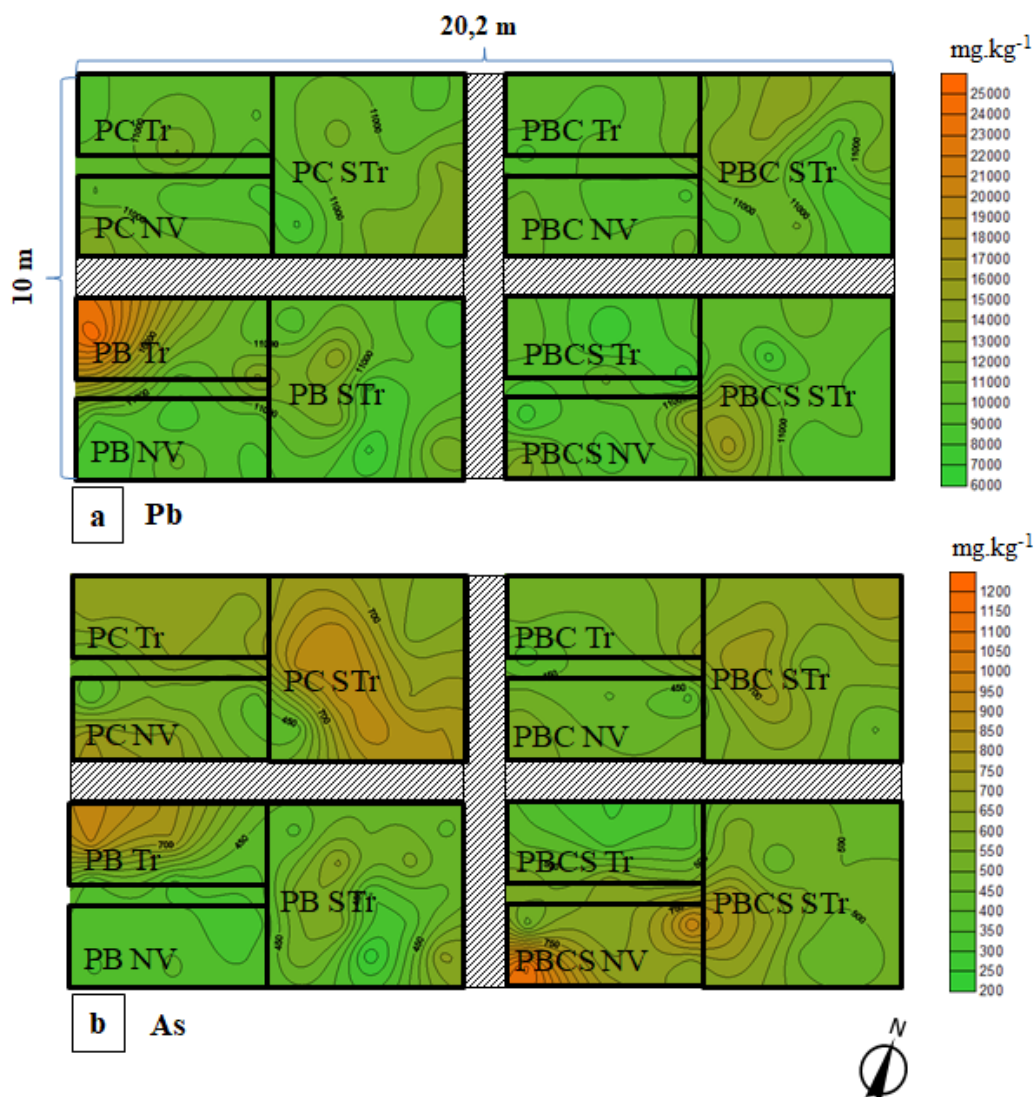


Figure 4.7 : Répartition spatiale, au niveau de la parcelle expérimentale après apport d'amendements, des valeurs de concentration du plomb (mg.kg^{-1}) (a) et de concentration de l'arsenic (mg.kg^{-1}) (b) pour les différents blocs. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%, à l'aide du logiciel surfer 8.

La distribution spatiale du plomb et de l'arsenic après amendements montre une modification de leur répartition. Elle met également en évidence l'existence de « hot spots » situé sur le bloc PB pour le plomb, et sur le bloc PBCS pour l'arsenic. D'après le tableau 4.4, nous pouvons observer que l'apport d'amendements n'a pas fait diminuer les teneurs totales des deux polluants, même si les concentrations moyennes en Pb et As sont relativement homogènes entre les différents blocs, de l'ordre $8,3 \text{ g.kg}^{-1}$ pour le plomb et de $0,5 \text{ g.kg}^{-1}$ pour l'arsenic. Il faut noter que le bloc PBC possède une concentration moyenne en plomb 1,2 fois inférieure aux blocs PB et PC. La concentration en As était quant à elle significativement plus élevée de 1,4 fois sur le bloc PC que sur le bloc PB. Par ailleurs, nous pouvons observer que les concentrations en Pb et As n'ont pas évolué au cours du temps. De même, les plantes n'ont eu aucun effet sur leurs concentrations totales.

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

Tableau 4.4 : Concentrations totales (mg.kg⁻¹) et fraction phytodisponible (%) du plomb et de l'arsenic, après ajout d'amendements (T0) et 6,5 mois après l'apport d'amendements (T6) pour les différents blocs. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. NV : non végétalisé, Tr : végétalisé avec *Trifolium repens* STr : végétalisé avec *Salix* et *Trifolium repens*.

Blocs	Pb		As	
	Concentration totale (mg.kg ⁻¹)	Fraction phytodisponible(%)	Concentration totale (mg.kg ⁻¹)	Fraction phytodisponible(%)
P T0	9902±587 a	28,6±1,2 b	548±59 ab	0,3±0,0 a
PB T0	9102±626 a	44,2±4,8 a	465±32 b	0,3±0,0 a
PB T6 NV	7419±465 A	17,0±3,8 AB	366±16 B	0,2±0,0 AB
PB T6 Tr	11147±2000 α	26,0±2,6 α	524±107 α	0,2±0,0 α
PB T6 STr	8473±546 ¹	39,2±2,5 ¹	484±39 ¹	0,3±0,0 ¹
PC T0	9172±261 a	6,9±0,5 c	663±31 a	0,3±0,0 a
PC T6 NV	8775±670 A	17,1±1,8 A	538±65 AB	0,2±0,0 A
PB T6 Tr	8988±525 αβ	16,3±1,8 αβ	637±31 α	0,2±0,0 α
PB T6 STr	9437±365 ¹	19,9±3,8 ²	735±42 ¹	0,2±0,0 ¹
PBC T0	7469±265 b	0,8±0,2 d	564±21 ab	0,4±0,0 a
PBC T6 NV	7043±354 A	0,7±0,2 C	496±33 AB	0,2±0,0 B
PB T6 Tr	7166±431 β	12,5±2,8 β	518±43 α	0,2±0,0 α
PB T6 STr	7805±456 ¹	5,3±1,9 ³	617±26 ¹²	0,2±0,0 ¹
PBCS T0	8181±385 ab	5,4±0,7 c	584±36 ab	0,3±0,0 a
PBCS T6 NV	8278±1052 A	10,5±2,9 B	743±117 A	0,1±0,0 B
PB T6 Tr	7242±637 β	16,3±0,7 β	488±61 α	0,3±0,0 α
PB T6 STr	8570±529 ¹	7,5±1,8 ³	555±27 ²	0,3±0,0 ¹
Effet amendements	ns	**	ns	ns
Effet temps	ns	**	ns	ns
Effet plante	ns	*	ns	ns

Les lettres minuscules indiquent une différence significative entre les traitements à T0 les lettres majuscules indiquent une différence significative entre les traitements non végétalisés (NV) à T6 ; les lettres grecques indiquent une différence significative entre les traitements végétalisés avec *Trifolium repens* (Tr) à T6 et les chiffres en exposant indiquent une différence significative entre les traitements végétalisés avec *Trifolium repens* et *Salix* (STr) à T6 (p<0,05) (n = 6 ± SE). **p<0,01, * p<0,05, ns : aucune différence significative.

2.2.2. Fractions phytodisponibles du plomb et de l'arsenic pour les différents blocs

La mesure des fractions phytodisponibles du plomb et de l'arsenic met en évidence un comportement différent du plomb en fonction des amendements. Ainsi, la fraction phytodisponible du plomb sur le bloc PB juste après ajout du biochar (T0) a augmenté de 1,6 fois, contrairement aux autres blocs qui ont vu leurs fractions phytodisponibles diminuer de 6,6 fois en moyenne par rapport au technosol non amendé. Au cours du temps, les fractions de plomb phytodisponibles ont évolué. Elle a notamment diminué de 2,6 fois pour le bloc PB,

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

alors qu'elle a augmenté de 2,6 et 2,0 fois pour PC et PBCS respectivement. Enfin, la végétation mise en place a entraîné une augmentation de la fraction phytodisponible du plomb sur le bloc PB de 1,9 fois et sur le bloc PBC de 12,7 fois si on les compare aux sous-blocs non végétalisés, ce qui démontre l'impact des plantes sur ce paramètre. Cependant, les fractions phytodisponibles pour les sous-blocs végétalisés de PC, PBC et PBCS restent inférieures à la fraction phytodisponible du technosol non amendé.

La diminution de la fraction phytodisponible sur les blocs contenant du compost peut s'expliquer par le fait que le compost contient de fortes concentrations en cations basiques, ainsi qu'une teneur élevée en matières organiques. Ces caractéristiques entraînent une augmentation à la fois du pH et de la CEC (*Pérez-Esteban et al. 2014*). Le pH joue un rôle majeur sur le comportement du plomb, la solubilité de nombreux minéraux tels que $\text{Pb}(\text{OH})_2$ et PbSO_4 diminuant lorsque le pH augmente. L'élévation du pH a probablement augmenté les charges superficielles des particules du sol et donc la rétention des métaux (*Pérez-Esteban et al. 2014*, *Yin et al. 2016*). La matière organique humifiée (c'est-à-dire stabilisée), qui a une grande capacité d'interaction avec les ions métalliques (*Grafe et al. 2002*), pourrait réduire leur mobilité (et donc leur biodisponibilité) en formant des complexes plus ou moins stables (*Geebelen et al. 2002* ; *Bolan et al. 2014*). De plus, le compost apportant une quantité plus élevée de phosphate que le biochar, ce dernier pourrait former des précipités avec le plomb et donc diminuer sa phytodisponibilité. Ceci expliquerait pourquoi, à T0, le compost réduisait de façon significative la phytodisponibilité du plomb contrairement au biochar. L'augmentation de la phytodisponibilité du plomb à T6 par rapport à T0 sur le bloc PC alors que celle sur le bloc PB diminuait, pourrait s'expliquer par le fait que le compost est très réactif, avec une quantité de matière organique rapidement dégradable, qui ne pouvait certainement plus jouer son rôle à T6. La matière humique contenue dans le compost, qui est plus résistante à la dégradation, a permis de maintenir la fraction phytodisponible du plomb sur le bloc PC inférieure à celle du technosol non amendé.

Enfin, la présence de végétaux joue un rôle dans la phytodisponibilité du plomb par la production d'exsudats racinaires qui, en fonction des amendements, n'auront probablement pas les mêmes caractéristiques et donc pas le même impact. En effet, plusieurs études ont montré que certains composés de faible poids moléculaire libérés par les racines des plantes (acides aminés, acides carboxyliques, sucres et composés phénoliques simples et flavonoïdes) peuvent jouer un rôle sur la biodisponibilité des métaux dans la rhizosphère (*Seshadri et al., 2015*). Les racines pourraient affecter les propriétés physico-chimiques, telles que le potentiel redox du sol et les conditions de chélation (*Seshadri et al., 2015*).

Pour l'arsenic, les fractions phytodisponibles n'ont pas été modifiées avec l'ajout des

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

amendements et n'ont pas évolué ni avec le temps, ni avec les plantes, comme cela a été observé précédemment dans Nandillon *et al.* (2019). L'augmentation du pH n'a pas eu d'effet sur la phytodisponibilité de l'arsenic contrairement à ce que nous pouvions attendre, ce qui démontre la relative stabilité de l'arsenic dans le technosol de Pontgibaud et la nécessité de limiter l'impact des amendements sur cette stabilité.

2.2.3. Répartition chimique du plomb et de l'arsenic sur les différents blocs : extractions séquentielles (BCR)

Des extractions séquentielles (BCR) ont été réalisées pour déterminer l'effet des amendements et de la croissance des végétaux sur les phases porteuses des polluants de la parcelle. Les résultats obtenus de l'analyse des différentes fractions déterminées par le protocole du BCR modifié sont compilés sous forme de graphique (Figure 4.8 et 4.9) et les statistiques correspondantes sont répertoriées dans les tableaux 3, 4, 5 et 6 en annexe 1.

Pour le plomb retrouvé dans la fraction acido-soluble (F1), nous observons, juste après amendement (T0), une diminution significative sur les blocs PBC et PBCS respectivement de 1,5 et 1,4 fois. Par contre, aucune évolution pour le bloc PC ainsi qu'une augmentation sur le bloc PB ont été constatées (Figure 4.8). De plus, aucun effet du temps ne semble avoir eu lieu sur les blocs PB, PC et PBC, alors que sur le bloc PBCS, la part de plomb acido-soluble a augmenté de 1,4 fois, 6 mois après l'apport d'amendements. L'impact des végétaux a été très limité. En effet, lorsque nous comparons les sous-blocs végétalisés (S et STr) avec les sous-blocs non végétalisés (NV), aucune évolution n'a été observée, exceptée sur le bloc PBC, où la fraction F1 a significativement augmenté de 1,5 fois en présence de plantes.

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

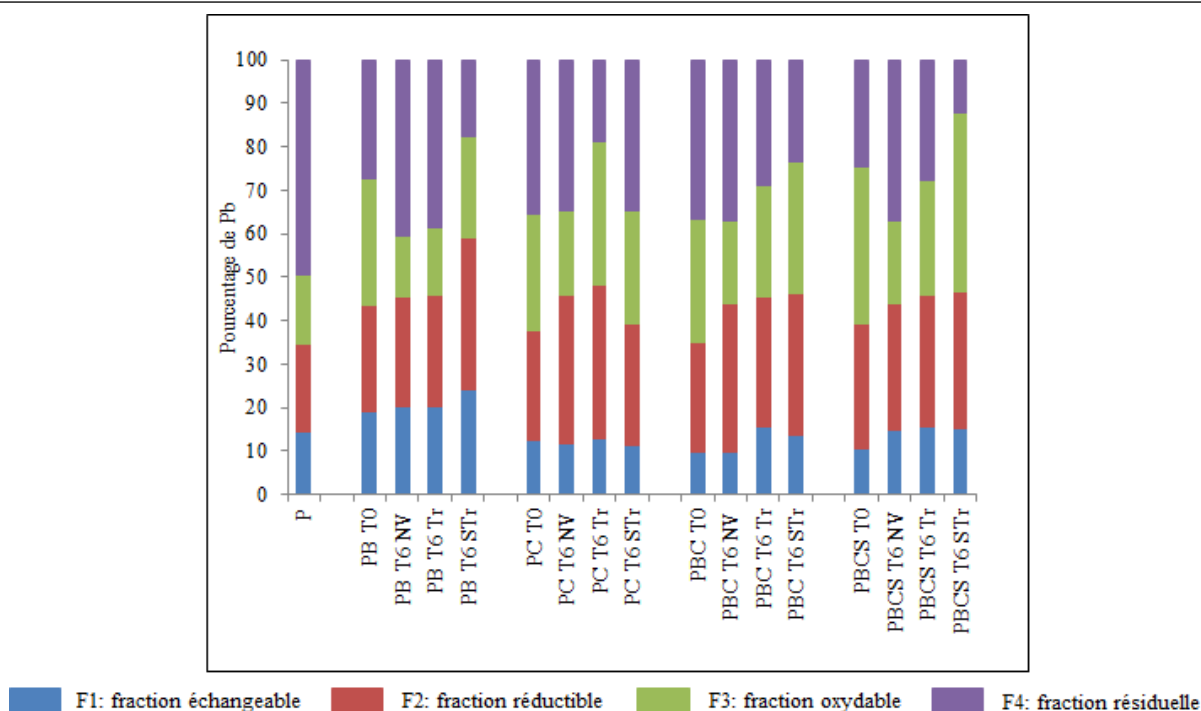


Figure 4.8 : Fraction de plomb (%) selon le protocole d'extraction séquentielle (BCR) au moment de l'incorporation des amendements (T0) et 6,5 mois après l'apport d'amendements (T6) pour les différents blocs. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. NV : non végétalisé, Tr : végétalisé avec *Trifolium repens* STr : végétalisé avec *Salix* et *Trifolium repens*. F1, fraction acido-soluble ; F2, fraction réductible ; F3, fraction oxydable ; F4, fraction résiduelle.

Globalement il apparaît que l'impact du processus de phytostabilisation aidée mis en place est très faible sur la fraction acido-soluble. En effet, sur les sous-blocs végétalisés avec du saule et du trèfle, la fraction F1 représente en moyenne 16 % et n'est pas significativement différente de la fraction F1 du technosol non amendé.

Concernant l'arsenic, la fraction acido-soluble (F1) était inférieure à 1 % pour le technosol non amendé ; celle-ci a augmenté significativement entre 1,4 et 2,4 fois après incorporation des amendements (Figure 4.9). Elle n'a pas évolué avec le temps excepté pour le bloc PB où cette dernière a augmenté de façon significative (1,7 fois) 6 mois après l'incorporation des amendements au technosol. De plus, il faut noter que les plantes n'ont eu aucun effet sur la fraction acido-soluble de l'arsenic au cours de cette période de 6 mois.

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

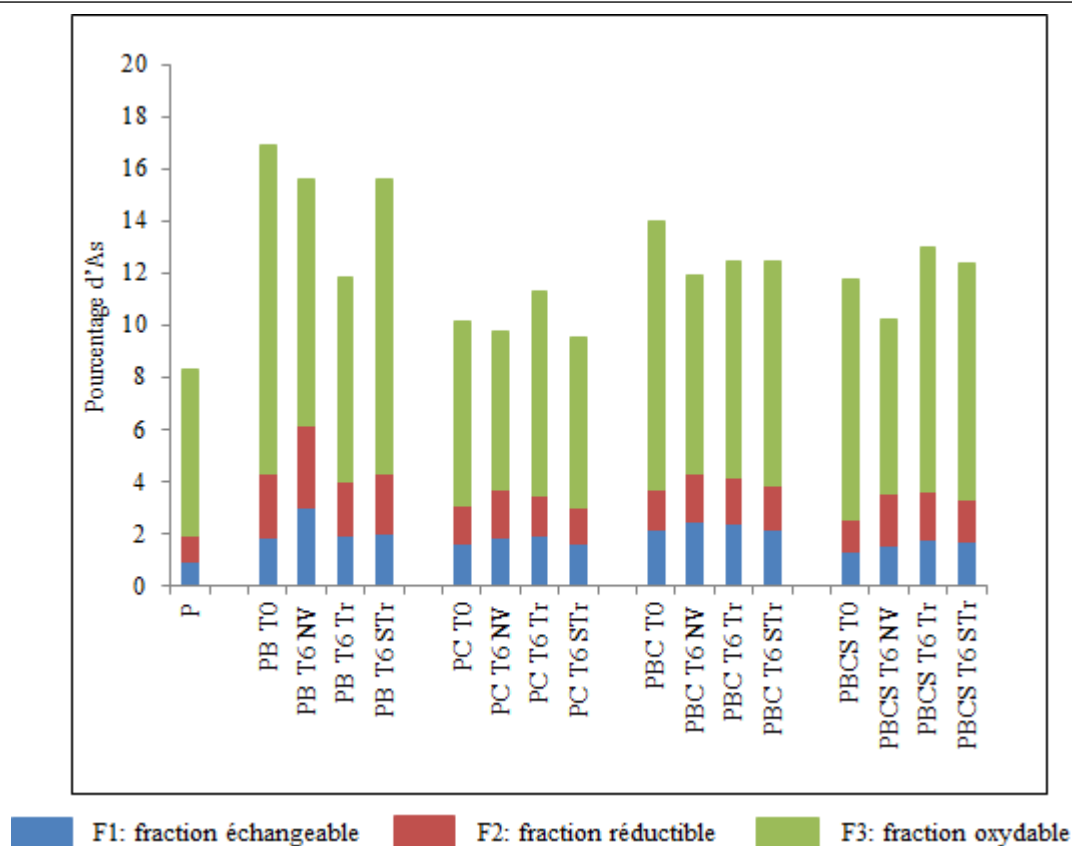


Figure 4.9 : Fraction d'arsenic (%) selon le protocole d'extraction séquentielle (BCR) au moment de l'incorporation des amendements (T0) et 6,5 mois après l'apport d'amendements (T6) pour les différents blocs. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. NV : non végétalisé, Tr : végétalisé avec *Trifolium repens* STr : végétalisé avec *Salix* et *Trifolium repens*. F1, fraction acido-soluble ; F2, fraction réductible ; F3, fraction oxydable. La fraction résiduelle (F4) n'est pas représentée mais représente la différence jusqu'à 100.

L'apport de sulfate de fer a permis une diminution significative de 1,7 fois de l'arsenic acido-soluble (F1) pour le bloc PBCS par rapport au bloc PBC, mais restait identique au bloc PC et supérieur de 1.4 fois au technosol non amendé. Ceci démontre l'intérêt d'avoir ajouté le sulfate de fer, pour minimiser l'impact de la combinaison du biochar et du compost sur la mobilité de l'arsenic. En effet, tous les amendements ont augmenté le pH du sol, favorisant la mobilisation de l'arsenic dans le sol en diminuant la charge positive de surface des adsorbants et/ou en augmentant la quantité d'espèces chargées négativement (*Beesley et al., 2014*). Lebrun *et al.* (2018) ont démontré que l'apport de biochar sur le technosol de Pontgibaud avait augmenté la concentration de l'arsenic dans l'eau porale en augmentant le pH du sol.

La fraction correspondant aux oxyhydroxydes et sulfates de Fe/Mn peu cristallins est appelée fraction réductible (F2). Elle représente 20 % de la teneur totale en plomb pour le technosol non amendé. Cette fraction a augmenté de façon significative entre 1,2 et 1,4 fois lorsque les amendements ont été incorporés au technosol (Figure 4.8). Elle a de nouveau augmenté significativement de 1,3 fois, pour les blocs PC et PBC, au cours du temps. Enfin,

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

aucun effet des plantes n'est observé sur la fraction F2. Dans l'ensemble, nous pouvons observer un impact des amendements sur la fraction de plomb lié aux oxyhydroxydes et sulfates de Fe/Mn peu cristallins lors du procédé de phytostabilisation aidée. En effet, le plomb associé aux oxyhydroxydes de Fe/Mn fraction est passé de 20 % sur le technosol non amendé à 32 % sur les différents sous-blocs végétalisés (STr). Komárek *et al.* (2013) ont démontré que les surfaces minérales des oxydes de fer sont habituellement chargées négativement (déprotonées) à pH élevé et chargées positivement (protonées) à pH faible. Ainsi, avec l'augmentation du pH liée à l'ajout d'amendements, les oxydes métalliques ont vu probablement la proportion de groupements de surface chargés négativement augmenter ce qui peut favoriser la complexation du plomb à leur surface et donc augmenter la fraction F2.

Pour l'arsenic, sa quantité liée aux oxyhydroxydes de fer et de manganèse (F2) a également augmenté significativement pour tous les blocs à T0, de 1,2 à 2,4 fois, et n'a pas diminué après 6 mois, ne montrant aucun impact du temps sur cette fraction (Figure 4.9). Seul le bloc PB a vu la proportion d'arsenic lié aux oxyhydroxydes et sulfates de Fe/Mn diminuer avec la présence de plantes ; les trois autres blocs (PC, PBC et PBCS) n'ont pas été affectés par la mise en place des espèces végétales. Il faut tout de même noter que, comme pour la fraction F1, l'ajout de sulfate de fer a fait baisser la quantité d'arsenic lié aux oxyhydroxydes et sulfates de Fe/Mn peu cristallins en-dessous des quantités retrouvées pour le bloc PB, alors qu'une augmentation était attendue, l'apport de sulfate de fer devait permettre d'immobiliser l'arsenic par la formation d'oxydes de fer. L'augmentation du phosphate dans le technosol par le compost, même s'il diminue au courant du temps, a pu entraîner une compétition entre ce dernier et l'arsenic. En effet, comme nous pouvons le voir dans la partie 2.1 le phosphate était moins phytodisponible sur le bloc PBCS ce qui pourrait se traduire par son immobilisation sur les oxydes de fer formés. Enfin, malgré cette augmentation, la quantité d'arsenic associée à la fraction F2 est restée faible comparée aux données de la littérature qui font état d'environ 5 à 10 % pour les technosols miniers (He 2007 ; Álvarez-Valero *et al.* 2009).

La troisième fraction (F3), qui est la fraction oxydable correspondant à la matière organique et aux sulfures, montre que le plomb était associé, pour environ 16 %, à cette fraction oxydable sur le technosol non amendé. Cette dernière a augmenté entre 1,8 fois pour PB, PC et PBC et 2,2 fois pour PBCS (Figure 4.8). Six mois après amendement, en absence de végétaux elle a cependant diminué de 1,4 à 2,1 fois sur tous les blocs. Au contraire, en présence de végétation, la proportion d'arsenic de la fraction F3 a augmenté de façon significative au détriment de la fraction résiduelle (F4), revenant aux mêmes proportions qu'à

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

T0. Pour cette fraction, nous pouvons dire que la mise en place d'un processus de phytostabilisation aidée a entraîné une augmentation de la proportion de plomb lié à la matière organique de 1,8 fois en moyenne, représentant 30 % de la teneur totale en plomb. Cette même augmentation avait également été observée par Padmavathiamma *et al.* (2010). Cette fraction comprend la fraction de métaux et métalloïdes liés à la matière organique, et son augmentation peut s'expliquer par l'augmentation du taux de matière organique, et notamment des acides humiques et des acides fulviques, due à l'ajout de compost. En effet, les acides humiques et les acides fulviques, augmentent la capacité d'adsorption des métaux (Padmavathiamma *et al.*, 2010). Le biochar possède à sa surface de nombreux groupements fonctionnels tels que des hydroxyles et carboxyles qui peuvent augmenter l'adsorption des métaux (Ahmad *et al.*, 2014). Cependant, la fraction F3 a diminué au cours du temps, sans doute en raison de la dégradation d'une partie de la matière organique insoluble du compost, mais également une partie de la fraction labile du biochar (Maestrini *et al.*, 2014). L'augmentation de la fraction F3 c'est fait au détriment de la fraction F4 ce qui pourrait probablement être dû à la sécrétion d'exsudats racinaires qui déstabilisent les phases minérales les plus stables.

Pour l'arsenic, la portion de celui-ci lié à la matière organique (fraction F3), excepté sur le bloc PC, a augmenté de 1,4 à 1,9 fois avec l'apport d'amendements, (Figure 4.9). De plus il faut noter que 6 mois après incorporation des amendements, la proportion d'arsenic de la fraction F3 a diminué de 1,4 fois sur les blocs PBC et PBCS. Enfin, la fraction F3 a seulement été impactée par la présence de végétation sur le bloc PBCS en augmentant cette dernière de 1,4 fois par rapport au sous-bloc non végétalisé. L'augmentation de la fraction F3 de l'arsenic peut s'expliquer, comme pour le plomb, par le fait d'un apport de matière organique *via* le compost et /ou le biochar.

La fraction F4 dite résiduelle du plomb est la plus stable, les métaux et métalloïdes étant liés à la structure cristalline. Les valeurs obtenues étaient d'environ 49 % pour le technosol non amendé et elles ont chuté après la mise en place de la phytostabilisation assistée (sous-blocs implantés avec des saules et du trèfle) de 1,4 ; 2,1 ; 2,9 et 4,1 fois pour PC, PBC, PB et PBCS respectivement (Figure 4.8). En effet l'augmentation des fractions F2 et F3 s'est faite au détriment de la fraction F4.

Enfin, pour l'arsenic, sa proportion dans la fraction F4 a diminué, du fait de l'augmentation des autres fractions. Elle reste tout de même élevée (Figure 4.9), ce qui indique que l'As demeure principalement concentré dans la fraction résiduelle, qui est

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

considérée comme stable à long terme avec un risque très faible de rejet de contaminants dans l'environnement. D'après Pascaud *et al.* (2014), la principale phase porteuse de l'As dans le technosol de Pontgibaud est la beudantite, qui est très stable dans les contextes miniers (Joussein *et al.*, 2013). Ceci montre l'impact de la mise en place d'un processus de phytostabilisation assistée sur la répartition chimique de l'arsenic par rapport au technosol non amendé en augmentant les fractions F1, F2 et F3. Cet impact a également été observé par Fresno *et al.* (2016) où les fractions correspondantes pour le cuivre et l'arsenic ont également augmenté avec l'apport d'amendements seuls ou associés tels que le biochar de bois d'olivier, la chaux et le compost de résidu de moulin à olive et de boue de papeterie dans un technosol minier. Cependant, il est intéressant de noter que, bien qu'il n'existait pas de différences significatives entre les différentes fractions F4 pour les 4 blocs, l'observation des trois fractions, à savoir F1, F2 et F3, nous a montré que l'apport de sulfate de fer associé au biochar et au compost (PBCS) a permis de diminuer ces trois fractions de manière significative par rapport au bloc PBC qui ne contient pas de sulfate de fer.

Le risque environnemental potentiel (RAC) a été déterminé par l'addition des fractions F1 et F2 (Pejman *et al.*, 2017) (Figure 4.10).

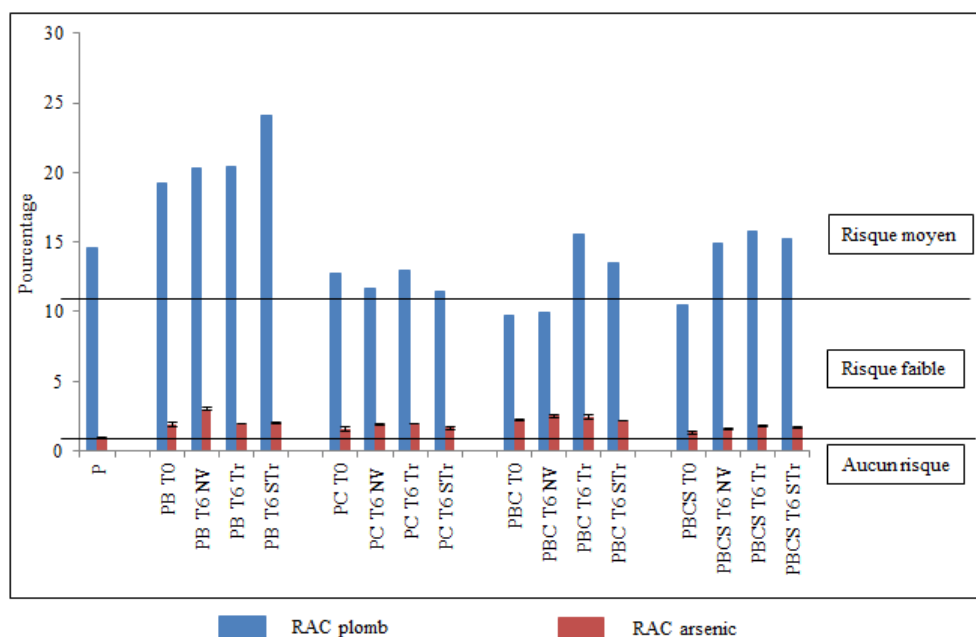


Figure 4.10 : Valeurs du code d'évaluation des risques (RAC) de Pb et As au moment de l'incorporation des amendements (T0), et à 6,5 mois après amendement et végétalisation (T6) pour différents traitements. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. NV : non végétalisé, Tr : végétalisé avec *Trifolium repens* STTr : végétalisé avec *Salix* et *Trifolium repens*.

Le RAC du Pb augmente de 1,3 fois par rapport au technosol non amendé pour le bloc PB. Le compost semble induire en revanche une diminution du RAC Pb, qui compense l'effet

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

du biochar pour les blocs PBC et PBCS. Le RAC du plomb demeure dans la zone considérée comme moyennement dangereuse pour tous les sous-blocs STr. Le RAC étant l'addition de la fraction F1 et F2, il est donc attendu que celui-ci augmente quand ces deux fractions augmentent. Bien que sur tous les sous-blocs STr le plomb représente un risque moyennement dangereux, des disparités existent. De plus il semble que les plantes ont un impact différent selon les amendements incorporés. En effet, sur le bloc PBC, les végétaux semblent avoir tendance à augmenter le RAC, alors que celui-ci n'augmente pas sur les blocs PC et PBCS avec la présence de plantes. Enfin, le RAC de l'arsenic a augmenté avec l'apport d'amendements, et représente désormais un risque faible pour l'environnement. Ces résultats semblent indiquer un impact négatif de la phytostabilisation assistée sur le potentiel de mobilité de l'arsenic.

2.2.4. Bioaccessibilité du plomb et de l'arsenic pour les différents blocs

L'étude de la bioaccessibilité permet de déterminer la fraction potentiellement accessible lors d'ingestion accidentelle par un être humain. Les résultats des tests réalisés sur les échantillons de sol de la parcelle sont listés dans les figures 4.11 et 4.12 et le tableau 7 annexe 1.

Pour le plomb, lors de la phase gastrique, nous avons pu observer que le bloc PBC a vu sa fraction de plomb bioaccessible augmenter de 1,1 fois. Six mois après l'incorporation des amendements, seule la fraction bioaccessible de plomb du bloc PC a diminué de 1,2 fois par rapport à T0 (Figure 4.11 et Tableau 7 annexe 1). Enfin, en comparant les sous-blocs non végétalisés et végétalisés, nous avons pu constater que la végétation implantée n'a eu aucun effet sur les différents blocs de la parcelle expérimentale.

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

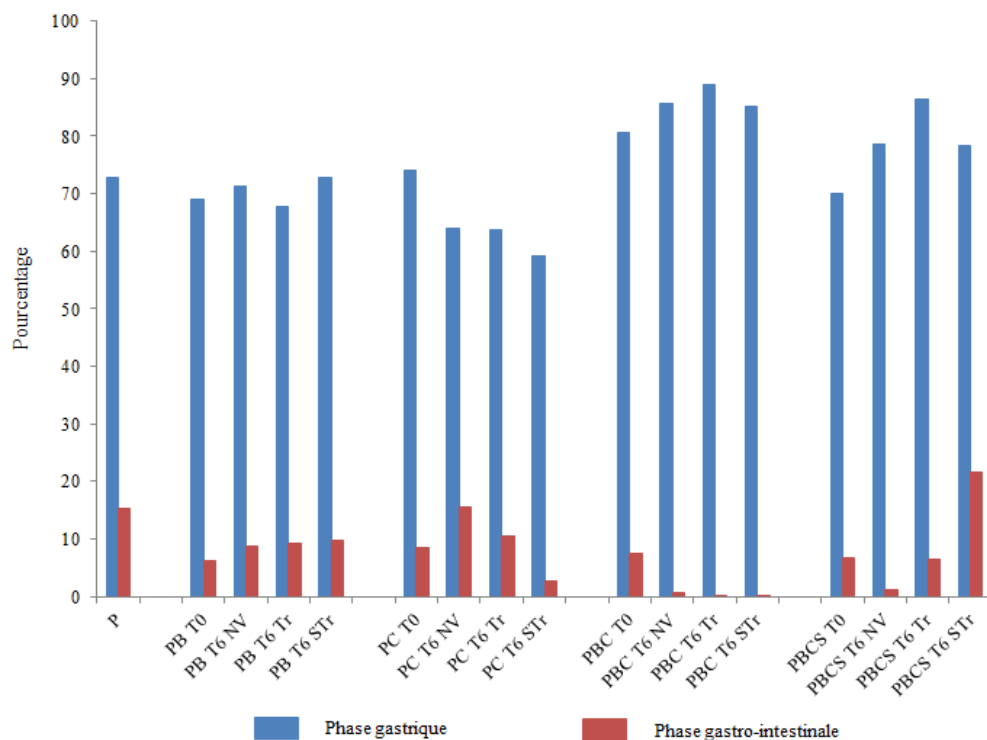


Figure 4.11 : Fraction bioaccessible (%) du plomb, après ajout d'amendements (T0) et 6,5 mois après l'apport d'amendements (T6) pour les différents blocs. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. NV : non végétalisé, Tr : végétalisé avec *Trifolium repens* STr : végétalisé avec *Salix* et *Trifolium repens*.

Globalement, même si des différences significatives existent, la proportion de plomb bioaccessible sur les différents blocs reste relativement proche de celle du technosol non amendé. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la phase gastrique représente déjà une très forte proportion du plomb total sur le technosol. Ainsi, bien que les amendements apportés modifient certains paramètres du technosol, ils n'affecteraient que très peu voire pas du tout la fraction de plomb qui n'était pas bioaccessible. Finalement, les résultats obtenus sur la bioaccessibilité du plomb pour les blocs de la parcelle expérimentale restaient légèrement supérieurs à la bioaccessibilité du plomb généralement observée dans les sols miniers qui est de l'ordre de 60 % pour la phase gastrique (Pascaud *et al.*, 2014).

Dans la phase gastro-intestinale, la fraction bioaccessible de plomb chute drastiquement de 11,2 fois comparativement à la phase gastrique sur tous les blocs. A T6, la fraction bioaccessible augmente avec le temps sur le bloc PC de 1,8 fois pour retrouver une proportion identique à celle du technosol non amendé. Pour les blocs PBC et PBCS, elle diminue avec le temps, de 34,7 et 5,7 fois, respectivement entre T0 et T6. Enfin, pour tous les blocs, la présence de végétaux impacte la fraction de plomb bioaccessible par rapport aux sous-blocs non végétalisés. En effet, la présence de végétaux fait diminuer cette dernière sur le sous-bloc PC STr de 5,6 fois, alors qu'elle le fait augmenter de 27,7 fois sur le sous-bloc PBCS, lui donnant un niveau supérieur à celle du technosol non amendé. Globalement, pour la phase

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

gastro-intestinale, les résultats sont plus contrastés que ceux de la phase gastrique. En effet, la fraction bioaccessible de la phase gastro-intestinale varie de 0,2 % à 33 %. Cependant la plupart des résultats se retrouve dans une gamme de 2 à 10 % retrouvée dans la littérature (Juhasz *et al.* 2011 ; Pascaud *et al.*, 2014), certains mêmes sont inférieurs, ce qui est notamment le cas du bloc PBC à T6.

Comme vu dans le chapitre précédent (cf Chapitre I), l'arsenic va avoir un comportement différent de celui du plomb (Figure 4.12 et Tableau 7 annexe 1). En effet, sa quantité bioaccessible va généralement avoir tendance à augmenter entre la phase gastrique et la phase gastro-intestinale.

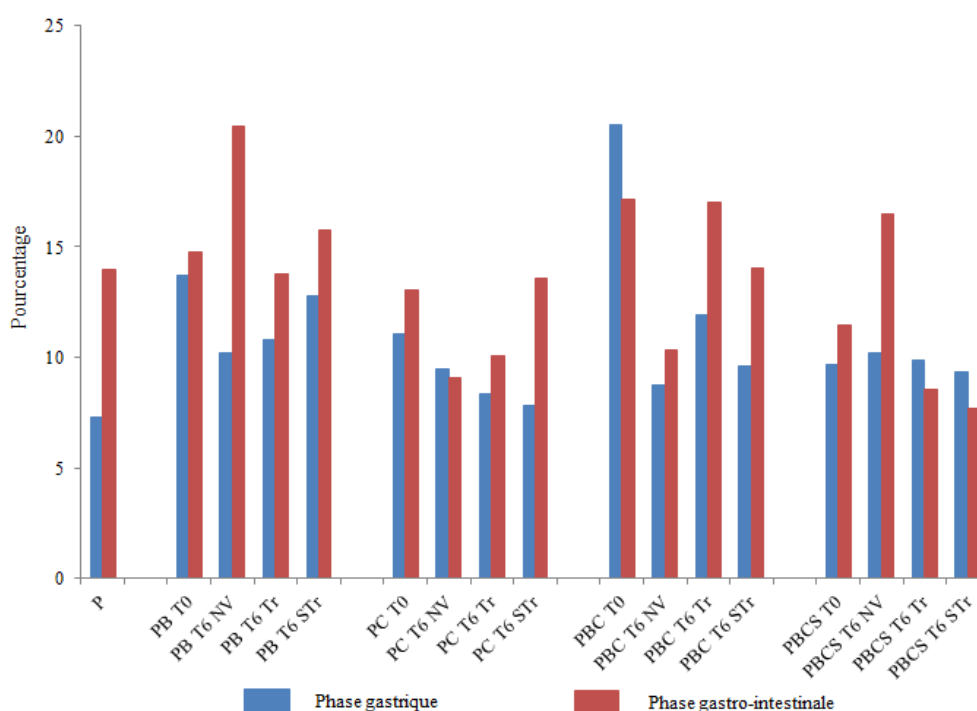


Figure 4.12 : Fraction bioaccessible (%) de l'arsenic, après ajout d'amendements (T0) et 6,5 mois après l'apport d'amendements (T6) pour les différents blocs. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. NV : non végétalisé, Tr : végétalisé avec *Trifolium repens* STTr : végétalisé avec *Salix* et *Trifolium repens*.

L'apport d'amendements a causé l'augmentation de l'arsenic bioaccessible sur tous les blocs à T0. Le bloc PBC a connu la plus forte augmentation, de 2,8 fois. L'arsenic bioaccessible a augmenté en moyenne de 1,3 fois pour les trois autres blocs à T0. En ce qui concerne l'effet temporel, la fraction bioaccessible d'arsenic a diminué au bout de six mois sur les blocs PB et PBC, de 1,3 fois et 2,4 fois, respectivement, la mettant au même niveau que les 2 autres blocs. Enfin la végétation a eu un impact varié sur la bioaccessibilité de l'arsenic ; elle a ainsi permis de diminuer la part d'arsenic bioaccessible sur le bloc PC de 1,2 fois. Elle n'a eu aucun effet sur les sous-blocs végétalisés du bloc PBCS, de même que sur le

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

sous-bloc végétalisé au trèfle du bloc PB (PB Tr), ou sur le sous-bloc végétalisé au trèfle et saule du bloc PBC. Enfin, elle a provoqué une augmentation sur le sous-bloc végétalisé au trèfle du bloc PBC (PBC Tr) et sur le sous-bloc végétalisé au saule associé au trèfle du bloc PB (PB STr) de 1,4 fois et 1.3 fois, respectivement. Globalement, l'ajout d'amendements a entraîné l'augmentation de l'arsenic bioaccessible, même si les proportions obtenues restaient relativement proches du technosol non amendé. Cette augmentation pourrait être due au fait que d'autres anions dans la solution du sol (bicarbonate, phosphate, silicate, acides organiques) suite à l'ajout d'amendements organiques, pourraient entrer en compétition pour les sites de chimisorption des particules du sol. Elle pourrait être aussi liée à des modifications des phases porteuses de l'arsenic, comme précédemment montré avec les extractions séquentielles.

Enfin, dans la phase gastro-intestinale la fraction bioaccessible de l'arsenic n'a pas été affectée par les amendements, que ce soit à T0 ou T6. Seul le sous-bloc PBCS STr a vu sa fraction bioaccessible diminuée de 1,5 fois et être inférieure à la fraction bioaccessible du technosol non amendé. Le pourcentage d'As bioaccessible reste relativement faible et montre que les solutions digestives n'attaquent pas la fraction résiduelle, comme expliqué dans le chapitre II. En effet, une des phases porteuses de l'arsenic dans le système étudié est la beudantite, qui est très stable (*Joussein et al., 2013*). Les variations entre les phases gastriques et les phases gastro-intestinales peuvent s'expliquer par un effet pH, comme nous avons pu l'expliquer dans le chapitre 1. En effet, Xia *et al.* (2016) ont montré une relation positive entre la bioaccessibilité de l'As et le pH. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'oxyde de Fe est principalement chargé positivement à pH acide et forme des complexes de sphère externe. Ainsi, si le pH augmente, la charge positive de l'oxyde de fer diminuera, ce qui engendrera une augmentation de la bioaccessibilité de l'arsenic (*Yang et al, 2002 ; Juhasz et al, 2007 ; Das et al., 2013*). Cependant, dans le cas présent, le bloc PBCS ou du sulfate de fer a été rajouté, présentait la fraction d'arsenic bioaccessible la plus faible. Ceci pourrait être dû à la formation de complexes de sphère interne beaucoup plus stables que des complexes de sphère externe dans des conditions mimant le tractus gastro-intestinal (*Goldberg 2002*).

L'analyse par ACP de tous les résultats d'extractions séquentielles et de bioaccessibilité permet d'avoir une vision globale de l'évolution de ces paramètres en fonction des conditions sur la parcelle (Figure 4.13).

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

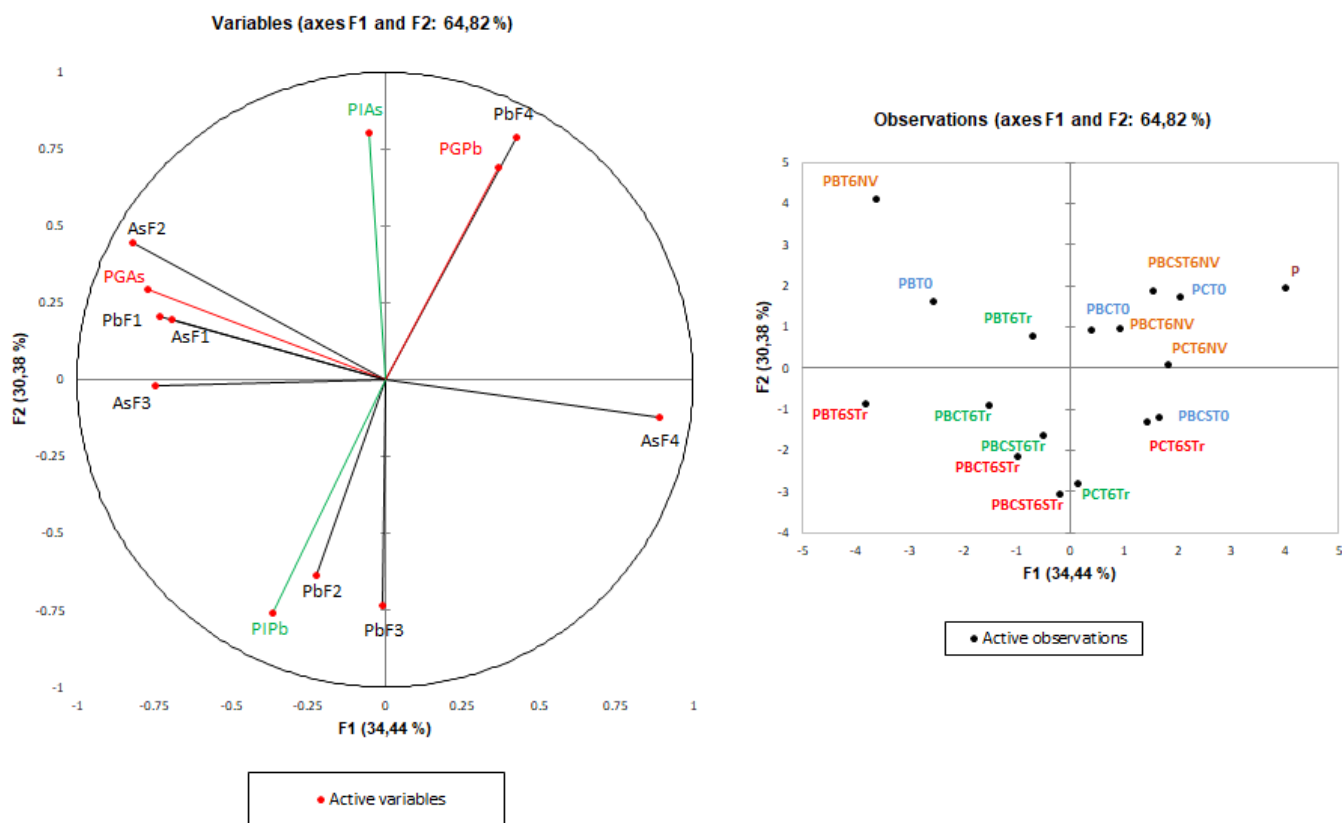


Figure 4.13 : Représentation sous forme d’ACP des données d’extractions séquentielles et de bioaccessibilité après ajout d’amendements (T0) et 6,5 mois après l’apport d’amendements (T6) pour les différents blocs. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. NV : non végétalisé, Tr : végétalisé avec *Trifolium repens* STR : végétalisé avec *Salix* et *Trifolium repens*. PGAs : concentration de l’As dans la Phase Gastrique, PIAs : concentration de l’As dans la Phase gastro-Intestinale, PGPb : concentration de Pb dans la Phase Gastrique, PIPb : concentration de Pb dans la Phase gastro-Intestinale.

Les deux axes F1 et F2 permettent de représenter 64,82% de la variabilité. Suivant cette représentation, les fractions les plus réfractaires (F4) sont spatialement distribuées dans le quadrant de corrélation positive F1 (en haut à droite). Les observations du sol P non traité, et de blocs à T0 et non végétalisés avec compost sont associées à ce quadrant. Cette représentation permet principalement de visualiser le déplacement de la majeure partie des conditions plantées à 6 mois vers la zone opposée au quadrant porté par la fraction F4 (en bas à gauche). Ce quadrant est encadré par les valeurs de AsF3 et PbF3 et comprend également les valeurs de PbF2 et Pb dans la fraction bioaccessible intestinale. Ces résultats suggèrent que la végétalisation aurait induit une augmentation des quantités de plomb et d'arsenic associées aux fractions oxydables de type matière organique dans le sol, et de plomb associé aux fractions réductibles de type oxydes de fer. Cette représentation met également en évidence les corrélations positives entre F4 et fraction gastrique pour le plomb, ainsi que F2 et fraction intestinale pour ce même élément. Pour l'arsenic, les corrélations entre extractions séquentielles et bioaccessibilité sont moins évidentes, mais il semble que la fraction gastrique de cet élément soit associée à l'arsenic facilement mobilisable (F1).

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

L'ensemble des résultats confirme que l'apport d'amendements a permis d'améliorer les qualités agronomiques de technosol de la parcelle, mais également de diminuer la part potentiellement phytodisponible de plomb pour les plantes. Cependant, bien qu'ils aient diminué la part phytodisponible de plomb et permis la croissance des végétaux, l'apport d'amendements quels qu'ils soient a modifié la répartition chimique des deux éléments étudiés en diminuant la part de polluants dans la fraction résiduelle, et en augmentant par la même le risque de remobilisation et leur bioaccessibilité. De plus, la caractérisation géochimique du sol a permis de mettre en évidence l'impact des végétaux sur la mobilité du plomb et de l'arsenic. Le suivi de la mobilité de ces polluants sur site est donc indispensable.

3. Suivi de l'eau hypodermique

Comme indiqué dans le chapitre II, le sens d'écoulement de l'eau hypodermique au niveau de la parcelle est relativement rectiligne allant de « l'Ouest » à « l'Est » de la parcelle. Le suivi de la profondeur de l'eau hypodermique, réalisé tous les mois du 11 juillet 2017 au 15 août 2018, a montré des variations saisonnières (Tableau 12 annexe 1).

Les concentrations en Pb et As ont également été suivies durant deux saisons de croissance des végétaux (cf partie 1.1). Des prélèvements d'eau hypodermique ont eu lieu une fois par mois pour les trois premiers mois après leur installation. Ils ont ensuite été réalisés tous les trimestres. Ces prélèvements ont été réalisés avec une pompe péristaltique manuelle présentant un débit d'un litre par minute et après avoir purgé le piézomètre de trois fois son volume. L'eau récoltée a été filtrée à 0,45 μm et acidifiée par HNO_3 immédiatement après en avoir mesuré son pH. Les échantillons ont ensuite été analysés par ICP-AES (ULTIMA 2, HORIBA, Labcompare, San Francisco, USA). Les résultats obtenus pour le plomb (Figure 4.14) ne montrent aucune tendance nette d'augmentation ou de diminution que ce soit entre les différents blocs, mais aussi au cours du temps. De plus, il est à noter que la concentration moyenne en Pb, tous blocs confondus, se situe aux alentours de 2 mg.L^{-1} ce qui est bien supérieur à la concentration trouvée dans l'eau porale du technosol traité avec les différents amendements, qui est inférieure à 1 mg.L^{-1} (cf Chapitre II).

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

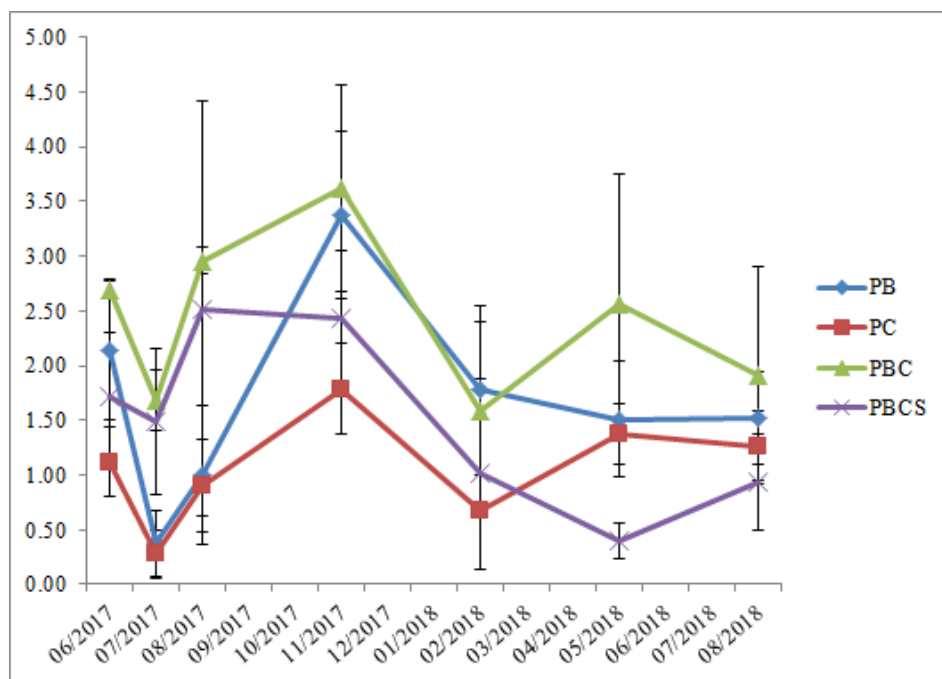


Figure 4.14 : Suivi de la concentration en plomb (mg.L^{-1}) dans l'eau hypodermique de la parcelle durant deux années de croissances (a) sur les sous-blocs non végétalisés, (b) sur les sous-blocs végétalisés avec du trèfle (c) sur les sous-blocs végétalisés avec du saule et du trèfle. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%.

Les concentrations en arsenic mesurées dans les eaux hypodermiques (Figure 4.15) ont quant à elles montré une évolution au cours du temps. En effet, celles-ci étaient inférieures à la limite de quantification ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$) lors des trois premiers mois d'échantillonnage, puis elles ont augmenté. Ce phénomène semble lié aux travaux de réhabilitation du site ayant eu lieu en amont. En effet, le déplacement des résidus miniers a sans doute provoqué une déstabilisation de l'arsenic en modifiant les conditions physico-chimiques du technosol. La concentration a ensuite diminué au cours de l'hiver probablement en raison d'une augmentation du débit de l'eau hypodermique et donc à une dilution de l'arsenic. Enfin, elle a de nouveau augmenté au cours du printemps avec la diminution du débit de l'eau hypodermique. Cependant, aucune différence n'a été observée entre les différents blocs.

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

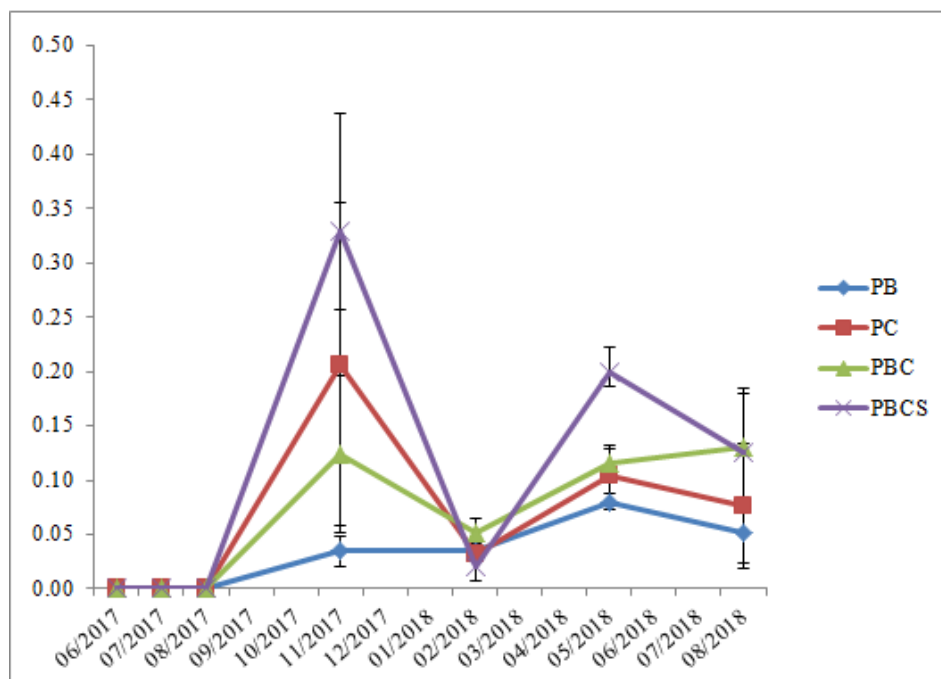


Figure 4.15 : Suivi de la concentration en arsenic (mg.L^{-1}) dans l'eau hypodermique durant deux années de croissances (a) sur les sous-blocs non végétalisés, (b) sur les sous-blocs végétalisés avec du trèfle (c) sur les sous-blocs végétalisés avec du saule et du trèfle. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%.

L'analyse par ACP des concentrations moyennes en arsenic et en plomb ainsi que du pH des échantillons d'eau hypodermique obtenus lors des 7 prélèvements qui ont été effectués entre juin 2014 et août 2018 permet de représenter la variabilité des paramètres mesurés en fonction des conditions (Figure 4.16).

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

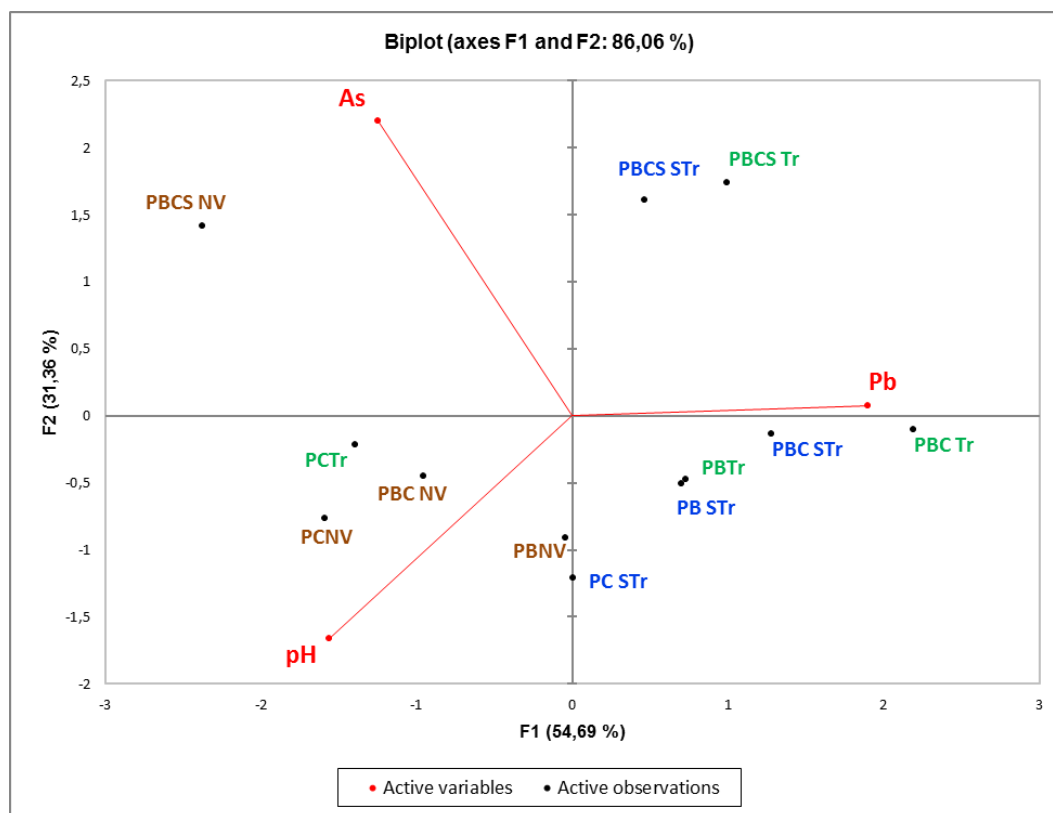


Figure 4.16 : Biplot des données de pH et de concentrations de plomb, d'arsenic des 7 prélèvements réalisés au cours de la période juin 2017-août 2018 (réalisé avec ExcelStat). (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. NV : non végétalisé, Tr : végétalisé avec *Trifolium repens* ST : végétalisé avec *Salix* et *Trifolium repens*

Les deux axes F1 et F2 expliquent 86,06% de la variabilité. L'axe F1 correspond à une concentration en Pb croissante sur la partie droite de la représentation, anti-corrélée au pH et dans une moindre mesure à l'arsenic. L'axe F2 est corrélé dans sa partie positive à la concentration en arsenic. Cette représentation suggère les tendances suivantes (1) Les sous-blocs végétalisés sont groupés sur la droite, dans la zone des concentrations en Pb plus élevées, excepté le sous-bloc compost-trèfle ; (2) le bloc entier PBCS, avec sulfate de fer, est paradoxalement associé aux concentrations les plus élevées en As; (3) les sous-blocs non végétalisés correspondent aux concentrations en moyenne les plus faibles en Pb et présentant les valeurs les plus hautes de pH.

De plus, lors du dernier prélèvement d'eau hypodermique (août 2018), une analyse de la spéciation de l'arsenic a été réalisée. Ainsi, 10 mL d'eau hypodermique filtrée ont été passés à travers une résine échangeuse d'ions pour séparer l'As(V) et l'As(III). Dans un premier temps l'arsenic(V) est retenu par la résine, alors que l'As(III) est élué, ce dernier est récupéré et acidifié par de l'HCl. Dans un deuxième temps l'As(V) est désorbé de la résine par l'ajout d'HCl. Les deux formes d'arsenic sont analysées séparément par AAS four (VARIAN).

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

Les données de du pH, de la concentration de plomb, de l'arsenic total, de l'As(V) et de l'As(III) ont été représentées sous forme d'une ACP dont les deux axes F1 et F2 représentent 86,50 % de la variabilité (Figure 4.17)

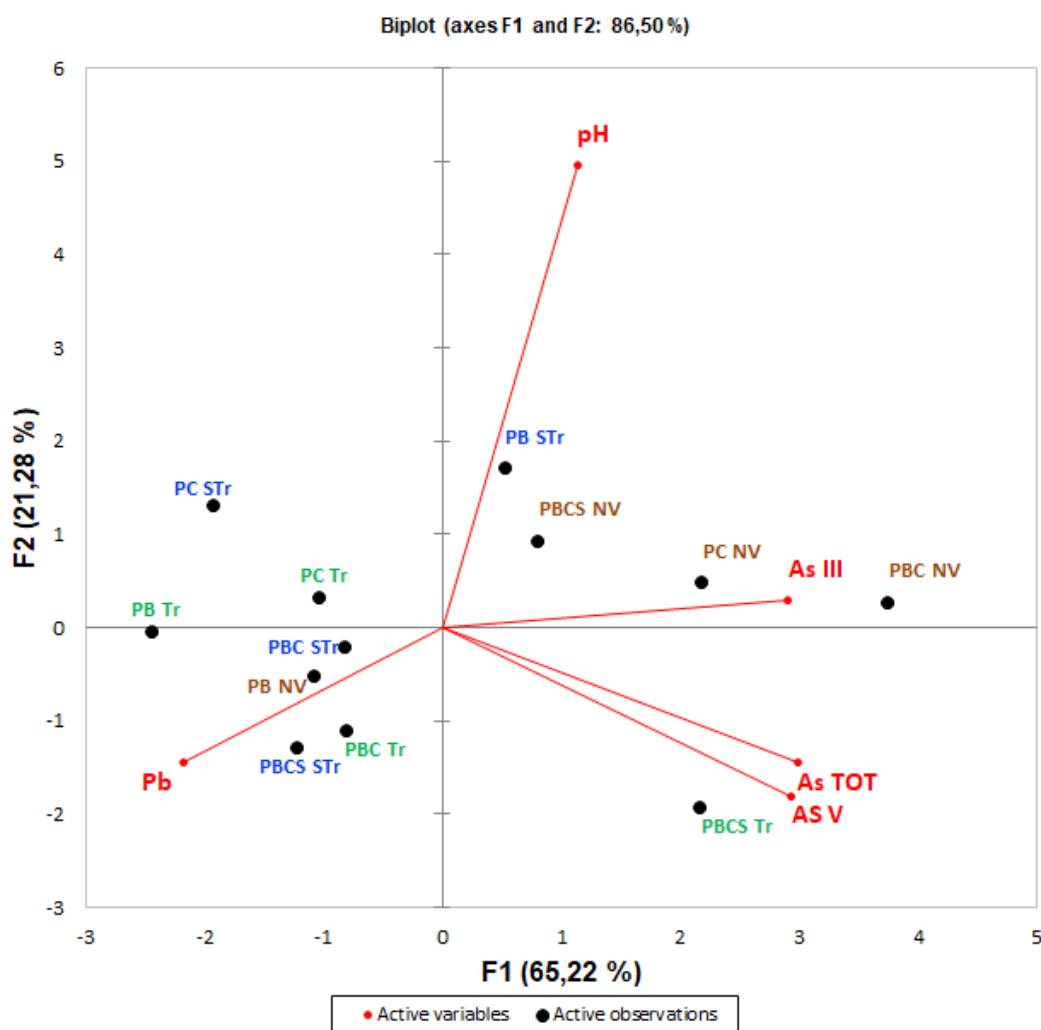


Figure 4.17 : Biplot des données de pH et de concentrations de plomb, d'arsenic total, d'arsenic(V) et d'arsenic(III) en août 2018 (réalisé avec ExcelStat). (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. NV : non végétalisé, Tr : végétalisé avec *Trifolium repens* STr : végétalisé avec *Salix* et *Trifolium repens*

Suivant cette représentation, les blocs non végétalisés (NV) comportant du compost et l'As(III) sont spatialement distribués dans le quadrant de corrélation positive F2 et positive F1. Il semble donc que l'As(III) serait davantage présent sur les sous-blocs non végétalisés avec compost. Ces résultats suggèrent que l'absence de végétation pourrait laisser davantage de nutriments pour des bactéries As-réductrices ou que la matière organique serait davantage disponible sur ces sous-blocs non végétalisés. Enfin au vu de la répartition spatiale des blocs contenant du sulfate de fer, il semblerait que celui-ci n'ait pas d'effet sur l'arsenic dans l'eau ni sur sa spéciation.

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

Globalement, il semble que le procédé de phytomanagement mis en place sur la parcelle expérimentale n'a que peu d'effet sur la qualité de l'eau hypodermique. Ceci peut s'expliquer par la faible superficie de la parcelle expérimentale par rapport au bassin versant qui correspond à la majorité du site minier, minimisant l'impact du phytomanagement. Ce bassin versant étant fortement influencé par les précipitations du fait de la nature imperméable du sous-sol. Mais également par le faible temps de circulation de l'eau hypodermique à travers la parcelle expérimentale lié à la nature sableuse du technosol ne permettant pas aux saules de jouer leur rôle de « filtre ». De plus, le système racinaire du saule n'est peut-être pas suffisamment développé pour avoir un effet significatif sur la qualité de l'eau hypodermique. Enfin, la mobilité de l'arsenic semble être fortement dépendante des conditions physico-chimique du technosol contrairement au plomb qui n'a pas été affecté par les travaux de remaniement des résidus.

Cependant, au-delà de cette remarque globale, l'analyse statistique des données suggère des tendances qu'il sera important de confirmer ou infirmer. Tout d'abord, il pourrait y avoir davantage d'arsenic sous les blocs ayant reçu du sulfate de fer. Ce résultat pourrait s'expliquer par un phénomène de dissolution d'oxydes de fer formés en surface et ayant migré dans la zone saturée. Ensuite, il semble y avoir une tendance à des concentrations un peu plus élevées en Pb, correspondant à des pH légèrement plus faibles, sous les blocs végétalisés par rapport aux blocs non végétalisés. Il a déjà été constaté que certains processus rhizosphériques peuvent induire une acidification du milieu (*Lasat 2002*). Il sera nécessaire d'acquérir des chroniques à long terme de la qualité de l'eau sous la parcelle afin de déterminer si ces légères variations en fonction des types de traitement sont significatives ou non.

4. Suivi de la végétation

4.1. Evaluation de la concentration en plomb dans les feuilles de saule et les parties aériennes du trèfle

La production de biomasse est un point important dans une stratégie de phytomanagement, cependant cette biomasse végétale ne doit pas ou peu accumuler les polluants dans ses parties aériennes. Il est alors essentiel de mesurer la concentration en éléments polluants dans les parties aériennes des végétaux pour évaluer le risque de dissémination de ces derniers dans l'environnement. Pour ce faire, des prélèvements de feuilles de saules et de parties aériennes de trèfle ont été réalisés au cours de la période de suivi (Figure 4.4). Ainsi, pour le saule, des prélèvements de deux feuilles de chaque individu

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

ont eu lieu deux mois et demi après leur implantation en mai 2017 (T2) puis après six mois et demi en octobre 2017 (T6). Enfin, deux autres prélèvements ont été effectués quatorze et vingt mois après l'implantation des espèces végétales (T14 (mai 2018) et T20 (octobre 2018)). Pour le trèfle, ces prélèvements ont été réalisés six mois et demi après incorporation des amendements (T6), deux autres prélèvements ont été menés en 2018 au même moment que ceux faits pour le saule (T14 et T20). Par la suite, les feuilles de saules prélevées ont été regroupées par espèce, par bloc et par période de prélèvements, puis broyées et minéralisées pour en déterminer leurs concentrations en métaux et métalloïdes. Enfin, les concentrations de métaux et métalloïdes dans les feuilles de *Salix alba*, *Salix purpurea*, *Salix triandra* et *Salix viminalis* ont été comparées selon les espèces (Tableau I.8, I.9, I.11 et I.12 et Annexe 1), selon les amendements sur lesquels ils ont poussé, mais aussi selon la période de récolte des feuilles (Figure 4.18 et 4.20). Comme le trèfle n'a pas poussé sur le bloc amendé au biochar (PB), les résultats des concentrations de métaux et métalloïdes compilés dans les figures 4.19 et 4.21 pour ce bloc n'apparaissent pas.

Pour le bloc PB : Biochar seul

L'examen de la concentration en plomb (Figure 4.18) dans les feuilles des différentes espèces de saules poussant sur le bloc PB montre, en juin 2017 (T2), une valeur pour *Salix purpurea* plus de 10 fois supérieure à celle des autres espèces de saules. Aucune évolution de la concentration de plomb dans les feuilles n'a été observée entre T2 et T6 pour *Salix viminalis* et *Salix purpurea*. Toutefois, elle a diminué de plus de 9 fois pour *Salix purpurea*, mais était toujours supérieure d'environ 2 fois aux teneurs de *Salix alba*, *Salix viminalis* et de *Salix triandra*. Pour la deuxième année de croissance, les concentrations en plomb ont augmenté. En effet, la comparaison entre T2 et T14, montre que les concentrations foliaires de plomb pour *Salix viminalis* et *Salix alba* ont augmenté de 5,8 et 3 fois respectivement. Enfin entre juin 2018 (T14) et octobre 2018 (T20), les concentrations dans les feuilles de saules ont toutes eu tendances à diminuer et cette diminution était significative pour *Salix alba*, *Salix purpurea* et *Salix viminalis* de 2,0, 2,6 et 5,0 fois, respectivement.

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

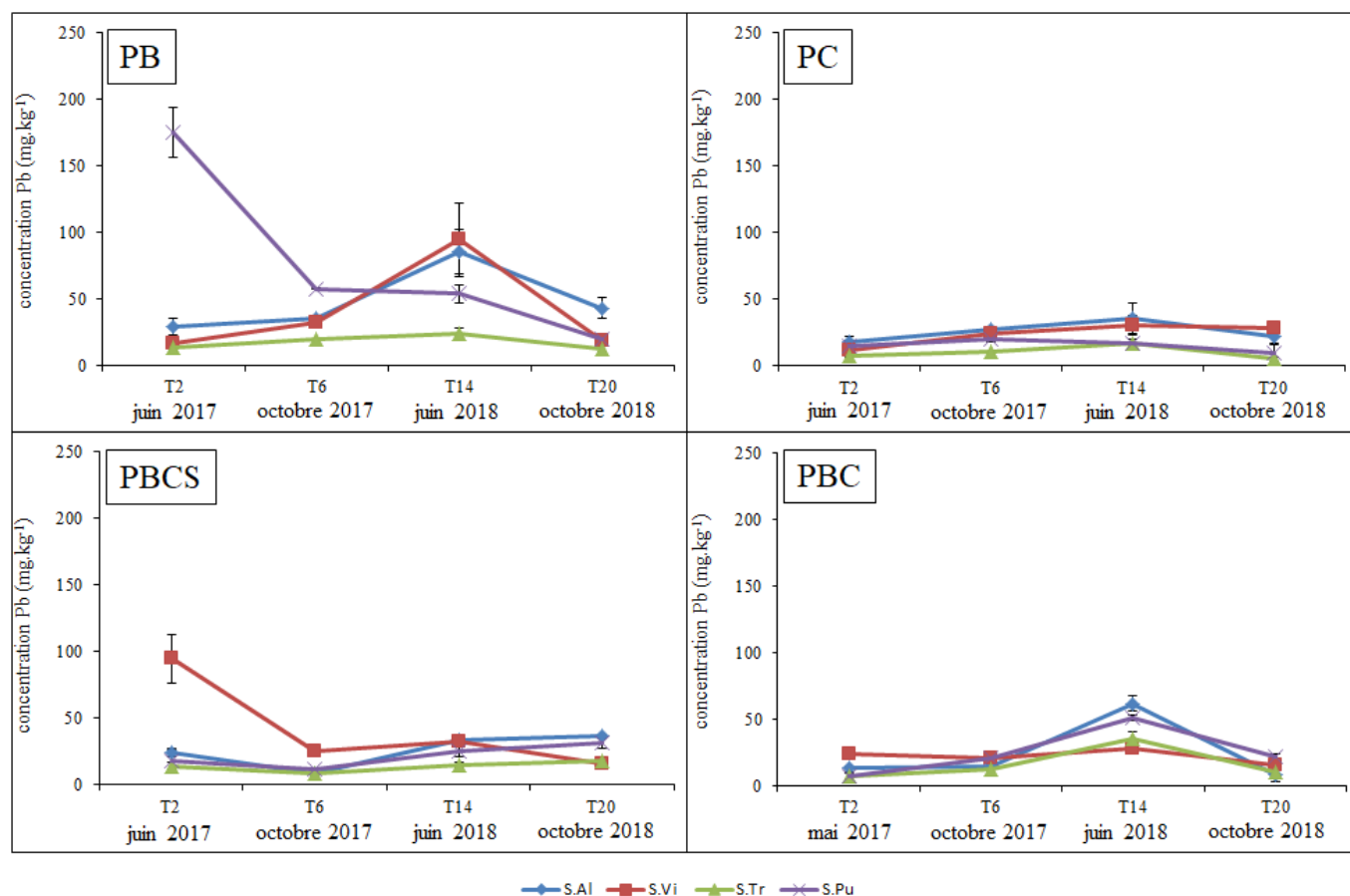


Figure 4.18 : Suivi de la concentration en plomb (mg.kg⁻¹) dans les feuilles des quatre espèces de saules durant deux années de croissances T2, T6, T14 et T20 sur les différents blocs de la parcelle expérimentale. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. (n = 3).

Pour le bloc PC : Compost seul

Pour le bloc PC, à T2, *Salix triandra* possédait la plus faible concentration en plomb, 2,4 fois inférieure à celle de *Salix alba* (Figure 4.18). Au cours de la même année (comparaison entre T2 et T6), les concentrations dans les feuilles de saules ont augmenté d'environ 1,5 fois pour *Salix alba*, et de 2 fois pour *Salix viminalis*. Lors de la deuxième année de croissance, une augmentation entre juin 2017 (T2) et juin 2018 (T14) de 2,6 et 2,3 fois est observée pour *Salix triandra* et *Salix viminalis*, respectivement. Enfin, au cours de l'année 2018, seule l'espèce *Salix triandra* a vu sa concentration en plomb dans les feuilles diminuer de façon significative de 3,4 fois. C'est également la seule espèce pour laquelle cette concentration a diminué entre T6 et T20.

Pour le bloc PBC : Biochar + Compost

La plus forte teneur foliaire en plomb à T2 a été retrouvée dans les feuilles de *Salix viminalis*, bien qu'elle ne soit pas significativement différente de celle de *Salix alba* (Figure 4.18). Elle était 3,5 fois plus élevée que celle de *Salix triandra* et de *Salix purpurea*. Au cours

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

de l'année 2017, seule la concentration dans les feuilles de *Salix purpurea* a augmenté de manière significative de plus de 3 fois entre T2 (juin 2017) et T6 (octobre 2018), retrouvant des proportions similaires à celles de *Salix viminalis* et 1,6 fois supérieure à celle de *Salix alba* et *Salix triandra*. A T14 soit après un an de croissance, seule la concentration en plomb des feuilles de *Salix viminalis* n'a pas évolué alors qu'elle a augmenté de manière significative pour *Salix alba*, *Salix triandra* et *Salix purpurea*, respectivement de 4,4 fois, 4,9 fois et de 7,4 fois. Enfin, au cours de l'année 2018 (comparaison entre T14 et T20), une diminution de la teneur en plomb pour toutes les 4 espèces allant de 1,8 à 7 fois a été observée. A cette date (T20), il n'existait plus de différences entre espèces.

Pour le bloc PBCS : Biochar + Compost + Sulfate de fer

A T2, pour le bloc PBCS, une teneur en plomb 5,1 fois plus élevée dans les feuilles de *Salix viminalis* que celle des trois autres espèces a été mesurée (Figure 4.18). Bien qu'une diminution de la teneur en plomb dans les feuilles de *Salix viminalis* ait eu lieu au cours de l'année 2017, sa concentration est restée supérieure aux autres espèces. Cette diminution a également lieu pour *Salix alba* (3 fois) et pour *Salix triandra* (1,7 fois). L'évolution de la concentration en plomb entre T2 et T14 a été peu prononcée, excepté pour *Salix viminalis* qui a vu sa teneur en plomb diminuer de 2,9 fois. Au cours de l'année 2018, les valeurs de concentrations en plomb des feuilles pour *Salix alba*, *Salix triandra* et *Salix purpurea* ont augmenté à T14. Seule la concentration foliaire en plomb de *Salix viminalis* a continué de diminuer de façon significative (2 fois), amenant cette fois-ci, *Salix viminalis* à une teneur en plomb similaire à celle de *Salix triandra* et environ 2 fois inférieure à celle de *Salix alba* et *Salix purpurea*.

Globalement, les résultats présentés sur la figure 4.18 montrent que les teneurs en Pb dans les feuilles sont plus élevées sur le bloc amendé avec du biochar seul. L'apport de compost aurait contribué à diminuer le transfert de plomb du sol vers les feuilles. De plus, il semble que, aussi bien pour les années 2017 ou 2018, l'espèce *Salix triandra* présente une concentration moyenne en plomb inférieure aux autres espèces étudiées. La concentration en plomb dans le technosol est d'environ 8 g.kg⁻¹, soit environ 200 fois la teneur mesurée dans les feuilles des 4 espèces de saule étudiées.

En ce qui concerne le trèfle, pour les blocs PC, PBC et PBCS, les concentrations en plomb dans les parties aériennes sont comprises entre 200 et 1600 mg.kg⁻¹ de matière sèche, c'est-à-dire de 14 à plus de 86 fois supérieures à celles mesurées dans les feuilles de saules (Figure 4.19).

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

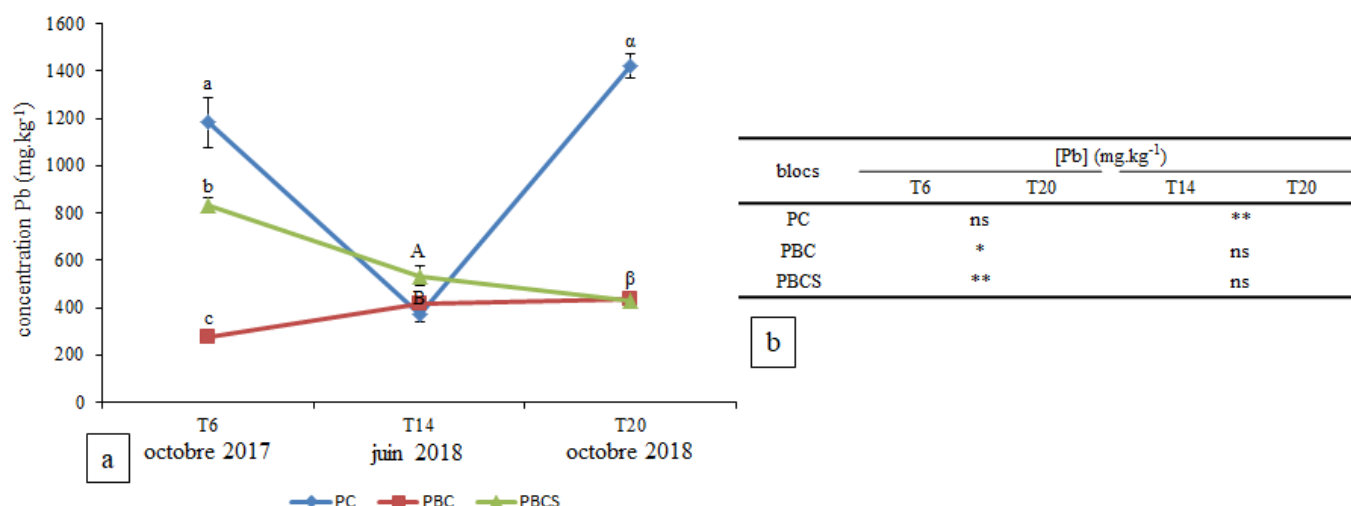


Figure 4.19 : Suivi de la concentration en plomb (mg.kg⁻¹) (a) dans les parties aériennes de trèfle durant deux années de croissances, à T6, T14 et T20 et (b) analyse de la significativité de l'évolution des concentrations du temps entre T6 et T20 et entre T14 et T20 sur les différents blocs de la parcelle expérimentale. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. Les lettres minuscules indiquent une différence entre les blocs à T6, les lettres majuscules indiquent une différence entre les blocs à T14 et les lettres grecques indiquent une différence entre les blocs à T20. ** différence significative (p < 0,01), * différence significative (p < 0,05) et ns : non significatif. (n = 3).

Pour le trèfle, la valeur de concentration en Pb la plus faible en octobre 2017 (T6) a été observée sur le bloc PBC ; elle était 4,2 fois et 3 fois inférieure à celle retrouvée dans le trèfle poussant sur les blocs PC et PBCS, respectivement. Entre octobre 2017 (T6) et juin 2018 (T14), sur les blocs PC et PBCS, la teneur en plomb du trèfle a diminué de manière significative de 3,2 et 1,6 fois, respectivement, alors que, dans le même temps, elle augmentait de 1,5 fois pour le bloc PBC. Enfin, après 20 mois, elle a de nouveau évolué sur le bloc PC en augmentant de manière significative (3,8 fois) retrouvant un niveau similaire à celui de T6. Il faut également noter que la concentration dans les parties aériennes du trèfle sur PBCS était également inférieure de 22 % en moyenne à celle observée sur PC. Nous avons mesuré des concentrations de Pb dans les feuilles de 3 à 7 fois supérieures à celles trouvées dans l'étude de Lopareva-Pohu *et al* (2011) qui ont travaillé sur un sol contaminé aux métaux, amendé avec des cendres volantes, suggérant que le plomb est davantage biodisponible dans le sol de Pontgibaud.

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

4.2. Mesures des concentrations en arsenic dans les feuilles des saules et les parties aériennes du trèfle

Les concentrations foliaires d'arsenic pour les différentes espèces de saules et les différents blocs sont assez proches (Figure 4.20), comprises entre 2 et 15 mg.kg⁻¹ la première année, et entre 20 et 40 mg.kg⁻¹ la seconde année. Les plus grandes disparités entre espèces sont observées sur le bloc PBCS pour lequel *Salix viminalis* et *Salix triandra* présentent des concentrations un peu supérieures, surtout à T14. Au cours de l'année 2017, seul *Salix viminalis* a vu sa teneur en arsenic diminuer de 4,3 fois. Pour tous les autres blocs et pour toutes les espèces de saules, aucune évolution n'a été observée. Cependant, il faut noter qu'entre l'année 2017 et l'année 2018, une nette augmentation de la concentration en As pour toutes les espèces et pour tous les blocs est observée (Tableau 9 annexe 1). Elle est de 3,8 fois entre T2 et T14 et de 5 fois si l'on compare T6 avec T20. Ainsi à T14, aucune différence interbloc n'a été observée pour chaque espèce étudiée.

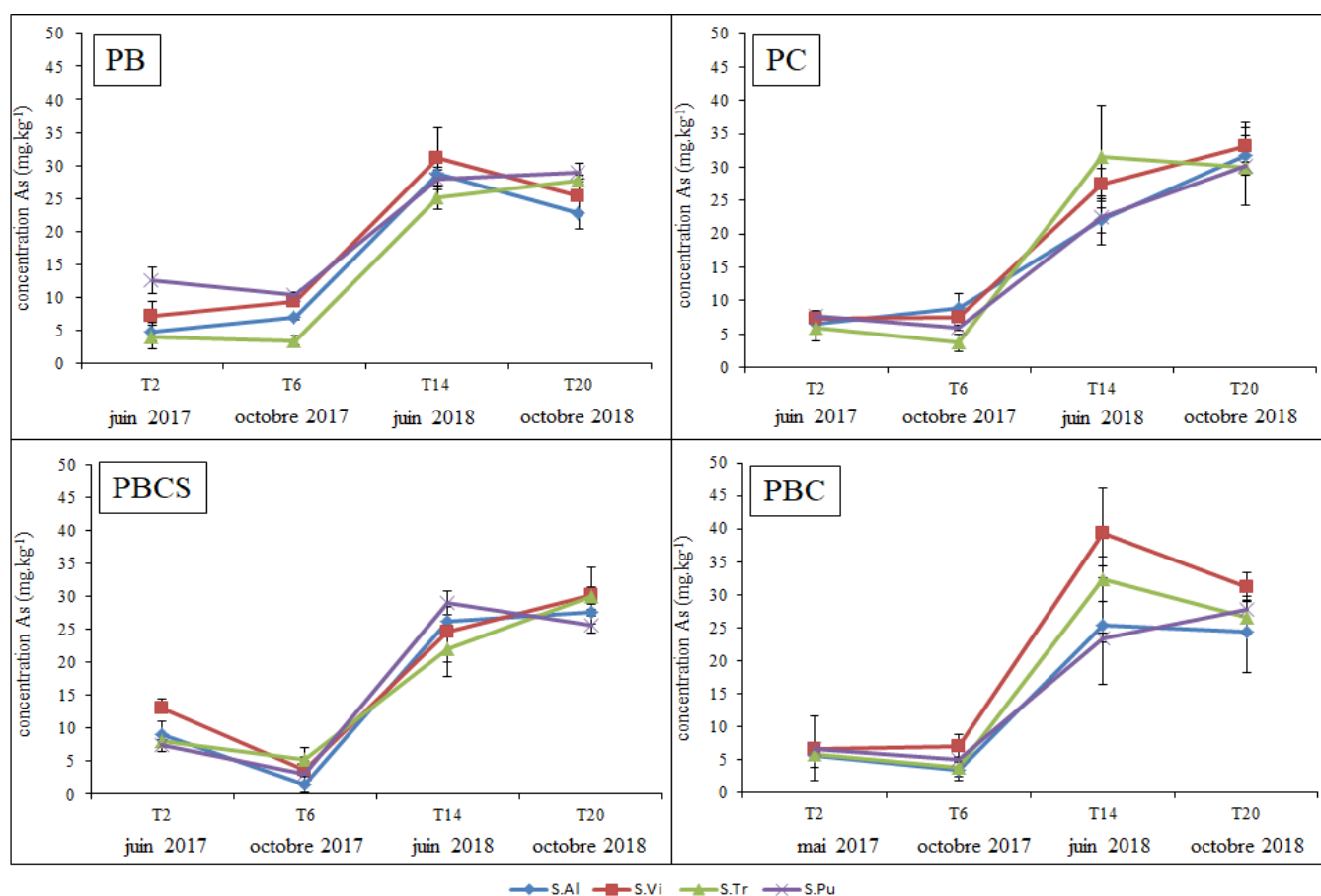


Figure 4.20 : Suivi de la concentration en arsenic (mg.kg⁻¹) dans les feuilles des quatre espèces de saules durant deux années de croissance aux printemps 2017, automne 2017, printemps 2018 et automne 2018 sur les différents blocs de la parcelle expérimentale. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. (n = 3).

Globalement, les concentrations en plomb et en arsenic dans les feuilles des saules sont

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

du même ordre de grandeur, alors que le sol contient beaucoup plus de plomb que d'arsenic et que ce dernier est moins mobile du point de vue géochimique.

Aucun effet des amendements n'a été observé sur la concentration en arsenic dans les feuilles. En effet, la comparaison faite sur les mêmes espèces sur les différents blocs et pour les différents temps de prélèvements, ne révèle aucune différence significative. Il faut noter que les résultats obtenus pour *Salix alba*, *Salix viminalis* et *Salix purpurea* à T2 soit 60 jours après implantation sur le biochar (bloc PB) correspondaient à ceux observés par Lebrun *et al.* (2016) qui ont travaillé sur le même technosol en pots et en conditions contrôlées, et ce pendant 63 jours.

Comme pour le plomb, les résultats obtenus suggèrent un effet saisonnier, avec des concentrations en arsenic dans les feuilles plus élevées au printemps qu'en fin d'été.

Pour le trèfle, les résultats obtenus pour les différents blocs sont proches de ceux obtenus dans les feuilles de saules, avec des valeurs comprises entre 15 et 50 mg.kg⁻¹ (Figure 4.21). Le trèfle accumule donc beaucoup moins l'arsenic que le plomb.

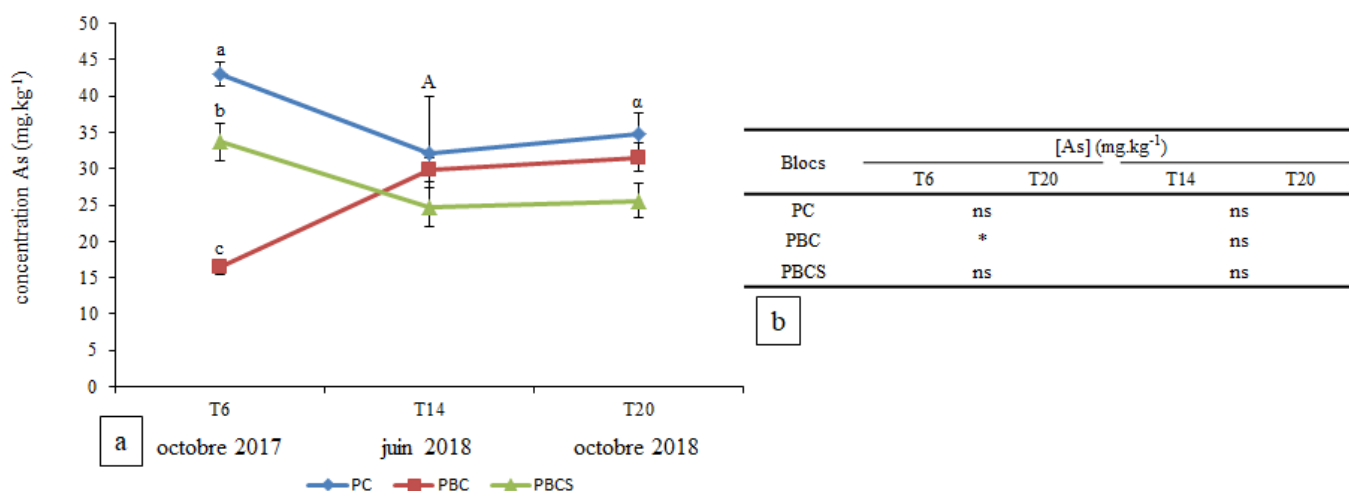


Figure 4.21 : Suivi de la concentration en arsenic (mg.kg⁻¹) (a) dans les parties aériennes de trèfle durant deux années de croissances, à T6, T14 et T20 et (b) comparaison de la concentration au cours du temps entre T6 et T20 et entre T14 et T20 sur les différents blocs de la parcelle expérimentale. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. Les lettres minuscules indiquent une différence entre les blocs à T6, les lettres majuscules indiquent une différence entre les blocs à T14 et les lettres grecques indiquent une différence entre les blocs à T20. ** différence significative (p < 0,01), * différence significative (p < 0,05) et ns : non significatif. (n = 3).

Comme pour le plomb, la teneur en arsenic la plus faible a été retrouvée dans le trèfle poussant sur le bloc PBC. Elle est 2,5 et 2 fois plus faible que le trèfle se développant respectivement sur les blocs PC et PBCS. Au printemps 2018, seule la teneur en arsenic dans les parties aériennes du trèfle poussant sur le bloc PBC a augmenté de manière significative. Ainsi les teneurs se sont retrouvées similaires entre le trèfle des différents blocs. Finalement

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

l'As(V) dans le sol ce qui pourrait favoriser sa solubilisation et donc son absorption par les saules. Enfin, on observe que les blocs PBC et PBCS permettent d'avoir les teneurs les plus faibles de plomb et d'arsenic dans les feuilles de saules. Cependant, aucun regroupement par espèces de saules n'est observé, ce qui ne permet pas d'observer de différence notable entre les espèces.

Ainsi, l'ensemble des résultats confirme que les différentes espèces plantées sur la parcelle n'accumulent que très peu dans les parties aériennes et sont donc utilisables pour phytostabiliser le technosol (Facteur de BioConcentration (FBC) < 1) rapport entre les concentrations foliaires en éléments métalliques des saules et les concentrations retrouvées dans le technosol) (Tableau I.10 et I.13 annexe 1)). Cette faible accumulation des polluants pourrait s'expliquer par : (1) un mécanisme d'exclusion de ces éléments métalliques, qui permet aux plantes d'éviter des dommages notamment dans leurs processus photosynthétiques (*Stoltz et Greger, 2002 ; Borisev et al., 2009*), et/ou (2) par la mise en place d'associations mycorhiziennes qui pourraient réduire considérablement la translocation de Pb et d'As des racines vers les tiges (*De Maria et al., 2011 ; Tözser et al., 2017*). Cependant, les concentrations en plomb et arsenic diffèrent entre le trèfle et les saules, ce qui suggère un comportement différent des végétaux vis-à-vis de ces métaux et métalloïdes. Enfin, la caractérisation géochimique du sol ainsi que les extractions séquentielles ne permettent pas de prédire avec certitude le transfert du plomb et de l'arsenic dans les feuilles de saule ou dans les parties aériennes du trèfle. Le suivi de ce transfert sur site est donc indispensable, et l'échelle de temps de cette thèse (2 ans de suivi sur site) n'est pas suffisante, car de grandes différences ont été observées entre la première et la deuxième année de suivi.

4.3. Evaluation du recouvrement du trèfle et de la production de biomasse fraîche des saules

Le suivi de croissance du trèfle a été réalisé par des mesures de recouvrement du sol (effectuées le 12 juillet 2018). Ces mesures ont consisté à évaluer le taux de recouvrement du sol par le trèfle sur une surface de 250 cm² et ce à trois endroits différents des blocs végétalisés par cette espèce végétale (Figure 4.23). Le meilleur recouvrement a été observé sur le bloc PBC avec une couverture du sol estimée à 100 % ; pour les blocs PC et PBCS la croissance du trèfle était moindre et les taux de couverture du sol étaient d'environ 65 % et 45% respectivement. Le bloc PB n'a quant à lui pas fourni les conditions suffisantes pour permettre la croissance du trèfle qui ne s'est pas développé (taux de recouvrement de 0 %).

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

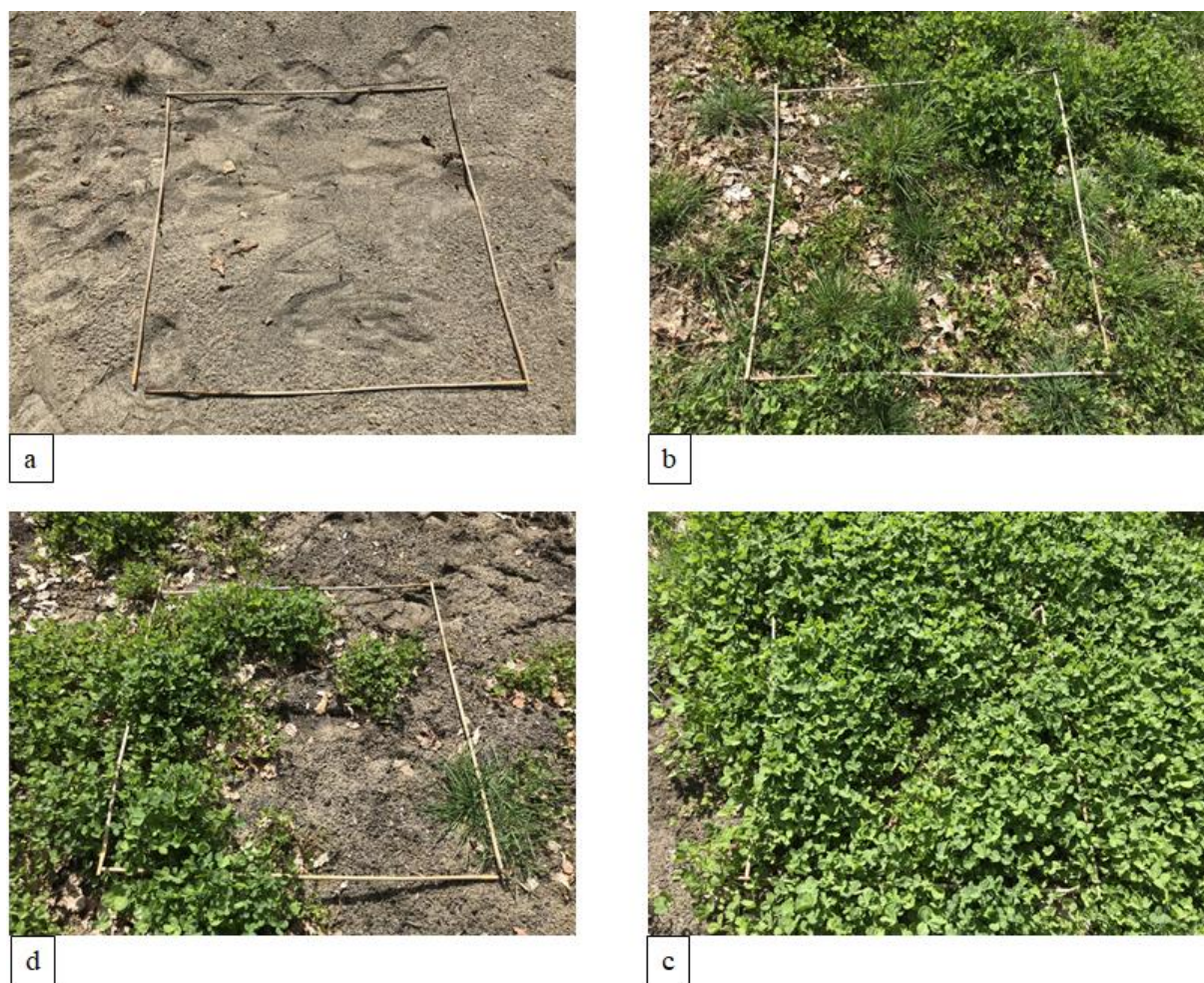


Figure 4.23 : Photos de la couverture de trèfle au 12 juillet 2018 sur les différents sous-blocs végétalisés avec le trèfle. (a) bloc PB, (b) bloc PC, (c) bloc PBC et (d) bloc PBCS. Le cadre en bois pour mesurer la couverture végétale présente une surface de 250 cm².

La mesure de la biomasse fraîche des saules a été réalisée le 1^{er} février 2019 soit près de 2 ans après leur implantation. Elle a été faite sur les tiges de six individus par espèce, choisis aléatoirement pour tous les blocs. Toutes les tiges d'un plant ont été coupées à 1 cm de la bouture (pour permettre ultérieurement le développement de nouvelles tiges). La mesure de la biomasse a montré une hétérogénéité interbloc pour une espèce donnée (Figure 4.24). En effet, pour les quatre espèces de saule (*Salix alba* (bleu), *Salix viminalis* (rouge), *Salix purpurea* (violet) et *Salix triandra* (vert)), la production de biomasses la plus faible est retrouvée sur le bloc PB, la biomasse la plus élevée est généralement retrouvée sur PBC et PBCS. Ainsi, la production de biomasse la plus importante pour *Salix alba* était sur le bloc PBC avec 623 g en moyenne par individu et était 1,8 fois supérieure aux biomasses retrouvées sur les blocs PBCS et PC. *Salix viminalis* présentait la plus forte production de biomasse sur les blocs PBCS et PBC avec 606 g et 473 g par individu respectivement. Elle était 1,9 fois inférieure sur le bloc PC par rapport au bloc PBCS. Pour *Salix purpurea*, la production de biomasse était plus homogène entre les différents blocs sans différence significative entre

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

PBC, PC et PBCS ; elle était tout de même 2,5 fois plus élevée sur PBC que sur PB. Enfin pour *Salix triandra*, la production de biomasse la plus élevée était sur les blocs PBC et PBCS et était de 2,3 fois et 5 fois supérieures à la biomasse produite sur PC et PB respectivement. La production annuelle de biomasse fraîche retrouvée sur la parcelle peut être calculée ; elle est estimée entre 0,7 tonnes par hectare pour *Salix alba* sur le bloc PB à plus de 8 tonnes par hectare pour *Salix triandra* poussant sur le bloc PBC. D'après Mleczek *et al.*, (2010) le ratio entre biomasse sèche et biomasse fraîche est en moyenne de 0,46 ce qui permet de déterminer la production de biomasse sèche qui se situe entre 0,3 tonnes par hectare pour *Salix alba* sur le bloc PB à près de 4 tonnes par hectare pour *Salix triandra* poussant sur le bloc PBC. Ces résultats sont inférieurs aux résultats obtenus dans des conditions favorables (terre agricole) où la production de biomasse sèche par hectare est de 8 tonnes environ par an sur 5 cycles de récoltes (15 ans) (source : wilwater 2007 ; King *et al.*, 2013). Ceci n'est pas surprenant du fait des conditions particulières rencontrées sur le site (sol pauvre en nutriments, sablonneux, et concentrations élevées en plomb et en arsenic) qui ne sont pas favorables à la croissance de ces espèces ligneuses (Ruttens *et al.*, 2011). Ainsi la faible production observée sur la parcelle et en particulier sur le bloc PB peut s'expliquer par un manque de nutriments ou à une phytodisponibilité du plomb plus importante sur ce bloc par rapport aux blocs contenant du compost. Cependant, il faut ajouter que lors de cultures à très courtes rotations, le saule est récolté au bout de 3 ans. Dans le cas présent, la biomasse fraîche des saules a été mesurée au bout de deux années de croissance. De plus, la production de biomasse lors de la première récolte, c'est-à-dire au bout de 3 ans est toujours la plus faible d'environ 30 % (Labrecque 2017) à celles réalisées dans les cycles suivants. Ainsi, ces résultats montrent que la production de biomasse de *Salix triandra* sur le bloc PBC se rapproche fortement d'une production de taillis à très courte rotation sur terrain agricole.

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

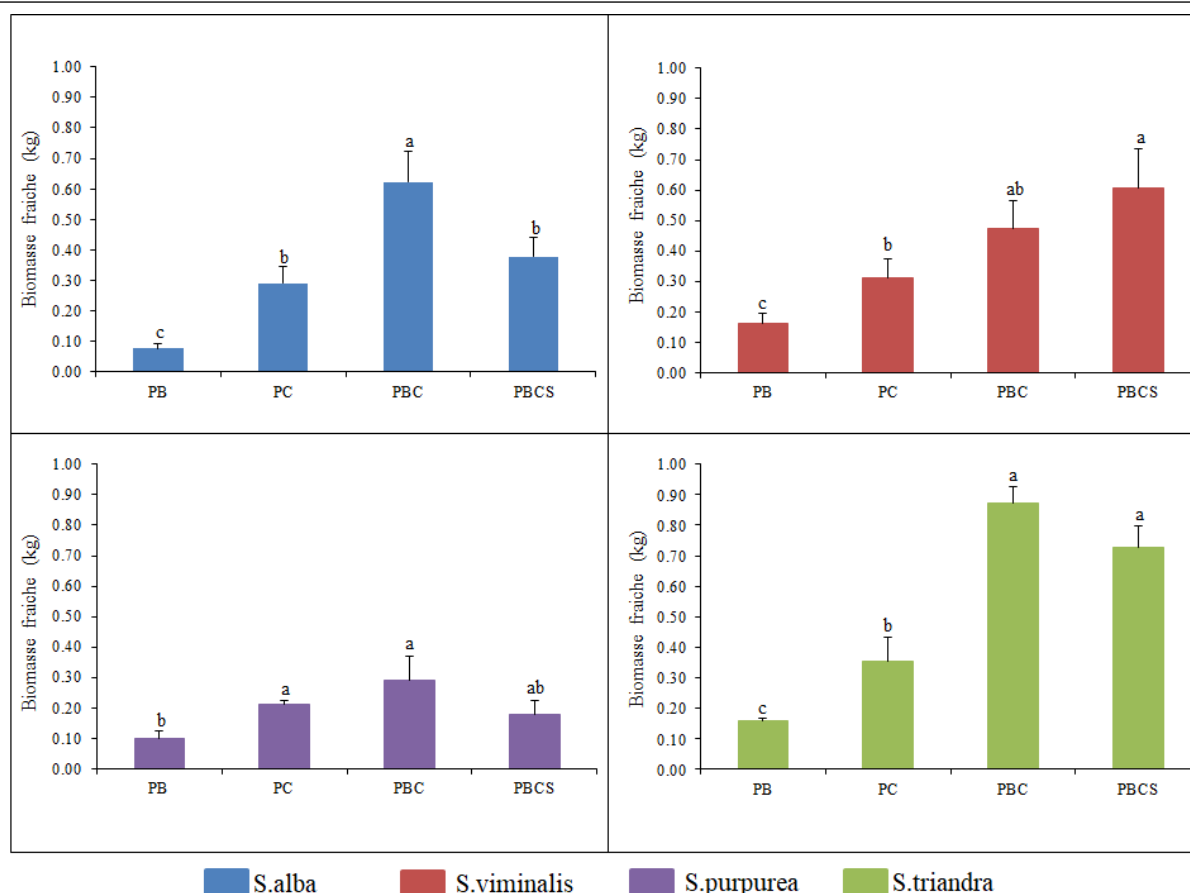


Figure 4.24 : Biomasses fraîches (kg) des tiges par individus des quatre espèces de saules après 24 mois de croissances T24, sur les différents blocs de la parcelle expérimentale. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. Les lettres indiquent une différence significative ($p < 0,05$) ($n = 6$).

Enfin, il faut noter, que la production de biomasse diffère selon les espèces, *Salix purpurea* possède la production de biomasse la plus faible ; cela peut s'expliquer par les caractéristiques même des saules (Tableau 2, annexe 1). En effet, *Salix alba* et *Salix triandra* sont des arbres pouvant atteindre une taille de 20 mètres contrairement à *Salix purpurea* et *Salix viminalis* qui atteindront des tailles beaucoup plus modestes, généralement inférieures à 10 mètres.

5. Evaluation de l'abondance et de la diversité microbienne de la parcelle expérimentale

Les plantes ne sont pas les seuls organismes vivants à avoir un rôle dans la phytostabilisation des métaux et métalloïdes. En effet, les microorganismes présents dans le sol et leur diversité vont également avoir un impact très important sur le processus de phytostabilisation (cf chapitre I). Parmi ces microorganismes, les communautés bactériennes telluriques sont, de loin, les plus abondantes en termes de biomasse (Kaymak, 2011). De plus,

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

leur capacité et leur rapidité d'adaptation face aux variations du milieu, liées à la plasticité de leur génome, leur permettent de coloniser des environnements très variés. Cette diversité génétique va jouer un rôle dans les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote et de bien d'autres éléments. Il paraît donc intéressant d'analyser leur diversité dans le technosol de la parcelle expérimentale. De multiples techniques d'analyses permettent d'appréhender cette diversité. Parmi ces techniques, les « Next Generation Sequencing » (NGS) et, dans la présente étude, la technique MiSeq (Illumina) permet d'explorer la (quasi-)totalité de la diversité microbienne. Cette technique repose sur l'amplification des gènes d'ARN ribosomique 16S (régions V3-V4) par PCR, grâce à des oligonucléotides ciblant des régions communes à tous les microorganismes. Les séquences obtenues sont analysées *via* la détection par fluorescence de nucléotides ou de résidus de polymérisation par un capteur optique Charge-Coupled Device (CCD). Ces analyses permettent de mettre en évidence un nombre considérable d'unités taxonomiques opérationnelles (OTU). Ces dernières sont ensuite comparées aux bases de données internationales avec des (micro)organismes déjà connus pour les positionner phylogénétiquement. Toutefois, la plupart de ces OTU sont inconnues et ne peuvent être rattachées qu'à des niveaux de taxonomie élevés (famille, ordre, classe ou phylum). De plus, malgré la précision de la technique, l'analyse de la diversité bactérienne par une approche moléculaire dépend avant tout de l'extraction des acides nucléiques du sol, et cela est une source majeure de biais (*Zappellini 2018*). Ainsi, les méthodes d'extraction et de purification utilisées doivent permettre l'élimination de substances inhibitrices des ADN polymérases (*Kirk et al., 2004*) telles que les matières humiques et les composés phénoliques associés (*Engel et al., 2012*). Enfin, il faut noter que la technologie Illumina MiSeq a déjà été utilisée dans de nombreuses études pour analyser la composition et la diversité des communautés microbiennes de sites contaminés par des éléments métalliques et métalloïdes (*Belimov et al., 2005 ; Azarbad et al., 2015 ; Chao et al., 2016 ; Chen et al., 2016 ; Durand et al., 2017 ; Foulon et al., 2016a, 2016b ; Hong et al., 2015 ; Zhang et al., 2016*).

5.1. Matériel et méthodes

Sur les différents sous-blocs de la parcelle (Figure 4.1), et selon un maillage prédéfini, des échantillons en vue de déterminer la microbiologie du technosol ont été prélevés en mai 2018 (seconde année d'expérience). Ainsi au total 12 échantillons ont été prélevés sur les sous-blocs végétalisés avec trèfle, végétalisés avec du saule et du trèfle et les sous-blocs non-végétalisés. Ces prélèvements ont été effectués à l'aide d'une tarière manuelle nettoyée entre

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

chaque échantillon par de l'éthanol à 96%. Excepté sur les blocs non végétalisés, les sols prélevés peuvent être considérés comme des sols rhizosphériques car le sol de surface était entièrement colonisé par les racines (de trèfle principalement). Les échantillons ont ensuite été conservés dans des sacs plastiques stériles en chambre froide à 4°C jusqu'à leur analyse.

Ensuite, les acides nucléiques contenus dans le sol de chaque échantillon ont été extraits de 0,5 g de sol humide, à l'aide du kit FastDNA® Spin Kit pour sol (MP Biomedicals), conformément aux instructions du fabricant.

Enfin, une partie du gène de l'ARNr 16S (région V4-V5) a été amplifiée à l'aide de l'ensemble d'amorces universel à code à barres (515WF/918WR) (*Wang et al. 2009*). Les réactions PCR ont été effectuées à l'aide du kit AccuStart II PCR ToughMix, suivi d'un nettoyage (billes PCR HighPrep, Mokascience). Les échantillons ont été soumis pour séquençage sur l'instrument Illumina MiSeq à GeT-PlaGe (Auzeville, France). Les séquences ont été traitées par INRA Transfert (Narbonne, France) avec Mothur (version 1.36.1) selon le pipeline MiSeq SOP (*Schloss et al. 2009*).

Des séquences ont ensuite été assignées pour correspondre à une séquence de Greengenes (publication en août 2013 de gg_13_8_99, contenant 202 421 séquences bactériennes et archées) et aux bases de données PR2 des procaryotes afin d'identifier le niveau du genre.

5.2. Evaluation de la diversité de la communauté microbienne de la parcelle expérimentale

Le prélèvement d'échantillons pour déterminer la microbiologie du technosol a été réalisé un an après la mise en place de la végétation, soit au printemps 2018. Ainsi, à cette période, en plus des sous-blocs végétalisés par le saule et/ou le trèfle, les sous-blocs non végétalisés ont été en partie colonisés par la végétation endémique située à proximité ; seul le sous-bloc PB Tr ne possède pas de végétation (Figure 4.2).

L'analyse métagénomique a permis d'identifier le nombre d'OTU (*operational taxonomic unit*), groupe de bactéries phylogénétiquement proches, partageant une séquence d'ADNr 16S présentant 97% de similarité ou plus) bactériennes pour chaque sous-bloc de la parcelle expérimentale (Figure 4.25). Les courbes de raréfaction montrent que le bloc PB contenant uniquement du biochar représenté sur la figure 4.25 par la dénomination 1A, 1B et 1C contient le nombre d'OTU différentes le plus faible. Le bloc 1B correspondant à PB Tr sur lequel les végétaux n'ont pas poussé, possède le plus petit nombre d'OTU. Enfin, pour les autres blocs de 2A à 4C, un nombre d'OTU assez similaire a été calculé.

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

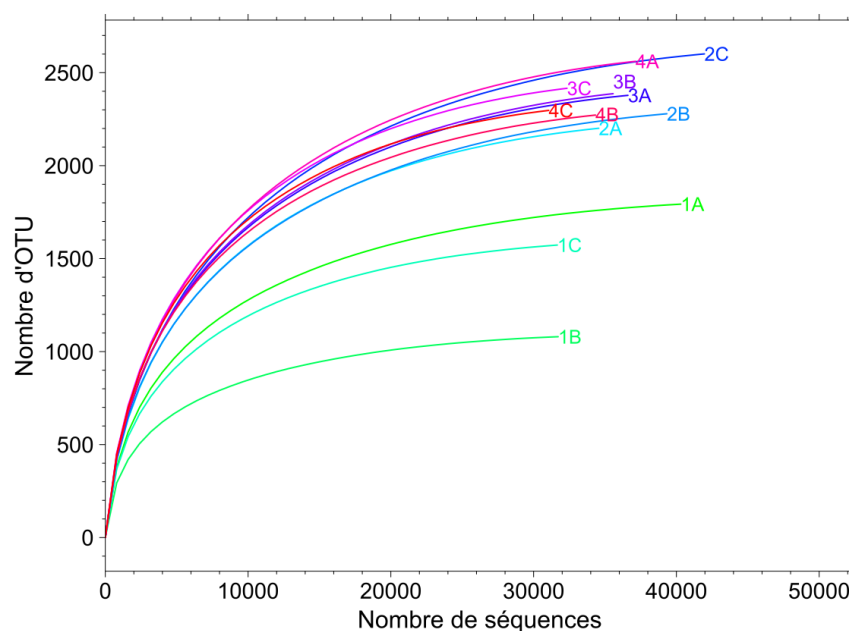


Figure 4.25 : Courbes de raréfaction (nombre cumulé d'OTU bactériennes) pour les différents sous-blocs un an après végétalisation de la parcelle expérimentale. 1A correspond à PB NV, 1B à PB Tr, 1C à PB STr ; 2A correspond à PC NV, 2B à PC Tr, 2C à PC STr, 3A correspond à PBC NV, 3B à PBC Tr, 3C à PBC STr et enfin 4A correspond à PBCS NV, 4B à PBCS Tr et 4C à PBCS STr.

La biodiversité (à la fois nombre d'espèces différentes et l'équitabilité de la représentation de chaque espèce) peut être indiquée par des indices qui ont été calculés par INRA Transfert (Tableau 4.5) à partir des résultats de l'analyse, l'indice de Simpson qui mesure la probabilité que deux individus sélectionnés au hasard appartiennent à la même espèce et l'indice de Shannon qui indique la richesse et l'équitabilité des espèces au sein de la communauté.

Tableau 4.5 : Nombre d'OTU et indices de diversité bactérienne sur la parcelle de Pontgibaud, après un an d'expérience

Echantillon	Nombre d'OTUs	Indice de Simpson	Indice de Shannon
PB NV	1793	6,3	6,2
PB Tr	1080	5,6	5,5
PB STr	1573	6,2	6,1
PC NV	2201	6,5	6,4
PC Tr	2279	6,6	6,5
PC STr	2601	6,5	6,5
PBC NV	2378	6,5	6,5
PBC Tr	2387	6,5	6,5
PBC STr	2416	6,7	6,7
PBCS NV	2561	6,7	6,6
PBCS Tr	2272	6,5	6,5
PBCS STr	2297	6,5	6,5

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

La biodiversité la moins élevée se trouve dans le bloc PB et plus particulièrement le sous-bloc PBTr, qui possède la biodiversité la plus faible et qui correspond au sous-bloc ne possédant pas de végétation.

Nous avons pu identifier 44 *phyla* différents sur la parcelle expérimentale. Parmi ces 44 *phyla*, onze d'entre eux (Figure 4.26) représentent en moyenne plus de 95 % de la communauté bactérienne tous blocs confondus. Il faut toutefois, remarquer que le *phylum* le plus abondant est celui des *Proteobacteria* qui représente à lui seul plus de 30 % de la communauté bactérienne. Les autres *phyla* majeurs sont respectivement les *Acidobacteria*, les *Bacteroidetes*, les *Chloroflexi*, les *Actinobacteria*, les *Planctomycetes* et les *Firmicutes*. Parmi les onze *phyla* majeurs trouvés sur la parcelle, certains ont également été observés parmi des groupes prépondérants sur des sites miniers dans des études précédentes. Par exemple, Pereira *et al.* (2015) ont observé dans une mine de cuivre située au Brésil des *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Actinobacteria* et *Bacteroidetes*. Chen *et al.* (2018) ont également identifié dans un sol pollué aux métaux 10 *phyla* majeurs également retrouvés sur la parcelle expérimentale de Pontgibaud, à savoir les *Verrucomicrobia*, les *Proteobacteria*, les *Planctomycetes*, les *Firmicutes*, les *Cyanobacteria*, les *Bacteroidetes*, les *Chloroflexi*, les *Actinobacteria* et les *Acidobacteria*. Parmi ces derniers, les *Chloroflexi*, *Actinobacteria* et *Firmicutes* étaient plus abondants dans le sol pollué par les métaux que dans le sol non pollué, contrairement aux *Planctomycetes* et *Verrucomicrobia*.

Parmi les *phyla* majeurs identifiés dans nos échantillons, certains comme les *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* et les *Verrucomicrobia* sont considérés comme communs à tous types de sol (Pereira *et al.*, 2015 ; Chen *et al.*, 2018), alors que d'autres sont considérés comme spécifiques à des environnements extrêmes tels que les *Acidobacteria* ou les *Chloroflexi* (Pereira *et al.*, 2015). Foulon *et al.* (2016b) ont étudié la microflore de sols sur deux sites pollués aux métaux (Cd et Zn) et plantés de peupliers dans le cadre d'une stratégie de phytomanagement. Les *phyla* bactériens majoritaires dans le sol, sur leurs sites, étaient les *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, suivis des *Chloroflexi*, *Firmicutes*, et *Gemmatimonadetes*, ces trois derniers *phyla* étant davantage représentés sur le site le plus pollué. Cette représentation des *phyla* majoritaires est assez proche de celle mise en évidence dans la parcelle expérimentale de Pontgibaud. Beattie *et al.* (2018) ont observé des corrélations significatives entre *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Protéobacteria* et *Verrucomicrobia* et au moins un des quatre métaux présents sur leur site pollué (Al, Cd, Pb et Zn). Enfin, d'après Thavamani *et al.* (2017), les

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

Firmicutes, les *Proteobacteria*, les *Acidobacteria*, les *Bacteroidetes* et les *Actinobacteria* sont considérés comme les principaux *phyla* retrouvés sur les sites miniers. Dans la présente étude, ces cinq *phyla* représentent plus de 70 % du microbiote tellurique bactérien de la parcelle expérimentale.

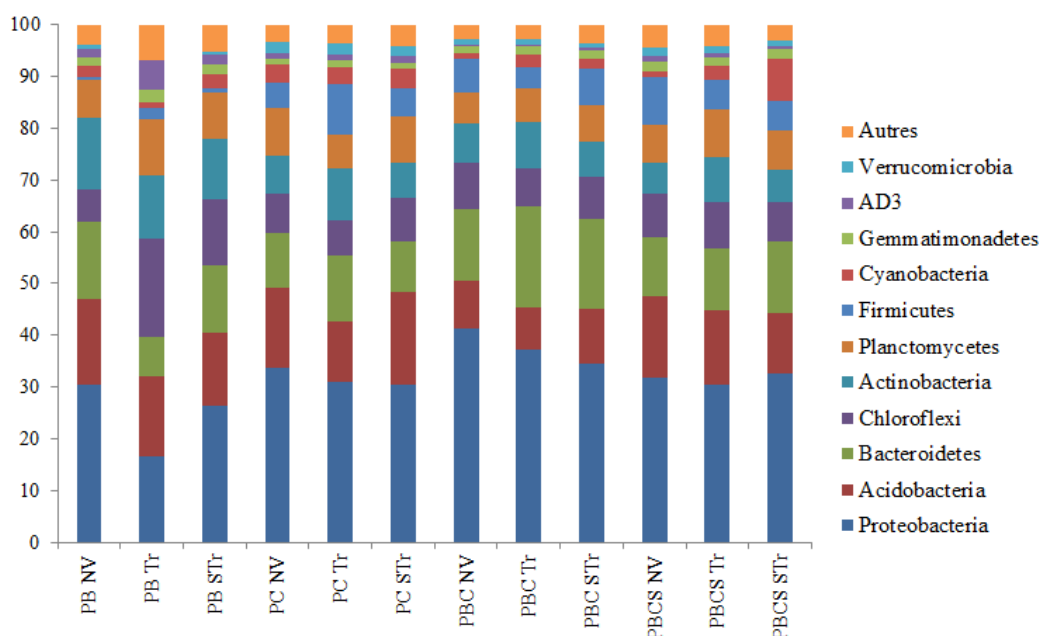


Figure 4.26 : Phyla de bactéries les plus abondants dans les différents sous-blocs de la parcelle expérimentale. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. NV : non végétalisé, Tr : végétalisé avec *Trifolium repens* STr : végétalisé avec *Salix* et *Trifolium repens*.

Enfin, malgré une certaine homogénéité de la communauté bactérienne entre les blocs en termes de *phyla*, des différences semblent apparaître. En effet, certains *phyla* ont tendance à être moins abondants sur certains blocs, comme c'est le cas pour les *Proteobacteria*, *Firmicutes* et *Verrucomicrobia* sur le bloc PB, ainsi que les *Acidobacteria*, *Planctomycetes* et AD3 sur PBC. Au contraire, d'autres *phyla* voient leur abondance croître sur certains blocs comme les *Chloroflexi*, les *Actinobacteria* et les AD3 sur PB, ou encore les *Proteobacteria* et les *Bacteroidetes* sur PBC. Finalement, en plus des différences inter-blocs, nous pouvons observer des différences intra-blocs, particulièrement avec le bloc PB. En effet, le sous-bloc PB Tr qui est le seul à ne pas être végétalisé, se « comporte » de façon différente des autres sous-blocs de PB (Figure 4.26, Figure I.1 annexe 1). Ainsi, comparativement à PB STr et PB NV, le sous-bloc PB Tr semble présenter une abondance de *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria* et *Verrucomicrobia* plus faible, contrairement aux *Chloroflexi*, *Planctomycetes* et *Firmicutes* qui semblent être plus abondants.

Parmi les *phyla* précédemment cités, certains incluent des rhizobactéries qualifiées de *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR), littéralement « les rhizobactéries qui

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

favorisent la croissance des plantes ». Ainsi d'après Zappelini *et al.* (2018), les PGPR cultivables sont majoritairement incluses dans quatre *phyla* : *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* et *Actinobacteria*. Par ailleurs, certains genres de ces PGPR les plus étudiés tels que *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Devosia*, *Flavobacterium*, *Frankia*, *Mesorhizobium*, *Pseudomonas* ou *Rhizobium* (Glick 2014 ; De Meyer *et al.*, 2015 ; Goswami *et al.*, 2016 ; Chen *et al.* 2018 ; Gong *et al.*, 2018) peuvent mettre en place une relation symbiotique avec la plante hôte, alors que d'autres restent libres à proximité des racines (Vessey 2003).

Parmi les PGPR trouvées sur la parcelle, certaines sont considérées comme tolérantes aux métaux et métalloïdes comme c'est le cas d'*Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Mesorhizobium*, *Pseudomonas* et *Devosia* (Anderson *et al.*, 2014 ; Thavamani *et al.*, 2017 ; Chen *et al.*, 2018). Les bactéries résistantes aux métaux jouent un rôle important dans l'augmentation de la biomasse végétale en produisant des sidérophores, de l'acide indole-3-acétique (IAA) et de la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase (Carlos *et al.*, 2016 ; Ma *et al.*, 2016 ; Sobariu *et al.*, 2017). Dans la présente étude, trois genres de PGPR représentent plus de 1% de la communauté bactérienne sur au moins un des sous-blocs : *Devosia*, *Arthrobacter* et *Bacillus*. Ces trois genres ont été identifiés comme des endophytes de certaines plantes hyperaccumulatrices de métaux (Barzanti *et al.*, 2007 ; Idris *et al.*, 2004 ; Lodewyckx *et al.*, 2002). Parmi ces trois genres, *Arthrobacter* (Tableau 4.6) est particulièrement intéressant puisqu'il comprend des espèces capables de réduire les métaux (p. ex. Cr hexavalent) (Anderson *et al.*, 2014).

Tableau 4.6 : Moyenne de l'abondance des séquences de genres (%) des différents sous-blocs de la parcelle expérimentale affiliées à leur embranchement. En gras, les genres représentant plus de 1 % de la communauté bactérienne de la parcelle expérimentale ; (PGPR) représente les bactéries dites *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*

<i>Phylum</i>	Abondance de séquences (%)	Genre	Abondance de séquences (%)
<i>Proteobacteria</i>	31.4%	<i>Ellin329_unclassified</i>	1,55
		<i>Rhodoplanes</i>	1,54
		<i>Myxococcales_unclassified</i>	1,15
		<i>Devosia</i> (PGPR)	1,10
		<i>Mesorhizobium</i> (PGPR)	0,24
		<i>Agrobacterium</i> (PGPR)	0,21
		<i>Burkholderia</i> (PGPR)	0,16
		<i>Pseudomonas</i> (PGPR)	0,11
		<i>Rhizobium</i> (PGPR)	0,06
		<i>Beijerinckia</i> (PGPR)	0,04
		<i>Azospirillum</i> (PGPR)	0,01
		<i>Bradyrhizobium</i> (PGPR)	0,00

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

<i>Acidobacteria</i>	13.4%	<i>Koribacteraceae_unclassified</i>	3,17
		<i>Solibacterales_unclassified</i>	1,36
		<i>Ellin6513_unclassified</i>	1,88
<i>Bacteroidetes</i>	13.1%	<i>Chitinophagaceae_unclassified</i>	4,06
		<i>Cytophagaceae_unclassified</i>	1,45
		<i>Flavobacterium (PGPR)</i>	0,38
<i>Chloroflexi</i>	9.2%	<i>Thermogemmatissporaceae_unclassified</i>	2,23
		<i>Ellin6529_unclassified</i>	1,05
<i>Actinobacteria</i>	8.8%	<i>Blastococcus</i>	1,43
		<i>Arthrobacter (PGPR)</i>	1,05
		<i>Frankiaceae_unclassified (PGPR)</i>	0,01
<i>Planctomycetes</i>	7.9%	<i>Gemmataceae_unclassified</i>	2,09
		<i>Planctomyces</i>	1,98
<i>Firmicutes</i>	5.2%	<i>Bacillus (PGPR)</i>	0,82
<i>Cyanobacteria</i>	2.8%	<i>Streptophyta_unclassified</i>	1,00
<i>AD3</i>	1.4%	<i>JG37-AG-4_unclassified</i>	1,38
<i>Verrucomicrobia</i>	1.2%	<i>Opitutus</i>	1,18

Enfin, les espèces non classifiées représentent 50% ou plus du nombre total de séquences. Quelques bactéries classifiées au niveau de l'espèce ou du genre représentent plus de 1% des séquences, et parmi elles, certaines présentent des caractéristiques en lien avec le contexte de l'étude (Tableau 4.7).

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

Tableau 4.7 : Récapitulatif des espèces dont l'abondance de séquences dépasse 1 % sur les différents sous-blocs de la parcelle expérimentale. (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. NV : non végétalisé, Tr : végétalisé avec *Trifolium repens* STr : végétalisé avec *Salix* et *Trifolium repens*.

Phyla	Espèces présentes à plus de 1 %	Sous-blocs	Caractéristiques en lien avec le contexte de phytostabilisation des métaux et métalloïdes
Proteobacteria	<i>Rhodoplanes unclassified</i>	Tous les blocs excepté PB Tr	Ce genre est présent dans les sols contaminés aux métaux (<i>Narendrula-Kotha et al., 2017</i>) et comprend des dénitrifiants complets, présents dans les zones à fortes densités végétales (<i>Rosenzweig et al., 2013</i>)
	<i>Devosia unclassified</i>	PB NV; PC NV; PC Tr; PC Str; PBC NV; PBC Tr; PBC STr	Ce genre se retrouve comme endophyte d'espèces hyperaccumulatrices
	<i>Rhodanobacter lindaniclasticus</i>	PBCS NV	Ce genre est considéré comme résistant et tolérant aux métaux (<i>Andreazza et al., 2012 ; Gomez-Balderas et al., 2014 ; Joe et al., 2007</i>)
	<i>Phenylobacterium unclassified</i>	PBC NV	Aucune étude n'a été menée à l'heure actuelle
	<i>Massilia timonae</i>	PC NV	Espèce résistante au Zn (<i>Abou-Shanab et al., 2007</i>)
	<i>Dokdonella unclassified</i>	PBC NV	Aucune étude n'a été menée à l'heure actuelle
	<i>Methylibium unclassified</i>	PBCS STr	Aucune étude n'a été menée à l'heure actuelle
Acidobacteria	<i>Candidatus Solibacter unclassified</i>	PB NV; PC NV; PC Tr; PC Str; PBCS NV	Espèce résistante aux métaux et qui prédomine les environnements contaminés (<i>Li et al., 215 ; Nitzche et al., 2015</i>)
	<i>Candidatus Koribacter unclassified</i>	PB Tr	Ce genre est signalé comme étant anaérobie facultatif et fréquemment détecté dans les sédiments et les eaux souterraines (<i>Mulle et al., 2017 ; Zao et al., 2017</i>)
Bacteroidetes	<i>Sediminibacterium unclassified</i>	PB Tr; PB STr; PC Tr	Genre endophyte et résistant à l'arsenic (<i>Reis et al., 2016</i>)

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

	<i>Flavisolibacter unclassified</i>	PB NV	Présent dans un sol pollué par une mine de cuivre (<i>Hong et al., 2015</i>)
	<i>Segetibacter unclassified</i>	PB NV; PB Str	Genre retrouvé dans des sédiments contaminés à l'arsenic (<i>Chen et al., 2017</i>)
	<i>Lacibacter cauensis</i>	PBC Tr	Genre pouvant réduire le fer et/ou le soufre (<i>Weber et al., 2006 ; Ghosh et Dam, 2009</i>)
	<i>Flavobacterium succinicans</i>	PBC Tr	Genre retrouvé dans un environnement contaminé aux métaux, participe aux cycles de l'azote et du soufre (<i>Chang et al., 2002</i>)
<i>Chloroflexi</i>	<i>Thermobaculum terrenum</i>	PB Tr	Retrouvée dans les sols et sédiments, thermophile
<i>Actinobacteria</i>	<i>Blastococcus saxobsidens</i>	PB NV; PB Tr; PB Str; PC Tr; PBCS Tr	Présent dans un sol pollué (mine de cuivre) (<i>Perreira et al., 2015</i>)
	<i>Gemmata unclassified</i>	PBC Str; PBCS Str	Genre tolérant aux métaux (<i>Beattie et al., 2018</i>)
<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomyces unclassified</i>	Tous les sous-blocs	Ce genre augmente avec les concentrations en métaux (<i>Beattie et al., 2018</i>)
	<i>Geobacillus unclassified</i>	PC Tr	Genre abondant dans les sols contaminés aux métaux (<i>Narendrula-Kotha et al., 2017</i>), capable de dénitrification et de liaisons avec les métaux (<i>Chatterjee et al., 2010</i>)
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	PB Tr	Espèce tolérante aux métaux et qui favorise la croissance des plantes (<i>Han et al., 2018</i>)
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Opitutus unclassified</i>	PC NV; PC Tr; PC Str; PBCS NV; PBCS Tr; PBCS Str	Genre présent dans des sols contaminés à l'arsenic et à l'antimoine (<i>Xiao et al., 2016</i>)

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

Dans la présente étude, des différences en termes de diversité ont été observées entre le bloc ne possédant que du biochar et ceux contenant du compost. De plus, les différences observées entre le sous-bloc PB Tr qui est le seul sous-bloc ne possédant pas de végétation et les sous-blocs PB NV et PB Str montrent également un impact de la végétation. Ainsi, comme nous pouvons le voir, le microbiote tellurique semble être influencé à la fois par les amendements ajoutés mais aussi par les plantes mises en place. Cette différence de diversité entre les blocs amendés au biochar et au compost ainsi que sur le sous-bloc non végétalisé pourrait s'expliquer par la diminution des concentrations de la part disponible des métaux et métalloïdes, par l'amélioration de la qualité du sol et par l'apport de bactéries issues du compost (*Wu et al., 2017 ; Zeng et al., 2015*), mais aussi par la présence de carbone labile qui est un facteur important pour la croissance microbienne (*Ameloot et al., 2013*). En effet, le compost est plus facilement dégradable (cf chapitre I) et peut donc fournir une plus grande quantité de carbone aux microorganismes. De plus, les végétaux *via* leur rhizosphère offrent un environnement adéquat aux microorganismes. Les plantes, par l'exsudation racinaire, vont fournir des sucres, acides aminés, acides organiques, enzymes, isoflavonoïdes, régulateurs de croissance, et des polysaccharides du mucilage racinaire pouvant servir de substrats aux bactéries (*Zappaleni 2018*). Cette zone d'intenses activités microbiennes impactera également les végétaux, que ce soit de manière directe ou indirecte (modifications des cycles du carbone et des nutriments, de la structure du sol, interactions trophiques et contrôle des pathogènes).

Enfin, l'analyse du microbiote, a également montré la présence d'archées sur la parcelle expérimentale de Pontgibaud, avec comme les bactéries, un nombre d'OTU d'archées moins important sur le bloc PB (Figure 4.27).

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

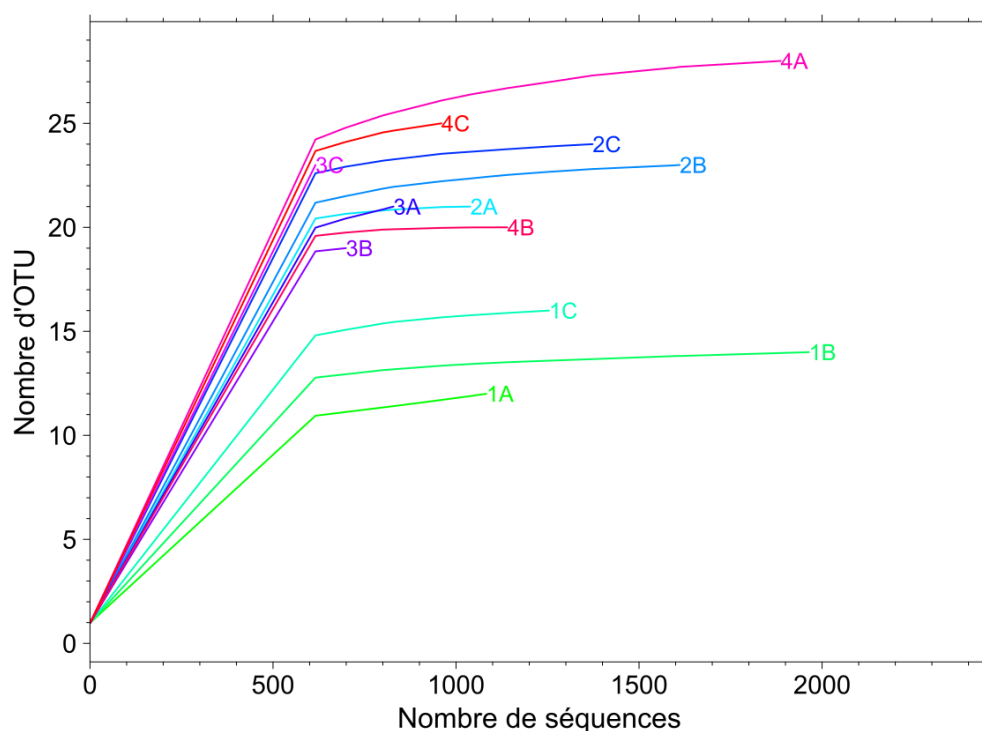


Figure 4.27 : Courbes d'accumulation des archées pour les différents sous-blocs un an après végétalisation de la parcelle expérimentale. 1A correspond à PB NV, 1B à PB Tr, 1C à PB STr ; 2A correspond à PC NV ; 2B à PC Tr ; 2C à PC STr ; 3A correspond à PBC NV ; 3B à PBC Tr ; 3C à PBC STr et enfin 4A correspond à PBCS NV ; 4B à PBCS Tr et 4C à PBCS STr.

Le bloc amendé avec seulement du biochar se distingue des autres par un plus faible nombre d'OTUs détectées (Tableau 4.8). Cependant les indices de diversité ne semblent pas être plus élevés sur les blocs ayant été amendés avec du compost. Ce résultat peut être lié au fait qu'en présence de compost quelques organismes très majoritaires sont présents, ce qui fait chuter le terme « équitabilité » de la biodiversité.

Tableau 4.8 : Indices de diversité des archées sur la parcelle de Pontgibaud, après un an d'expérience

Echantillon	Nombre d'OTUs	Indice de Simpson	Indice de Shannon
PB NV	12	2,5	1,7
PB Tr	14	2,7	1,9
PB STr	16	2,7	1,9
PC NV	21	2,5	1,9
PC Tr	23	2,5	2,0
PC STr	24	2,8	2,2
PBC NV	21	1,7	1,3
PBC Tr	19	2,3	1,9
PBC STr	23	2,2	1,9
PBCS NV	28	2,4	2,0
PBCS Tr	20	2,8	2,0
PBCS STr	25	2,4	1,9

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

En comparant les OTU d'archées obtenues à la base de données internationales, il a pu être identifié 3 *phyla* différents d'archées sur la parcelle expérimentale : *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota* et *Parvarchaeota*. Parmi ces 3 *phyla*, deux d'entre eux, *Crenarchaeota* et *Euryarchaeota*, représentent en moyenne plus de 99 % de la communauté d'archée, tous blocs confondus. Il faut toutefois, remarquer que la proportion de ces deux *phyla* varie en fonction de l'amendement. En effet, sur les blocs contenant du compost, les *Euryarchaeota* voient leur abondance augmenter et représenter près de 72 % de la communauté d'archée sur le bloc PBC (Figure 4.28).

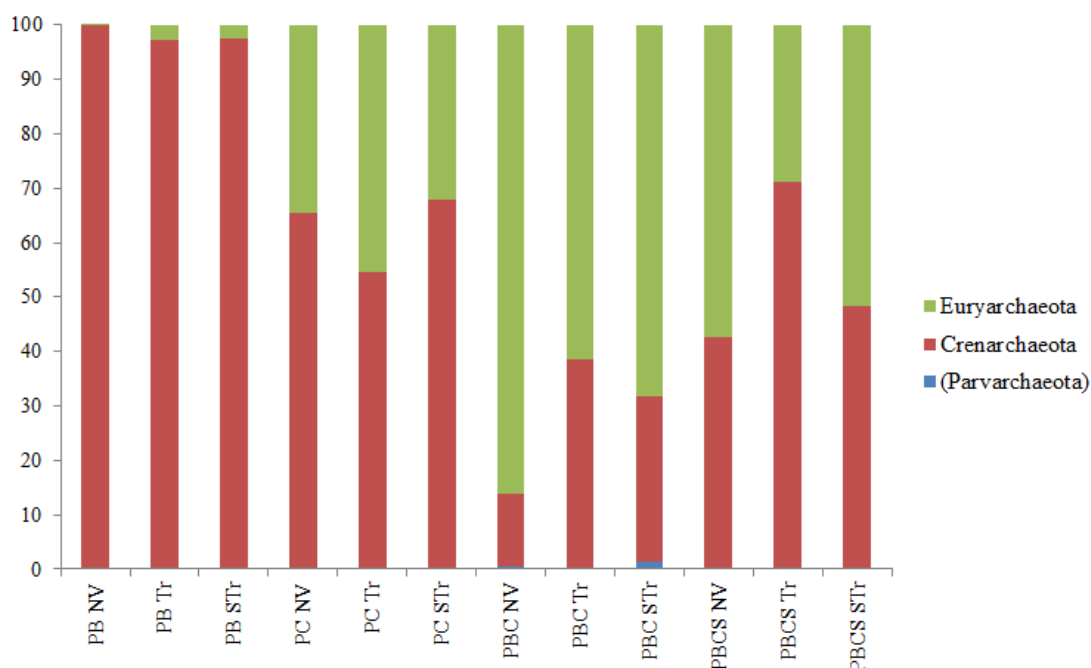


Figure 4.28 : *Phyla* d'archées les plus abondants dans les différents sous-blocs de la parcelle expérimentale. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. NV : non végétalisé, Tr : végétalisé avec *Trifolium repens* STTr : végétalisé avec *Salix* et *Trifolium repens*.

Parmi les *Euryarchaeota*, le genre le plus représenté est celui de *Methanosarcina* avec une abondance d'au moins 20 % sur chaque sous-bloc contenant du compost (Figure 4.29). Au contraire, sur le bloc PB qui ne possède pas de compost, le genre prédominant est *Candidatus Nitrososphaera* qui représente au moins 45 % de la communauté des *Crenarchaeota*. *Nitrososphaera* est une archée contribuant au cycle de l'azote dans les sols par oxydation de l'ammonium.

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

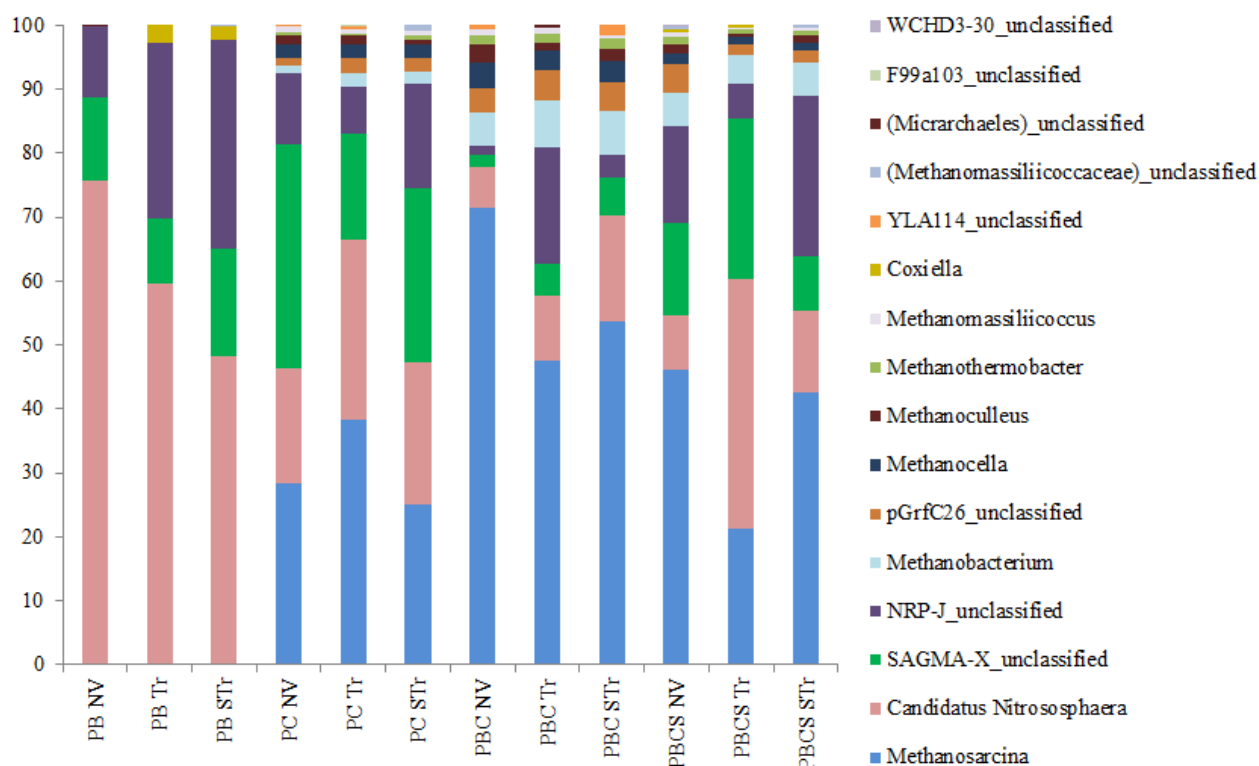


Figure 4.29 : Genres d'archées les plus abondants dans les différents sous-blocs de la parcelle expérimentale. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. NV : non végétalisé, Tr : végétalisé avec *Trifolium repens* STr : végétalisé avec *Salix* et *Trifolium repens*.

Globalement, nous pouvons voir l'impact des amendements sur la population d'archées. En effet, celle-ci est modifiée par l'apport de compost, et elle s'accompagne d'un accroissement notable de la proportion d'Archées méthanogènes. Ces Archées ont pu être apportées par le compost. Thummes *et al.* (2007) ont constaté que des archées (dont *Methanosarcina*) apportées par du compost dans un sol agricole demeurent vivantes malgré la dessiccation et l'exposition aux UV.

Enfin, les deux *phyla* *Crenarchaeota* et *Euryarchaeota* représentant plus de 99 % de la communauté d'archées se rencontrent dans des environnements très variés, notamment ceux contaminés aux métaux et métalloïdes et sont considérés comme tolérants aux métaux et métalloïdes (Li *et al.*, 2017). Ainsi d'après, Gough et Stahl (2011), l'embranchement *Crenarchaeota* est associé aux contaminations métalliques.

Les données de diversité (bactéries et archées), ainsi que les proportions des sept *phyla* les plus abondants ont été représentées sous forme d'une ACP dont les deux axes F1 et F2 expliquent 76,75% de la variabilité (Figure 4.30). L'axe F1, le plus explicatif, sépare les observations suivant une diversité bactérienne croissante et une proportion croissante de protéobactéries (indices de Shannon et de Simpson bactériens sur la droite). La parcelle

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

amendée avec le biochar seul est présente sur la gauche de la représentation, se distinguant par une plus faible diversité bactérienne et une plus forte proportion de *Chloroflexi* et d'*Actinobacteria*. Le biochar seul est moins efficace pour améliorer la qualité agronomique du technosol que les combinaisons comprenant du compost ; la qualité du sol sur cette parcelle demeure donc plus proche de celle du technosol initial que celle des autres blocs. Foulon *et al.* (2016) ont également observé des proportions plus importantes de *Chloroflexi* et d'*Actinobacteria* dans le sol de leur site le plus pollué aux métaux par rapport à celui d'un site moins pollué. Ces deux phyla pourraient regrouper des bactéries moins sensibles à des conditions de croissance drastiques. Les observations correspondant au bloc PBC amendé par le biochar + compost (sans sulfate de fer) montre qu'elles sont assez bien regroupées à droite de la représentation, suivant une corrélation positive avec la proportion de *Proteobacteria*. Les observations des deux autres blocs, amendés par du compost seul ou avec le mélange de compost, biochar et sulfate de fer, ne se distinguent pas et se situent sur l'ACP entre les deux groupes précédemment cités suivant l'axe F1. Ces résultats suggèrent que l'amendement biochar + compost aurait un effet particulièrement favorable sur la biodiversité bactérienne et sur la proportion de *Proteobacteria* ; le compost seul ou l'apport de sulfate de fer ayant au contraire un léger effet négatif sur ces dernières.

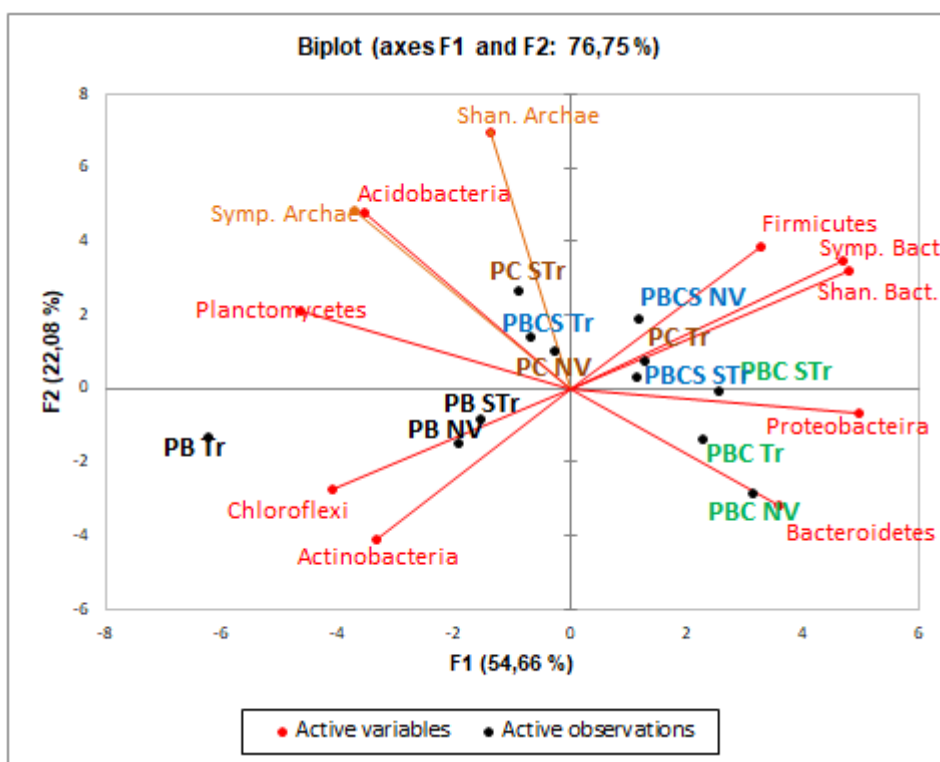


Figure 4.30 : Représentation par ACP des paramètres de diversité et des proportions des 7 phyla majeurs de bactéries dans les sols prélevés sur la parcelle. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. NV : non végétalisé, Tr : végétalisé avec *Trifolium repens* ST : végétalisé avec *Salix* et *Trifolium repens*. Symp.Bact : indice de Simpson Bactérie, Shan Bact : indice de Shannon Bactérie, Symp.Archae : indice de Simpson Archae, Shan Archae : indice de Shannon Archae.

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

L'ensemble des résultats concernant le compartiment microbien du sol de la parcelle expérimentale montre que le technosol, après un peu plus d'un an de traitement par phytomanagement, présente une diversité microbienne importante, la plus faible diversité étant observée dans le bloc amendé avec du biochar seul. Le compost, au-delà de l'amélioration des qualités agronomiques du technosol, a induit une augmentation importante de la diversité en microorganismes, et certains de ces derniers, très probablement apportés par le compost (les méthanogènes par exemple), sont toujours détectables dans le sol. Pour l'instant, il n'est pas observé d'effet majeur des plantes sur cette diversité. Il sera intéressant de réaliser de nouvelles campagnes de prélèvements visant à suivre l'évolution de la diversité microbienne au cours des années à venir afin de déterminer si cette dernière sera influencée par l'évolution du couvert végétal. De plus, il serait pertinent de compléter ces données par la détermination de la diversité fongique, dont l'importance pour l'efficacité du procédé de phytomanagement a été mise en évidence (*Foulon et al., 2016b*).

Conclusion du chapitre IV

Les résultats du suivi de l'expérience *in-situ* sur la parcelle montrent que la stratégie préalablement élaborée à l'échelle du laboratoire est extrapolable sur le terrain. La combinaison de biochar et de compost favorise bien le développement du couvert végétal par une association de saule et de trèfle. Cette combinaison d'amendements semble la plus appropriée, car elle permet de minimiser la concentration en Pb et As dans les feuilles des saules, d'obtenir une production maximale de biomasse de saule, et d'accroître la biodiversité des procaryotes dans le sol, suggérant une évolution positive de la composition du sol en terme de refunctionalisation.

D'après les résultats de cette expérience sur site suivie sur une courte durée (dans le cadre de la présente thèse), le processus de végétalisation assistée par l'apport d'amendement pourrait cependant avoir quelques effets non souhaités de faible amplitude, mais qui devront faire l'objet d'un suivi à long terme : (1) une augmentation des fractions bioaccessibles et une diminution des espèces très stables de Pb et As ; et (2) une possible augmentation des concentrations en Pb et As dissous dans l'eau hypodermique.

L'apport de sulfate de fer semble avoir diminué l'accumulation d'arsenic dans les parties aériennes des végétaux, par contre cet amendement ne semble pas bénéfique au niveau du transfert d'arsenic vers l'eau, et n'améliore pas la biodiversité procaryotique du sol. D'après les extractions séquentielles, le sulfate de fer aurait peu immobilisé d'arsenic au niveau des phases minérales de type oxydes de fer.

Chapitre IV : Suivi du procédé de phytostabilisation mis en place sur le site minier de Pontgibaud

Toutes les espèces de saules testés se sont comportées de façon identique au niveau des concentrations en Pb et As dans leurs feuilles, cependant au niveau de la biomasse produite, *S. Triandra* semblerait être l'espèce la plus intéressante.

Ces résultats confirment donc l'importance de réaliser des tests pilote sur site, pour compléter les données du laboratoire et affiner l'optimisation des paramètres conditionnant la réussite future de la stratégie de phytomanagement.

Un arbre d'aide à la décision et proposé (Figure 5.1) et permettra au bureau d'étude partenaire de cette thèse de déterminer le choix des amendements à envisager lors de projets de réhabilitation par phytomanagement de sites pollués.

Conclusion générale et Perspective

Conclusion générale et Perspectives

Depuis la fin du XX^{ème} siècle, la majorité des mines françaises sont fermées, parmi celles-ci, nombreuses sont celles qui présentent des problématiques de dépôts de déchets contenant des métaux et métalloïdes toxiques qu'il est nécessaire de stabiliser afin de réduire les risques induits.

L'objectif général de cette thèse était de définir une méthodologie de mise en œuvre et de suivi d'un procédé de phytomanagement par phytostabilisation assistée, pour une application, à terme, sur un ancien site minier présentant une contamination aux métaux et métalloïdes. Dans cette perspective, les travaux réalisés se sont focalisés sur l'influence de divers amendements et de deux espèces végétales sur un technosol minier, en termes de stabilisation des polluants et de développement d'un couvert végétal. Le BRGM a proposé, pour cette étude, l'ancien site minier de Roure-les-Rosiers qui fait partie du district minier de Pontgibaud. Ce site présente une pollution en contaminants inorganiques importante mais localisée qui est liée à l'excavation et au traitement de minerais de plomb et d'argent au cours du XIX^{ème} siècle. Les principaux contaminants sont le plomb et l'arsenic. Ces éléments peuvent localement présenter des concentrations très élevées allant de 10 à 20 g.kg⁻¹ de sol pour le plomb et près de 1 g.kg⁻¹ de sol pour l'arsenic. De plus, certaines zones du site demeuraient non végétalisées depuis plus de cinquante ans après la fin de toute activité minière, ce qui nécessitait donc de rechercher comment modifier les caractéristiques physico-chimiques de ce technosol pour le rendre agronomiquement efficient.

La problématique de cet ancien site minier, pour une stratégie de phytomanagement, a posé plusieurs questions auxquelles nous avons tenté d'apporter des éléments de réponses. Ces questions portaient, d'une part, sur le choix des amendements avec leurs caractéristiques propres et, d'autre part, sur le comportement des végétaux vis-à-vis de ce substrat multi-contaminé :

- De quelle façon la mobilité de deux polluants majeurs présentant des comportements chimiques contrastés, le plomb et l'arsenic, est-elle influencée par l'apport d'amendements destinés à permettre la croissance des espèces végétales sur le technosol ? Cette question scientifique du domaine de la biogéochimie englobe également l'aspect transfert des polluants dans les organes des végétaux et celui de leur mobilité dans l'eau poreuse.
- La croissance des végétaux, sous forme d'espèce unique ou d'association d'espèces, a-t-elle un effet sur le transfert des polluants ?
- Comment le changement d'échelle, du laboratoire au site, influence-t-il les processus biogéochimiques associés à la méthode de phytostabilisation assistée ?

Afin de répondre à ces questions, le travail présenté dans cette thèse reposait sur différentes tâches permettant de répondre aux trois objectifs spécifiques.

Le premier objectif était de maîtriser la connaissance du matériau à stabiliser, avec la localisation, à l'échelle du site et des phases du sol, du plomb et de l'arsenic, ainsi que l'étude de leur mobilité. Nous nous sommes intéressés également aux transferts vers le sous-sol des éléments métalliques et métalloïdes contenus dans les technosols en caractérisant l'eau hypodermique.

Le site d'étude, et plus particulièrement la lagune où se situe la parcelle expérimentale, présentait une absence quasi-totale de végétation ; celle-ci se cantonnant à la périphérie de la lagune. Les résultats de la caractérisation du technosol peuvent expliquer cette absence de végétation, en mettant en évidence la qualité médiocre du technosol de Pontgibaud tant d'un point de vue agronomique, que de sa phytotoxicité, caractéristiques qui limitaient le développement de la végétation. En effet, ce technosol possédait une forte acidité, des teneurs en matière organique, en éléments majeurs, ainsi qu'une CEC très en deçà des teneurs souhaitables pour un sol agronomiquement viable. Il possédait également de fortes concentrations en métaux et métalloïdes ($Pb \approx 10 \text{ g.kg}^{-1}$ et $As \approx 0,5 \text{ g.kg}^{-1}$). Cependant, bien que ces concentrations soient très élevées, les diverses extractions chimiques réalisées ont permis de mettre en avant le fait que la teneur totale des éléments étudiés n'était qu'en partie potentiellement disponible pour les végétaux ; par exemple la fraction phytodisponible du plomb était de 3 g.kg^{-1} . Elles ont montré que le plomb est réparti de manière assez uniforme dans les différentes fractions du sol (carbonates, oxy(hydroxy)des de fer, matière organique et réseau cristallin), ce qui démontre un potentiel de mobilité et un risque environnemental moyen. Elles ont également montré que l'arsenic est principalement associé à des minéraux stables : cet élément est donc très peu mobile et représente un risque environnemental faible. Le risque potentiel pour la santé induit par l'ingestion de particules solides a également été évalué par des mesures de bioaccessibilité des métaux et métalloïdes, et les résultats obtenus étaient en parfait accord avec l'analyse de spéciation.

Enfin, la profondeur des déchets miniers au niveau de la lagune a été estimée à environ 1,2 m, avec la présence de l'eau hypodermique à quelques dizaines de centimètres de la surface du technosol. Ceci est assez courant dans le cas des bassins de décantation (*Pascaud 2015*). Ces caractéristiques particulières sont idéales pour la mise en place d'un procédé de phytostabilisation. En effet, l'épaisseur des déchets miniers, relativement faible, se retrouve dans la zone d'enracinement potentielle des saules. De plus, la faible profondeur de l'eau

Conclusion générale et Perspectives

hypodermique a permis un bon développement du saule qui est une espèce nécessitant de fortes quantités d'eau pour sa production de biomasse.

Le deuxième objectif du présent travail de thèse était d'optimiser au laboratoire les paramètres de mise en œuvre sur site du procédé de phytostabilisation, et en particulier **d'améliorer la fertilité du site retenu** ; ceci en répondant au mieux aux problématiques relevées dans l'objectif 1, qui étaient une forte toxicité principalement due à une forte mobilité du plomb et un pH acide, ainsi qu'une mauvaise qualité agronomique. Il était donc essentiel, du fait de ces conditions, de corriger ces paramètres défavorables afin de favoriser l'implantation d'espèces végétales par l'addition d'amendements organiques et inorganiques. De plus, du fait des teneurs élevées en éléments métalliques et métalloïdes du déchet, il était essentiel **d'étudier le comportement des végétaux à planter** vis-à-vis de ces éléments.

Le choix des amendements s'est fait *via* des tests en mésocosme. Ces tests ont permis d'étudier l'impact de l'apport d'amendements au technosol de Pontgibaud tant d'un point de vue de sa phytotoxicité que de ces caractéristiques agronomiques. Ainsi, les données issues de ces différentes expériences ont permis de dégager que la combinaison du biochar et du compost apparaissait comme favorable à la fois pour la croissance des végétaux mais également pour la diminution de la mobilité du plomb. Cependant, bien que ces deux amendements permettent de diminuer la mobilité du plomb de plus de 90 %, la présence du compost, essentiel à la bonne croissance des végétaux, entraîne une forte augmentation de la mobilité de l'arsenic. Ainsi, au vu de ces résultats, il a semblé essentiel de limiter sa mobilité en associant à la combinaison biochar / compost, un amendement inorganique à base de fer capable d'immobiliser l'arsenic. Il a été démontré par les différents tests mis en œuvre, que du sulfate de fer combiné au biochar et au compost a permis de limiter l'impact de ce dernier sur la mobilité de l'arsenic dans l'eau interstitielle. Cependant, les fractions bioaccessibles du plomb et de l'arsenic semblent augmenter avec l'apport d'amendements.

L'étude du comportement des végétaux et de leurs impacts sur le technosol de Pontgibaud a été menée en utilisant le trèfle, et la combinaison trèfle + saule. Ainsi, une première étude a été menée pour démontrer la capacité du trèfle blanc (*Trifolium repens*) à se développer sur le technosol de Pontgibaud différemment amendé et accumulant le plomb et l'arsenic principalement dans son système racinaire. Cette étude a confirmé la capacité du trèfle à être utilisé dans un procédé de phytomanagement. Une deuxième expérience portant sur l'étude de l'association de deux espèces (*Salix viminalis* et *Trifolium repens*), a démontré que la croissance des deux espèces végétales choisies, associées ou non, avait une influence

Conclusion générale et Perspectives

sur les caractéristiques physico-chimiques du technosol. Elle a également montré que la combinaison d'espèces ligneuses et herbacées améliorait l'immobilisation du Pb alors que la mobilité de l'As n'était pas affectée. Cette combinaison d'espèces a également réduit le transport des matières en suspension et, en fin de compte, le transport du plomb. Cependant, la translocation des métaux et métalloïdes dans les parties aériennes du saule a augmenté lorsque le trèfle était présent. A contrario la présence de saule entraînait une diminution de la translocation de l'As et du Pb dans les parties aériennes du trèfle.

Le troisième objectif du présent travail était d'optimiser la mise en œuvre et la méthode de suivi sur le site minier de Pontgibaud, en situation de phytomanagement. Cette extrapolation du laboratoire au site devait permettre de tester la méthodologie développée en mésocosme.

Après avoir déterminé les amendements les plus appropriés à incorporer dans le technosol, à savoir une combinaison de biochar, de compost et de sulfate de fer et les végétaux à planter (association de saules et de trèfle), un plan divisant la parcelle expérimentale en 4 blocs a été réalisé. Les amendements ont été incorporés sur chaque bloc suivant le schéma défini. Les végétaux ont été ensuite implantés. Cette mise en place d'une stratégie de phytomanagement *in situ* a nécessité **un suivi tant au niveau du sol qu'au niveau de la végétation**.

Les résultats obtenus par les analyses physico-chimiques du technosol en cours de phytostabilisation ont confirmé les résultats de laboratoire concernant l'amélioration de la qualité agronomique du technosol, avec une augmentation du pH et des teneurs en éléments nutritifs, lorsque le biochar et le compost sont combinés ; le sulfate de fer n'ayant pas eu d'impacts significatifs sur ces paramètres. Cependant, ces analyses ont également démontré que les teneurs en éléments nutritifs diminuent au cours du temps. Cette étude sur site a également mis en évidence un impact contrasté des amendements sur la phytodisponibilité des métaux et métalloïdes, différents de ceux obtenus en mésocosme. En effet, en mésocosme les amendements ont abaissé plus fortement les fractions phytodisponibles que sur le site d'étude. Cependant, tout comme en mésocosme, l'analyse a démontré que la bioaccessibilité des métaux et métalloïdes a été légèrement augmentée par l'ajout des amendements.

L'analyse microbiologique par métagénomique a révélé un microbiote « adapté » au technosol avec des genres bactériens connus pour être tolérants aux métaux et métalloïdes. La présence du phylum des *Actinobacteria* est intéressante puisque les Actinobactéries peuvent favoriser la croissance des végétaux de manières directe ou indirecte. Des genres connus pour

Conclusion générale et Perspectives

appartenir à l'ensemble des « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » sont présents dans le sol de la parcelle expérimentale, ce qui suggérerait une synergie entre micro-organismes et végétaux potentiellement favorable pour le développement du couvert végétal. Cette analyse a également démontré l'effet positif du compost sur le microbiote du technosol avec une augmentation de la diversité des microorganismes comparativement au traitement par du biochar seul. Les communautés présentes dans le sol après un an de phytostabilisation comprennent toujours des micro-organismes hérités du compost, tels que des *Archae* méthanogènes. Cependant, l'analyse effectuée ne permet pas de savoir si ces organismes sont vivants ou morts.

Les analyses des concentrations des polluants dans les feuilles de saules et dans les parties aériennes du trèfle, sur deux saisons de croissance, ont permis de suivre leurs évolutions. Les résultats obtenus ont montré des concentrations de plomb dans les feuilles de saules de 50 mg.kg^{-1} en moyenne. Les concentrations étaient relativement homogènes entre les différentes espèces de saule et stables dans le temps. Les teneurs quantifiées dans les parties aériennes du trèfle étaient 10 fois supérieures à celles trouvées dans les feuilles de saules. Les résultats obtenus pour les concentrations d'arsenic dans les feuilles de saules ou dans le trèfle, après deux saisons de croissance, étaient relativement proches et étaient d'environ 30 mg.kg^{-1} . Il est important de noter, que les teneurs en plomb et en arsenic mesurées, que ce soit pour les saules ou le trèfle sur la parcelle expérimentale, étaient toutes inférieures à celles retrouvées dans les expériences en mésocosme Ceci, démontre tout l'intérêt de réaliser des expériences *in situ*, sur le long terme.

Enfin, la mesure de la production de biomasse des saules deux ans après leur implantation, a permis de montrer que le bloc PBC et le bloc PBCS ont permis d'obtenir la meilleure production de biomasse, qui se rapprochait pour *Salix triandra* du rendement obtenu sur des parcelles agricoles. Cependant, après ce recépage (février 2019) une interrogation se pose sur la capacité des saules à reprendre une croissance lors du printemps 2019. Il en est de même pour ce qui est de l'accumulation de polluants dans les parties aériennes des végétaux lors du prochain cycle de croissance.

Mes travaux de thèse menés sur une stratégie de remédiation de déchets miniers par l'apport d'amendements choisis pour leur action aussi bien sur l'état chimique des éléments métalliques et métalloïdes que sur la fertilité du technosol minier, a permis de tirer différents enseignements dans l'optique de développer cette approche de phytomanagement à d'autres sites. A notre connaissance, ces résultats sont les premiers sur ce type de réhabilitation.

Conclusion générale et Perspectives

Nous avons grâce aux expériences en mésocosme affiné la méthodologie du procédé de phytomanagement du laboratoire au site. Cela a nécessité de caractériser en amont la parcelle étudiée et d'obtenir en laboratoire à l'échelle du pot les conditions les plus favorables pour un futur essai à grande échelle (Tableau 5.1).

En effet, les différentes expériences sur le comportement des végétaux menées en mésocosme ont été suivies sur des périodes relativement courtes, rendant difficile voire hasardeux de transposer les résultats obtenus du mésocosme au terrain. A contrario, les études menées sur le terrain permettent d'étudier un processus de phytomanagement sur des périodes beaucoup plus longues, dans des conditions environnementales réelles (température, précipitations, prédateurs...) difficilement reproductibles au laboratoire. Par exemple, l'observation d'une diminution de la croissance des saules sur certains des blocs a probablement été influencée par la végétation proche de la parcelle (« effet de bord »). De même, l'hétérogénéité de la profondeur de l'eau hypodermique entre blocs a sans doute entraîné un approvisionnement en eau interbloc inégal et donc engendré une possible différence de croissance. De plus, bien que le technosol étudié ait des caractéristiques communes avec d'autres sols pollués, son comportement n'en est pas moins unique. Il pourrait alors s'avérer que les choix portés sur les amendements et les espèces végétales pour le site de Pontgibaud ne puissent pas être transposables à d'autres sites. Enfin, la plus grande limite relevée demeure la durée limitée de la thèse, 3 ans au total avec finalement la mise en place du dispositif terrain au cours de la 2^{ème} année.

Ainsi, la présentation de ces différents constats laisse de nombreuses questions en suspens.

Comment évolueront les sols et les amendements associés ? Leurs capacités d'immobilisation des métaux et métalloïdes seront-elles maintenues au cours du temps ? La complémentarité observée en mésocosme entre le saule et le trèfle se conservera-t-elle sur de nombreuses années ? Les espèces implantées qui sont exotiques (saule trèfle) au site vont-elles être remplacées par des espèces endémiques ? Quel sera le comportement vis-à-vis de la disponibilité de l'As et du Pb dans le cas d'implantations spontanées d'espèces endémiques sur le site ? Quelle sera la complémentarité entre les espèces endémiques et les espèces exotiques déjà installées ?

Conclusion générale et Perspectives

Tableau 5.1 : Apport des différentes étapes de la méthodologie d'optimisation développée dans le cadre de la présente thèse, nécessaires au développement du procédé de phytomanagement de technosol minier

Etapes	Informations apportées	Limites
Caractérisation du technosol	Concentrations, spéciation, biodisponibilité, bioaccessibilité des polluants	Evaluation très imparfaite de la biodisponibilité, dépendra du type de végétaux et de la microflore
Essais de laboratoire en mésocosmes	Efficacité des combinaisons d'amendements pour (1) développement des plantes, (2) immobilisation des polluants et (3) accumulation des polluants vers parties aériennes des plantes	Durée limitée, pas d'information sur l'évolution à long terme (sol et plantes) ; Pas d'interaction avec le compartiment sous-jacent (solide et nappe) ; Les paramètres physico-chimiques aléatoires du terrain (pluviométrie/température) ne sont pas étudiés
Essais sur site à l'échelle de la parcelle	Effet des paramètres physico-chimiques aléatoires du terrain (pluviométrie/température) ne sont pas étudiés, Effet des interactions avec le compartiment sous-jacent (solide et nappe)	Durée des essais : intérêt si la parcelle peut être suivie sur une échelle de temps suffisamment longue

Pour essayer de répondre à ces questions, le suivi de la parcelle expérimentale devra être maintenu en analysant :

- (1) **l'évolution du technosol**, en particulier des amendements et des métaux et métalloïdes tant d'un point de vue chimique (spéciation des métaux et métalloïdes, groupements fonctionnels des amendements) que physique (répartition verticale) sur la durée (plusieurs saisons de végétation). Il peut également être envisagé de quantifier l'érosion éolienne et hydrique entre notre parcelle en cours de phytomanagement et une parcelle non végétalisée pour vérifier si cette stratégie diminue la dispersion de particules. Il est nécessaire de rajouter l'analyse de la communauté fongique, en complément, de celle menée sur la communauté bactérienne. Ainsi, ces analyses de l'ensemble de la communauté microbiologique du technosol pourraient permettre d'identifier des espèces intéressantes en termes de tolérance aux métaux et métalloïdes et d'améliorer la croissance des végétaux.
- (2) **l'évolution de la végétation**, par l'observation d'une possible synergie ou compétition entre les espèces végétales combinées (capacité par exemple du trèfle à fixer l'azote et à le redistribuer aux saules). Tester la capacité des végétaux issus de l'inventaire floristique mené en périphérie de la parcelle étudiée à contribuer efficacement à la stratégie de phytomanagement. En effet, des espèces comme l'aulne et l'agrostide capillaire, collectées à proximité de la parcelle expérimentale,

ont montré en mésocosme des capacités intéressantes pour une stratégie de phytomanagement (projet PhytoSELECT, financé par la Région Centre-Val de Loire). Il serait maintenant intéressant de les étudier en condition naturelle, du fait de leur adaptation aux conditions pédogéoclimatiques locales, ce qui limiterait les risques écologiques associés à l'introduction d'espèces non endémiques. Enfin, l'analyse (travail en cours) et la location tissulaire du Pb et de l'As dans la biomasse ligneuse produite sur le site permettra d'envisager une valorisation du bois soit pour la production d'énergie, et/ou pour la fabrication de biochar. Ce qui permettrait de mettre en place une économie circulaire en réintroduisant le biochar produit dans des sols pollués en vue d'une stratégie de phytomanagement. Ceci pourrait s'avérer un élément important à considérer pour la suite du développement et de la commercialisation du procédé de phytomanagement, pour autant que les infrastructures nécessaires à la transformation de la biomasse soient disponibles.

Une généralisation de la plantation de végétaux sur des sites pollués permettrait de limiter la dispersion par érosion de particules fines toxiques et de capitaliser des revenus par la collecte de biomasse. De plus la production de biomasse fixatrice de carbone et l'enfouissement de biochar permettra de contribuer au développement durable face au changement environnemental global. Le phytomanagement s'inscrit donc indubitablement dans une ligne directrice de rémediation de sites et sols pollués plus écologique et acceptable par la société.

Conclusion générale et Perspectives

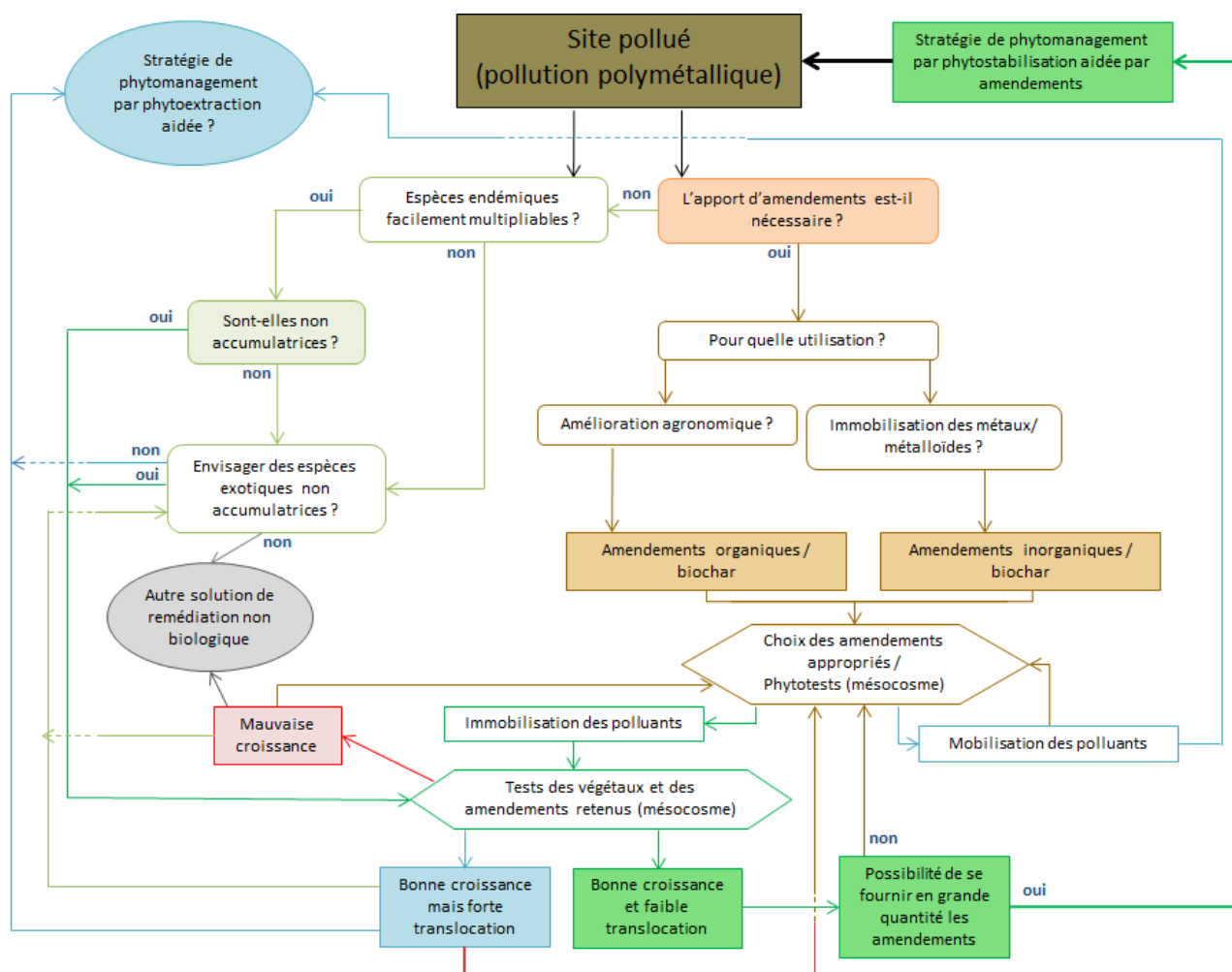


Figure 5.1 : Outil d'aide à la décision en vue de la mise en place d'une stratégie de phyomanagement par phytostabilisation de sites pollués par des métaux et métalloïdes assisté par des amendements.

Références bibliographiques

- Abou-Shanab RA, Angle JS, van Berkum P. (2007) Chromate-tolerant bacteria for enhanced metal uptake by *Eichhornia crassipes* (Mart.). *Int J Phytoremediation*;9: 91–105.
- Achour-Rokbani A., Bauda P., Billard P. (2007) Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Research in Microbiology* 158: 128–137.
- Achour-Rokbani A., Cordi A., Poupin P., Bauda P., Billard P. (2010) Characterization of the *ars* gene cluster from extremely arsenic-resistant *microbacterium* sp. Strain A33. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 948–955.
- ADEME 2013 Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie. (2013) La contamination des sols : une menace pour l'Homme et les écosystèmes. In ADEME. Site pollués et sols.
- Adriano D.C. (2001) Trace Elements in Terrestrial Environments, second ed. Springer-Verlag, New York.
- Adriano D.C., Wenzel W.W., Vangronsveld J., Bolan N.S. (2004) Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. *Geoderma* 122: 121–142.
- Alloway B.J. (1995) Soil processes and the behavior of heavy metals. In: Alloway BJ, editor. Heavy metals in soils. 2nd ed. London: Blackie Academic and Professional. p. 11–370.
- Ahmad M., Lee S.S., Yang J.E., Ro H.M., Lee Y.H., Ok Y.S. (2012) Effects of soil dilution and amendments (mussel shell cow bone, and biochar) on Pb availability and phytotoxicity in military shooting range soil, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 79: 225–231.
- Ahmad M., Rajapaksha A.U., Lim J.E., Zhang M., Bolan N., Mohan D., Vithanage M., Lee S.S. Ok Y.S. (2014) Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: A review. *Chemosphere*, 99: 19–33.
- Ahmedna M., Marshall W.E., Hussein A.A., Rao R.M., Goktepe I. (2004) The use of nutshell carbons in drinking water filters for removal of trace metals. *Water Res.* 38: 1062–1068.
- Agegehu G., Bass A.M., Nelson P.N., Muirhead B., Wright G., Bird M.I. (2015) Biochar and biochar-compost as soil amendments: Effects on peanut yield, soil properties and greenhouse gas emissions in tropical North Queensland, Australia. *Agri. Ecosyst. Environ.* 213:72–850.
- Alexandratos V.G., Elzinga E.J., Reeder R.J. (2007) Arsenate uptake by calcite: macroscopic and spectroscopic characterization of adsorption and incorporation mechanisms. *Geochim. Cosmochim. Acta* 71 (17): 4172–4187
- Ali H., Khan E., Anwar Sajad M. (2013) Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications *Chemosphere* 91 (2013): 869–8810.
- Alvarenga P., Gonçalves A.P., Fernandes R.M., de Varennes A., Vallini G., Duarte E., Cunha-Queda A.C. (2008) Evaluation of composts and liming materials in the phytostabilization of a mine soil using perennial ryegrass. *Sci. Total Environ.* 406: 43–56.
- Alvarenga P., Goncalves A.P., Fernandes R.M., Varennes A., Vallini G., Duarte E. (2009) Organic residues as immobilizing agents in aided phytostabilization: (I) effects on soil chemical characteristics, *Chemosphere* 74: 1292–1300.
- Álvarez-Valero AM, Sáez R, Pérez-López R., Delgado J., Nieto, J.M. (2009) Evaluation of heavy metal bio-availability from Almagrera pyrite-rich tailings dam (Iberian Pyrite Belt, SW Spain) based on a sequential extraction procedure. *J Geochem Explor* 102: 87–94.
- Al-Wabel M., Al-Omran A., El-Naggar A.H., Nadeem M., Usman A.R.A. (2013) Pyrolysis temperature induced changes in characteristics and chemical composition of biochar produced from *conocarpus* wastes. *Bioresour. Technol.* 131: 374–379.
- Anawar H.M. (2015) Sustainable rehabilitation of mining waste and acid mine drainage using ageochemistry,

Références bibliographiques

- mine type, mineralogy, texture, ore extraction and climate knowledge. *J Environ Manage* 158: 111–121.
- Andreazza, R., Okeke, B.C., Pieniz, S., Camargo, F.A. (2012) Characterization of copperresistant rhizosphere bacteria from *Avena sativa* and *Plantago lanceolata* for copper bioreduction and biosorption. *Biol. Trace Elem. Res.* 146 : 107–115.
- Andreux F. (1997) La matière organique des sols: interactions avec les polluants. *Comptes rendus de l'Académie d'Agriculture de France*, 83, pp. 111-123.
- Antoniadis V., Levizou E., Shaheen S.M., Ok Y.S., Sebastian A., Baum C., Rinklebe J. (2017) Trace elements in the soil-plant interface: Phytoavailability, translocation, and phytoremediation—A review. *Earth-Science Reviews*, 171: 621–645.
- Arduini L., Godbold D.L., Onnis A., Stefani A. (1998). Heavy metals influence mineral nutrition of tree seedlings. *Chemosphere*, 36(4-5): 739–744.
- Arienzo, M., Adamo, P., Cozzolino, V. (2004) The potential of *Lolium perenne* for revegetation of contaminated soil from a metallurgical site. *Sci. Total Environ.* 319: 13–25.
- Arocena J.M., van Mourik J.M., Schilder M.L.M., Faz Cano A. (2010) Initial Soil Development Under Pioneer Plant Species in Metal Mine Waste Deposits. *Restoration Ecology* 18 : 244–252.
- Artignan D., cottard F. (2003) Elément à prendre en compte pour l'évaluation d'un plan de prévention des risques miniers. brgm/rp-52049-fr.
- Asensio V., Covelo E.F., Kandeler E. (2013) Soil management of copper mine tailing soils —Sludge amendment and tree vegetation could improve biological soil quality. *Sci Total Environ.* 456–457:82–90.
- Atkinson C., Fitzgerald J., Hips N., (2010) Potential mechanisms for achieving agricultural benefits from biochar application to temperate soils: a review. *Plant and Soil* 337: 1–18.
- Awad Y.M., Blagodatskaya E., Ok Y.S., Kuzyakov Y. (2013) Effects of polyacrylamide, biopolymer and biochar on the decomposition of ¹⁴C-labelled maize residues and on their stabilization in soil aggregates. *Eur. J. Soil Sci.* 64: 488–499.
- Azarbad H., Niklińska M., Laskowski R., van Straalen N.M., van Gestel C.A.M., Zhou J., He, Z., Wen C., Röling W.F.M. (2015) Microbial community composition and functions are resilient to metal pollution along two forest soil gradients. *FEMS Microbiology Ecology* 91: 1–11.
- Bacchetta G., Cao A., Cappai G., Carucci A., Casti M., Fercia M.L., Mola F. (2012). A field experiment on the use of *Pistacia lentiscus* L. and *Scrophularia canina* L. *subsp. bicolor* (Sibth. et Sm.) Greuter for the phytoremediation of abandoned mining areas. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 146(4): 1054–1063.
- Badreddine R., Le Dred R., Prost R. (2002). A far infrared study of K⁺ ions during K⁺⇌ Ca²⁺ exchange in vermiculite. *Clay Minerals*, 37(1): 59–70.
- Badri D.V., Vivanco J.M. (2009) Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ.* 32: 666–681.
- Baetz U., Martinoia E. (2014) Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends Plant Sci.* 19: 90–98.
- Bagherifam S., Lakzian A., Fotovat A., Khorasani R., Komarneni S. (2014) In situ stabilization of As and Sb with naturally occurring Mn, Al and Fe oxides in a calcareous soil: bioaccessibility, bioavailability and speciation studies. *J. Hazard. Mater.* 273 : 247–252.
- Baize D (1997) Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols : France. Institut national de la recherche agronomique, Paris
- Balasoïu C.F., Zagury G.J., Deschênes L. (2001) Partitioning and speciation of chromium, copper, and arsenic in CCA-contaminated soils: influence of soil composition. *Sci. Total. Environ.* 280: 239–255
- Bart S., Motelica-Heino M., Miard F., Joussein E., Soubrand M., Bourgerie S., Morabito D. (2016). Thèse Romain Nandillon – 2019
- IDDEA – ISTO – LBLGC – BRGM

Références bibliographiques

- Phytostabilization of As, Sb and Pb by two willow species (*S. viminalis* and *S. purpurea*) on former mine technosols. *Catena* 136: 44–52.
- Basta N.T., McGowen, S.L. (2004) Evaluation of chemical immobilization treatments for reducing heavy metal transport in a smelter-contaminated soil. *Environ. Pollut.* 127: 73–82.
- Battaglia-Brunet F., Dictor M.C., Garrido F., Crouzet C., Morin D., Dekeyser K., Clarens M., Baranger P. (2002) An arsenic(III)-oxidizing bacterial population: selection, characterization, and performance in reactors. *J. Appl. Microbiol.* 93: 656–667.
- Battaglia-Brunet F., Joulain C., Garrido F., Dictor M.C., Morin D., Coupland K., Barrie Johnson D., Hallberg K.B., Baranger P. (2006) Oxidation of arsenite by *Thiomonas* strains and characterization of *Thiomonas arsenivorans* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* 89: 99–108.
- Beattie R.E., Henke W., Campa M.F., Hazen T.C., McAliley L.R., Campbell J.H. (2018) Variation in microbial community structure correlates with heavy-metal contamination in soils decades after mining ceased. *Soil Biol. Biochem.* 126: 57–63.
- Beesley L., Jimenez E.M., Eyles J.L. (2010) Effects of biochar and greenwaste compost amendments on mobility, bioavailability and toxicity of inorganic and organic contaminants in a multi-element polluted soil. *Environ. Pollut.* 158: 2282–2287
- Beesley L., Marmiroli M. (2011) The immobilisation and retention of soluble arsenic, cadmium and zinc by biochar. *Environ. Pollut.* 159: 474–480
- Beesley L., Dickinson N. (2011) Carbon and trace element fluxes in the pore water of an urban soil following greenwaste compost, woody and biochar amendments, inoculated with the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Soil Biol. Biochem.* 43: 188–196.
- Beesley L., Marmiroli M., Pagano L., Piloni V., Fellet G., Fresno T., Vamerali T., Bandiera M., Marmiroli N. (2013) Biochar addition to an arsenic contaminated soil increases arsenic concentrations in the pore water but reduces uptake to tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.). *Sci. Total Environ.* 454–455: 598–603.
- Beesley L., Inneh O.S., Norton G.J., Moreno-Jimenez E., Pardo T., Clemente R., Dawson J.J.C. (2014) Assessing the influence of compost and biochar amendments on the mobility and toxicity of metals and arsenic in a naturally contaminated mine soil. *Environ. Pollut.* 186: 195–202.
- Béhar F., Beaumont V., De B Pentead H.L. (2001) Rock-Eval 6 Technology: performances and developments. *Oil Gas Sci. Technol. Rev. Inst. Fr. Pétrol* 56: 111–134.
- Belimov A.A., Hontzeas N., Safronova V.I., Demchinskaya S.V., Piluzza G., Bullitta S., Glick B.R. (2005) Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology and Biochemistry* 37: 241–250.
- Bell T. H., Cloutier-Hurteau B., Al-Otaibi F., Turmel M. C., Yergeau E., Courchesne F., St-Arnaud, M. (2015) Early rhizosphere microbiome composition is related to the growth and Zn uptake of willows introduced to a former landfill. *Appl. Environ. Microbiol.* 17(8): 3025–3038.
- Ben Rebah F., Prévost D., Tyagi R.D. (2002) Growth of alfalfa in sudgeamended soils and inoculated with rhizobia produced in sudge. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 1339–1348.
- Berti W.R., Cunningham S.D. (2000) Phytostabilization of metals. in: Raskin, I., Ensley, B.D. (Eds.). *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment*. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 71–88.
- Bertoni G. (2006) L'analyse pour le diagnostic de la nutrition et pour le contrôle de la fertilisation. Présentation TD DNO Nutrition de la vigne ENSAT0
- Bhuiyan M.A.H., Parvez L., Islam M.A. (2010) Heavy metal pollution of coal mine-affected agricultural soils in the northern part of Bangladesh. *J. Hazard. Mater.* 173: 384–392.
- Bidar G., Garçon G., Pruvot C., Dewaele D., Cazier F., Douay F., Shirali P. (2007) Behavior of *Trifolium repens*
- Thèse Romain Nandillon – 2019
- IDDEA – ISTO – LBLGC – BRGM

Références bibliographiques

- and *Lolium perenne* growing in a heavy metal contaminated field: plant metal concentration and phytotoxicity. Environ. Pollut. 147: 546–553.
- Bidar G., Pruvot C., Garçon G., Verdin A., Shirali P., Douay F. (2009) Seasonal and annual variations of metal uptake, bioaccumulation, and toxicity in *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal-contaminated field. Environ. Sci. Pollut. Res. 16: 42–53.
- Black A., McLaren R.G., Reichman S.M., Speir T.W., Condon L.M. (2011) Evaluation of soil metal bioavailability estimates using two plant species (*L. perenne* and *T.aestivum*) grown in arrange of agricultural soils treated with biosolids and metal salts. Environ. Pollut. 159: 1523–1535.
- Blanchard C. (2000) Caractérisation de la mobilisation potentielle des polluants inorganiques dans les sols pollués. Thèse : Ecole Doctorale de Chimie de Lyon.
- Boisson J., Mench M., Vangronsveld J., Ruttens A., Kopponen P., De Koe T. (1999) Immobilization of trace metals and arsenic by different soil additives: evaluation by means of chemical extractions. Commun. Soil. Sci. Plant Anal. 30: 365–387.
- Bolan N.S., Duraisamy V.P. (2003) Role of inorganic and organic soil amendments on immobilisation and phytoavailability of heavy metals: a review involving specific case studies. Aust. J. Soil Res. 41: 33–555.
- Bolan N.S., Choppala G., Kunhikrishnan A., Park J.H., Naidu R. (2013) Microbial transformation of trace elements in soils in relation to bioavailability and remediation, Rev. Environ. Contam. Toxicol. 225: 1–56.
- Bolan N.S., Kunhikrishnan A., Thangarajana R., Kumpiene J., Park J., Makino T., Kirkham M B., Scheckel K. (2014) Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils or to immobilize? J. Hazard. Mater. 266: 141–166.
- Bonanno, G. (2011) Trace element accumulation and distribution in the organs of *Phragmites australis* (common reed) and biomonitoring applications. Ecotoxicol. Environ. Saf. 74: 1057–1064.
- Boussen S., Sebei A., Soubrand-Colin M. (2010) Mobilization of lead-zinc rich particles from mine tailings in northern Tunisia by aeolian and run-off processes. Bull Soc Geol Fr 181:4 59–471.
- Bowsher A.W., Ali R., Harding S.A., Tsai C.J., Donovan L.A. (2015) Analysis of wild sunflower (*Helianthus annuus* L.) root exudates using gas chromatography - mass spectrometry. J. Plant. Nutr. Soil. Sci. 178(5): 776–786.
- Brennan A., Jiménez E.M., Puschenreiter M., Albuquerque J.A., Switzer C. (2014) Effects of biochar amendment on root traits and contaminant availability of maize plants in a copper and arsenic impacted soil. Plant and soil, 379(1-2): 351–360.
- Brisset F., Repoux M., Ruste J., Grillon F., Robaut F. (2008) Microscopie électronique à balayage et microanalyses, gn meba edp sciences, paris, 435p.
- BRGM. (1997) Les résidus miniers français : typologie et principaux impacts environnementaux potentiels. rapport r39503, 85p.
- Broos K., Uyttebroek M., Mertens J., Smolders E. (2004) A survey of symbiotic nitrogen fixation by white clover grown on metal contaminated soils. Soil Biol. Biochem. 36: 633–640.
- Brown S.L., Henry C.L., Chaney R., Compton H., DeVolder P.S. (2003) Using municipal biosolids in combination with other residuals to restore metal-contaminated mining areas. Plant Soil 249: 203–215.
- Bruun E.W., Hauggaard-Nielsen H., Ibrahim N., Egsgaard H., Ambus P., Jensen P.A. Dam-Johansen K. (2011) Influence of fast pyrolysis temperature on biochar labile fraction and short-term carbon loss in a loamy soil. Biomass Bioenergy. 3 : 1182–1189.
- Burges A., Epelde L., Benito G., Artetxe U., Becerril J.M., Garbisu, C. (2016) Enhancement of ecosystem services during endophyte-assisted aided phytostabilization of metal contaminated mine soil. Sci. Total

Références bibliographiques

- Environ. 562 : 480–492.
- Burges A., Alkorta I., Epelde L., Garbisu C. (2018) From phytoremediation of soil contaminants to phytomanagement of ecosystem services in metal contaminated sites. *Int. J. Phytoremediation*, 20(4): 384–397
- Burgos P., Madejón P., Cabrera F., Madejón E. (2010) By-products as amendment to improve biochemical properties of trace element contaminated soils: Effects in time. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 64 : 481–488.
- Caboche J. (2009) Validation d'un test de mesure de bioaccessibilité. Application à 4 éléments traces métalliques dans les sols. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Cabral L., Soares C.R., Giachini A.J., Siqueira J.O. (2015) Arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of contaminated areas by trace elements: mechanisms and major benefits of their applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31 : 1655–1664.
- Calace N., Ciardullo S., Petronio B.M., Pietrantonio M., Abbondanzi F., Campisi T., Cardellicchio N. (2005) Influence of chemical parameters (heavy metals, organic matter, sulphur and nitrogen) on toxicity of sediments from the Mar Piccolo (Taranto, Ionian Sea, Italy). *Microchem. J.* 79(1-2) : 243–248.
- Calvet R (2003) Le sol: propriétés et fonctions. Tome 1. Ed. France agricole : Dunod, Paris.
- Cao X.D., Ma, L.Q., Shiralipour A. (2003) Effects of compost and phosphate amendments on arsenic mobility in soils and arsenic uptake by the hyperaccumulator, *Pteris vittata* L. *Environ. Pollut.* 126(2): 157–167.
- Cao X.D., Ma L.Q. (2004) Effects of compost and phosphate on plant arsenic uptake from contaminated soils near pressure-treated wood. *Environ. Pollut.* 132: 435–42.
- Cao X.D., Ma L.N., Gao B., Harris W. (2009) Dairy-manure derived biochar effectively sorbs lead and atrazine. *Environ. Sci. and Technol.* 43: 3285–3291.
- Caporale A.G., Pigna M., Sommella A., Dynes J.J., Cozzolino V., Violante A. (2013) Influence of compost on the mobility of arsenic in soil and its uptake by bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) irrigated with arsenite-contaminated water. *J. Environ. Manage.* 128: 837–843.
- Carbonell-Barrachina A.A., Burló-Carbonell F., and Mataix-Beneyto J. (1997) Effect of sodium arsenite and sodium chloride on bean plant nutrition (macronutrients). *J. Plant. Nutr.* 20: 1617–1633.
- Carlos M.H.J., Stefani P.V.Y., Janette A.M., Melani M.S.S., Gabriela P.O. (2016) Assessing the effects of heavy metals in ACC deaminase and IAA production on plant growth-promoting bacteria. *Microbiol. Res.* 188–189: 53–61.
- Castaldi P., Santona L., Melis P. (2005). Heavy metal immobilization by chemical amendments in a polluted soil and influence on white lupin growth. *Chemosphere* 60: 365–371.
- Castaldi P., Silvetia M., Manzanob R., Brundua G., Roggeroa P.P., Garaua, G. (2018) Mutual effect of *Phragmites australis*, *Arundo donax* and immobilization agents on arsenic and trace metals phytostabilization in polluted soils. *Geoderma*. 314: 63–72.
- Casteel S.W., Cowart R.P., Weis C.P., Henningsen G.M., Hoffman E., Brattin W.J., Guzman R.E., Starost M.F., Payne J.T., Stockham S.L. (1997) Bioavailability of lead to juvenile swine dosed with soil from the Smuggler Mountain NPL site of Aspen, Colorado. *Toxicol. Sci.* 36 (2): 177–187.
- Cattani I., Fragoulis G., Boccelli R.E., Capri E. (2006) Copper bioavailability in the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in two Italian soils. *Chem.* 64: 1972–1979.
- Cayuela M.L., Van Zwieten L., Singh B.P., Jeffery S., Roig A., Sánchez-Monedero M.A. (2014) Biochar's role in mitigating soil nitrous oxide emissions: a review and meta-analysis. *Agric. Ecosyst. Environ.* 191: 5–16.
- Cecchi M. (2008) DEVENIR DU PLOMB DANS LE SYSTEME SOL-PLANTE Cas d'un sol contaminé par une usine de recyclage du plomb et de deux plantes potagères (Fève et Tomate) Thèse univversité de Thèse Romain Nandillon – 2019
- IDDEA – ISTO – LBLGC – BRGM

Références bibliographiques

Toulouse.

- Cerqueira B., Vega F.A., Silva F.O.L., Andrade L. (2012) Effects of vegetation on chemical and mineralogical characteristics of soils developed on a decantation bank from copper mine. *science of the total environment*, 421-422, pp. 220–229.
- Chaignon V., Bedin F. Hinsinger P. (2002) Copper bioavailability and rhizosphere pH changes as affected by nitrogen supply for tomato and oilseed rape cropped on an acidic and a calcareous soil. *Plant Soil*. 243: 219–228.
- Chassin P., Baize D., Cambier P., Sterckeman T. (1996) Les éléments traces métalliques et la qualité des sols. Numéro spécial: 297–306.
- Chatain. (2004) Caractérisation de la mobilisation potentielle de l'arsenic et d'autres constituants inorganiques présents dans les sols issus d'un site minier aurifère. Thèse del' INSA (Lyon).
- Chang Y.H., Han J.I., Chun J.S., Lee K.C., Rhee M.S., Kim Y.B., Bae K.S. (2002) *Comamonas koreensis* sp nov., a non-motile species from wetland in Woopo, Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 377–381.
- Chao Y., Liu W., Chen Y., Chen W., Zhao L., Ding Q., Wang S., Tang Y.T., Zhang T., Qiu R.L. (2016) Structure, Variation, and Co-occurrence of Soil Microbial Communities in Abandoned Sites of a Rare Earth Elements Mine. *Environmental Science and Technology* 50: 11481–11490.
- Chatterjee S.K., Bhattacharjee I., Chandra G. (2010) Biosorption of heavy metals from industrial waste water by *Geobacillus thermodenitrificans*, *J. Hazard. Mater.* 175: 117–125,
- Chen S., Xu M., Ma Y., Yang, J. (2007) Evaluation of different phosphate amendments on availability of metals in contaminated soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67(2): 278–285.
- Chen B et Yuan M. (2010) Enhanced sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil amended with biochar. *J. Soils Sediments*. 11: 62–71.
- Chen L., Gao S., Zhu P., Liu Y., Hu T., Zhang J. (2013) Comparative study of metal resistance and accumulation of lead and zinc in two poplars. *Physiol. Plant.* 151: 390–405.
- Chen T., Zhang Y.X., Wang H.T., Lu W.J., Zhou Z.Y., Zhang Y.C., Ren L.L. (2014a) Influence of pyrolysis temperature on characteristics and heavy metal adsorptive performance of biochar derived from municipal sewage sludge. *Bioresour. Technol.* 164: 47–54.
- Chen G., Zou X., Zhou Y., Zhang J., Owens G. (2014b) A short-term study to evaluate the uptake and accumulation of arsenic in Asian willow (*Salix sp.*) from arsenic-contaminated water. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21: 3275–3284.
- Chen T., Zhou Z.Y., Xu S., Wang H.T., Lu W.J. (2015). Adsorption behavior comparison of trivalent and hexavalent chromium on biochar derived from municipal sludge. *Bioresour. Technol.* 190: 388–394.
- Chen J., Shafi M., Wang Y., Wu J., Ye Z., Liu C., Zhong B., Guo H., He L., Liu D. (2016) Organic acid compounds in root exudation of moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*) and its bioactivity as affected by heavy metals. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23: 20977–20984.
- Chen Z., Tian Y., Zhang Y., Song B., Li H., Chen Z. (2016). Effects of root organic exudates on rhizosphere microbes and nutrient removal in the constructed wetlands. *Ecol. Eng.* 92: 243–250.
- Chen Z., Wang Y., Xia D., Jiang X., Fu D., Shen L., Wang H., Li Q.B. (2016) Enhanced bioreduction of iron and arsenic in sediment by biochar amendment influencing microbial community composition and dissolved organic matter content and composition. *J. Hazard. Mater.* 311: 20–29.
- Chen Z., Wang Y., Jiang X., Fu D., Xia D., Wang H., Li Q. (2017) Dual roles of AQDS as electron shuttles for microbes and dissolved organic matter involved in arsenic and iron mobilization in the arsenic-rich sediment. *Sci. Total Environ.* 574: 1684-1694.

Références bibliographiques

- Chen Y., Ding Q., Chao Y., Wei X., Wang S., Qiu R. (2018) Structural development and assembly patterns of the root-associated microbiomes during phytoremediation. *Sci. Total Environ.* 644: 1591-1601.
- Cheng S.F., Hseu Z.Y. (2002) *In-situ* immobilization of cadmium and lead by different amendments in two contaminated soils. *Water Air Soil Pollut.* 140: 73–84.
- Cheng S. (2003) Heavy metals in plants and phytoremediation. *Environ Sci. Pollut. Res.* 10 ; 335–340
- Chevrier E. (2013) La phytoremédiation, une solution d'avenir pour le Québec. Université de Sherbrooke.
- Chiang P.N., Wang M.K., Chiu C.Y., Chou, S.Y. (2006) Effects of cadmium amendments on low - molecular - weight organic acid exudates in rhizosphere soils of tobacco and sunflower. *Environ. Toxicol: An International Journal.* 21(5): 479–488.
- Chintala R., Mollined., Schumacher T.E., Malo D.D., Julson J.L. (2013) Effect of biochar on chemical properties of acidic soil. *Arch. Agron. Soil Sci.* 60: 393–404.
- Chlopecka A., Adriano D.C. (1996) Mimicked in-situ stabilization of metals in a cropped soil: bioavailability and chemical form of zinc, *Environ. Sci. Technol.* 30: 3294–3303.
- Chlopecka A., Adriano D.C. (1997) Influence of zeolite, apatite and Fe-oxide on Cd and Pb uptake by crops, *Sci. Total Environ.* 207: 195–206.
- Chodak M., Pietrzykowski M., Sroka K. (2015) Physiological profiles of microbial communities in mine soils afforested with different tree species. *Ecol Eng* 81: 462–470.
- Choppala G.K., Bolan N.S., Mallavarapu M., Chen Z., Naidu R. (2012) The influence of biochar and black carbon on reduction and bioavailability of chromate in soils. *J. Environ. Qual.* 41: 1–10.
- Chou K.C., Shen H.B. (2007) Recent progress in protein subcellular location prediction. *Anal. Biochem.* 370: 1–16
- Clemens S., Palmgren M.G., Krämer U. (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in plant science*, 7(7): 309–315.
- Clemente R., Hartley W., Riby P., Dickinson N.M., Lepp N.W. (2010) Trace element mobility in a contaminated soil two years after field-amendment with a greenwaste compost mulch. *Environ. Pollut.* 158: 1644–1651.
- Clemente R., Walker D.J., Pardo T., Martínez-Fernández D., Bernal M.P. (2012) The use of a halophytic plant species and organic amendments for the remediation of a trace elements-contaminated soil under semi-arid conditions. *J. Hazard. Mater.* 223–224: 63–71.
- Comifer. (1993) Aide au diagnostic et à la prescription de la fertilisation phosphatée et potassique des grandes cultures, 28pp
- Contin M., Mondini C., Leita L., De Nobili M. (2007). Enhanced soil toxic metal fixation in iron (hydr) oxides by redox cycles. *Geoderma.* 140(1): 164-175.
- Conesa H.M., Faz A., Arnaldos R. (2006) Heavy metal accumulation and tolerance in plants from mine tailings of the semiarid Cartagena La Uni on mining district (SE Spain). *Sci. Total Environ.* 366: 1–11.
- Cornu S., Clozel B. (2000) Extractions séquentielles et spéciation des éléments trace métalliques dans les sols naturels. *étude et gestion des sols*, 7, pp 179–189.
- Cottard F. (2009) – Synthèse documentaire sur le district plombo-argentifère de Pontgibaud (63) – Phase 1, rapport BRGM/RP-57862-FR, 33 p. 2 fig., 3 tabl., 2 Ann.
- Crane-Droesch A., Abiven S., Jeffery S. et Torn M.S. (2013) Heterogeneous global crop yield response to biochar: a meta-regression analysis. *Environ. Res. Lett.* 8: 044–049.
- Craven D., Isbell F., Manning P., Connolly J., Bruehlheide H., Ebeling A., Roscher C., van Ruijven J., Weigelt A.,

Références bibliographiques

- Wilsey B. (2016) Plant diversity effects on grassland productivity are robust to both nutrient enrichment and drought. *Philos. Trans. R. Soc. B* <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0277>.
- Creger T.L., Peryea F.J. (1994) Phosphate fertilizer enhances arsenic uptake by apricot liners grown in lead-arsenate-enriched soil, *HortScience* 29: 88–92.
- Cui Y., Du X., Weng L., Van Riemsdijk W.H. (2010) Assessment of *In Situ* Immobilization of Lead (Pb) and Arsenic (As) in Contaminated Soils with Phosphate and Iron: Solubility and Bioaccessibility. *Water Air Soil Pollut.* 213: 95–104.
- Cui J., Du J., Yu S. (2015) Groundwater arsenic removal using granular TiO₂: integrated laboratory and field study. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22: 8224–8234.
- Cundy A.B., Bardos R.P., Church A., Puschenreiter M., Friesl-Hanl W., Müller I., Neu S., Mench M., Witters N., Vangronsveld J. (2013) Developing principles of sustainability and stakeholder engagement for “gentle” remediation approaches: the European context. *J. Environ. Manag.* 129: 283–291
- Cundy A.B., Bardos R.P., Puschenreiter M., Mench M., Bert V., Friesl-Hanl W., Müller I., Li X.N., Weyens N., Witters N., Vangronsveld J. (2016) Brownfields to green fields: realising wider benefits from practical contaminant phytomanagement strategies. *J. Environ. Manag.* 184: 67–77
- Curie C., Panaviene Z., Loulergue C., Dellaporta S.L., Briat J.F., Walker E.L. (2001) Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* 409: 346–349.
- Cutler W.G., El-Kadi A., Hue N.V., Peard J., Scheckel K., Ray C. (2014) Iron amendments to reduce bioaccessible arsenic. *J. Hazard Mater.* 279: 554–561.
- Darrah P.R. (1993). The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. *Plant Soil*, 155(1): 1–20.
- Da Silva E.F., Fonseca E.C., Matos J.X. (2005) The effect of unconfined mine tailings on the geochemistry of soils, sediments and surface waters of the lousal area (Iberian Pyrite Belt, Southern Portugal). *Land Degrad Dev* 16: 213–228.
- Davidson C., Thomas R.P., Mcvey S.E., Perala R., Littlejohn D., Ure A.M. (1994) Evaluation of a sequential extraction procedure for the speciation in sediments. *analytica chimica acta* 291, pp 277–386.
- Davidson C.M., Duncan A.L., Littlejohn D., Ure A.M., Garden L.M. (1998) A critical evaluation of the three-stage brc sequential extraction procedure to assess the potential mobility and toxicity oh heavy metals in industrially- contaminated land. *analytica chimica acta* 363, pp 45–55.
- Davidson C., Ferreira P.C.S., Ure A.M. (1999) Some sources of variability in application of three stage sequential extraction procedure recommended by BCR to industrially-contaminated soil. *fresenius j. anal. chem*, 363, pp 446–451.
- De Maria A.R., Rivelli M., Kuffner A., Sessitsch W.W., Wenzel M., Gorfer J., Strauss M. Puschenreiter. (2011) Interactions between accumulations of traceelements and major nutrients in *Salix caprea* after inoculation withrhizosphere microorgaisms, *Chemosphere.* 84: 1256–1261.
- De Meyer S.E., De Beuf K., Vekeman B., Willems A. (2015) A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biology and Biochemistry* 83: 1–11.
- Deshommes E., Tardif R., Edwards M., Sauvé S., Prévost M. (2012) Experimental determination of the oral bioavailability and bioaccessibility of lead particles. *Chem. Central J.* 6, 138
- Desjardins D., Brereton N.J.B., Marchand L., Brisson J., Pitre F.E., Labrecque M. (2018) Complementarity of three distinctive phytoremediation crops for multiple-trace element contaminated soil. *Sci. Total. Environ.* 610–611: 1428–1438.
- Dessureault-Rompré J., Nowack B., Schulin R., Tercier-Waeber M.L., Luster J. (2008) Metal solubility and speciation in the rhizosphere of *Lupinus albus* cluster roots. *Environ. Sci. Technol.* 42: 7146–7151.
- DeVolder P.S., Brown S.L., Hesterberg D., Pandya K. (2003) Metal bioavailability and speciation in a wetland
- Thèse Romain Nandillon – 2019
- IDDEA – ISTO – LBLGC – BRGM

Références bibliographiques

- tailings repository amended with biosolids compost, wood ash, and sulphate, *J. Environ. Qual.* 32: 851–864.
- Dhankher, O.P., Li, Y.J., Rosen, B.P., Shi, J., Salt, D.E., Senecoff, J.F., Sashti, N.A., Meagher, R.B., 2002. Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and gamma-glutamylcysteine synthetase expression. *Nat. Biotechnol.* 20: 1140–1145.
- Dickinson N.M., Baker A.J.M., Doronila A., Laidlaw S., Reeves R.D. (2009) Phytoremediation of inorganics: realism and synergies. *Int. J. Phytoremediation.* 11: 97–114.
- Ding W.C., Dong X.L., Ime I.M., Gao B., Ma L.Q. (2014) Pyrolytic temperatures impact lead sorption mechanisms by bagasse biochars. *Chemosphere.* 105: 68–74.
- Ding Z., Wu H., Xin Hu X. (2017) Multiple Characterization for Mechanistic Insights of Pb(II) Sorption onto Biochars Derived from Herbaceous Plant, Biosolid, and Livestock Waste. *BioResources* 12(3): 6763–6772.
- Disnar J.R., Guillet B., Keravis D., Di Giovanni C., Sebag D. (2003) Soil organic matter (SOM) characterization by Rock-Eval pyrolysis: scope and limitations. *Org. Geochem.* 34: 327–343.
- Dong, J., Mao, W., Zhang, G., Wu, F., Cai, Y., 2007. Root excretion and plant tolerance to cadmium toxicity - a review. *Plant Soil Environ.* 53: 193–200.
- Doucet R. (2006) *Le climat et les sols agricoles.* ed. Berger, Eastman, Québec. xv, 443 pp
- Drahota P., Filippi M. (2009). Secondary arsenic minerals in the environment: a review. *Environment international*, 35(8) : 1243–1255.
- Duchaufour P (1991) *Pédologie: sol, végétation, environnement.* Masson, Paris.
- Durand A., Maillard F., Foulon J., Gweon H.S., Valot B., Chalot M. (2017) Environmental Metabarcoding Reveals Contrasting Belowground and Aboveground Fungal Communities from Poplar at a Hg Phytomanagement Site. *Microbial Ecology* 74: 795–809.
- El Amari K., Valera P., Hibti M., Pretti S., Marcello A., Essarraj S. (2014) Impact of mine tailings on surrounding soils and ground water: Case of Kettara old mine, Morocco *J. Afr. Ear. Sci.* 100: 437–449.
- Elvard. (2013) *Le potentiel du saule pour la phytostabilisation des sols pollués par les éléments-traces métalliques.* Thèse de doctorat. Université de Liège, Belgique.
- Emamverdian A., Ding Y., Mokherdoran F., Xie Y. (2015) Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *Sci. World J.* 1–18.
- Engel K., Pinnell L., Cheng J., Charles T.C., Neufeld J.D. (2012). Nonlinear electrophoresis for purification of soil DNA for metagenomics. *J. Microbiol. Methods.* 88: 35–40.
- Evangelou M.W., Robinson B.H., Günthardt-Goerg M.S., Schulin R. (2013) Metal uptake and allocation in trees grown on contaminated land: implications for biomass production. *Int. J. of phytoremediation*, 15(1): 77–90.
- Evans L.J. (1989) Chemistry of metal retention by soils. *Environ. Sci. Technol.* 23: 1046–1056.
- Faucon M.P., Houben D., Lambers H. (2017) Plant Functional Traits: Soil and Ecosystem Services Trends in Plant Science, May 2017, Vol. 22, No. 5.
- Feidt C., Denys S., Floch-Barneaud A., Caboche J., Dor F., Dabin C., Tack K. (2011) Biodisponibilité des polluants du sol : définition, caractérisation et utilisation potentielle dans la gestion des sites et sols pollués, hal id: dumas-00647471, (archive ouverte).
- Fellet G., Marchiol L., Delle Vedove G., Peressotti A. (2011) Application of biochar on mine tailings: Effects and perspectives for land reclamation. *Chemosphere.* 83: 1262–1267.

Références bibliographiques

- Feng Q., Zhang Z., Chen Y., Liu L., Zhang Z., Chen C. (2013) Adsorption and desorption characteristics of arsenic on soils: kinetic, equilibrium, and effect of $\text{Fe}(\text{OH})_3$ colloid, H_2SiO_3 colloid and phosphate. *Procedia Environ. Sci.* 18: 26–36.
- Fischer., Glaser. (2012) Synergisms between Compost and Biochar for Sustainable Soil Amelioration. http://www.intechopen.com/download/pdf/pdfs_id/27163
- Fitz W.J., Wenzel W.W. (2002) Arsenic transformations in the soil/rhizosphere/plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. *J. Biotechnol.* 99: 259–278.
- Forján R., Rodríguez-Vila A., Covelo E.F. (2018) Using compost and technosol combined with biochar and *Brassica juncea* L. to decrease the bioavailable metal concentration in soil from a copper mine settling pond. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25: 1294–1305.
- Foulon J., Zappelini C., Durand A., Valot B., Blaudez D., Chalot M. (2016a). Impact of poplar-based phytomanagement on soil properties and microbial communities in a metal-contaminated site. *FEMS Microbiology Ecology* 92, fiw163-fiw163.
- Foulon J., Zappelini C., Durand A., Valot B., Girardclos O., Blaudez D., Chalot M. (2016b) Environmental metabarcoding reveals contrasting microbial communities at two poplar phytomanagement sites. *Sci. Tot. Environ.* 571: 1230–1240.
- French C.J., Dickinson N.M., Putwain P.D. (2006) Woody biomass phytoremediation of contaminated brown field land. *Environ. Pollut.* 141: 387–395.
- Fresno T., Moreno-Jiménez E., Peñalosa J.M. (2016). Assessing the combination of iron sulfate and organic materials as amendment for an arsenic and copper contaminated soil. A chemical and ecotoxicological approach. *Chemosphere.* 165: 539–546.
- Fresno T., Moreno-Jimenez E., Zornoza P., Peñalosa J.M. (2018). Aided phytostabilisation of As- and Cu-contaminated soils using white lupin and combined iron and organic amendments. *J. Environ. Manag.* 205: 142–150.
- Fu Y., Lin C., Ma J., Zhu T. (2010) Effects of plant types on physico-chemical properties of reclaimed mining soil in Inner Mongolia, China. *Chin. Geogr. Sci.* 20: 309–317.
- Fu J., Cui Y. (2013) *In vitro* digestion/Caco-2 cell model to estimate cadmium and lead bioaccessibility/bioavailability in two vegetables: The influence of cooking and additives. *Food Chem. Toxicol.* 59: 215–221.
- Galende M.A., Becerril J.M., Barrutia O., Artetxe U., Garbisu C., Hernández A. (2014) Field assessment of the effectiveness of organic amendments for aided phytostabilization of a Pb–Zn contaminated mine soil. *J. Geochem. Explor.* 145: 181–189.
- Galvez-Cloutier R., Lefrancois P.J. (2005) Les sols contaminés par des métaux lourds: Distribution géochimique et techniques de restauration (Première partie). *Vecteur environnement.* 38(3): 30–38.
- Garau G., Castaldi P., Santona L., Deiana P., Melis P. (2007) Influence of red mud, zeolite and lime on heavy metal immobilization, culturable heterotrophic microbial populations and enzyme activities in a contaminated soil, *Geoderma.* 142: 47–57.
- Gardea-Torresdey J.L., Gonzalez J.H., Tiemann K.J., Rodriguez O., Gamez G. (1998) Phytofiltration of hazardous cadmium, chromium, lead and zinc ions by biomass of *Medicago sativa* (Alfalfa). *J. Hazard. Mater.* 57: 29–39.
- Garnier E., Navas M. L., Grigulis K. (2016) Plant functional diversity: Organism traits, community structure, and ecosystem properties. Oxford University Press.
- Garnier-Laplace J., Fournier-Bidoz V., Baudin J.P. (1997) Etat des connaissances sur les échanges entre l'eau, les matières en suspension et les sédiments des principaux radionucléides rejetés en eau douce par les centrales nucléaires. *Radioprotection.* 32: 49–71.

Références bibliographiques

- Gartler J., Robinson B., Burton K., Clucas L. (2013) Carbonaceous soil amendments to biofortify crop plants with zinc. *Sci. Total. Environ.* 465: 308–313.
- Geebelen W., Adriano D.C., van der Lelie D., Mench M., Carleer R., Clijsters H., Vangronsveld J. (2003) Selected bioavailability assays to test the efficacy of amendment-induced immobilization of lead in soils. *Plant Soil*. 249: 217–228.
- Gerhardt K.E., Gerwing P.D., Greenberg B.M. (2017) Opinion: Taking phytoremediation from proven technology to accepted practice. *Plant Science*. 256: 170–185.
- Gerritse R.G., Vriesema R., Dalenberg J.W., De Roos, H.P. (1982) Effect of Sewage Sludge on Trace Element Mobility in Soils 1. *J. Environ. Qual.* 11(3): 359–364.
- Ghorbel M., Munoz M., Courjault-Rade P., Destrigneville C., De pardeval P., Souissi R., Souissi F., Ben mammou A., Abdeljaouad S. (2010) Health risk assessment for human exposure by direct ingestion of pb, cd, zn bearing dust in the former miner's village of jebel ressas (ne tunisia). *j mineral*, 11p.
- Ghosh W., Dam B. (2009) Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea. *FEMS Microbiol. Rev.* 33: 999–1043.
- Gil-Loaiza J., White S.A., Root R.A., Solís-Dominguez F.A., Hammond C.M., Chorover J, Maier R.M. (2016) Phytostabilization of mine tailings using compost-assisted direct planting: Translating greenhouse results to the field. *Sci. Tot. Environ.* 565: 451–461.
- Glaser B., Lehmann J., Zech W. (2002). Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal – a review. *Biol. Fertil. Soils* 35: 219–230.
- Glaser B., Birk, J.J. (2012) State of the scientific knowledge on properties and genesis of Anthropogenic Dark Earths in Central Amazonia (terra preta de Índio). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 82: 39–51.
- Glick B.R. (2014) Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* 169: 30–39.
- Gomez-Balderas C.D.C., Cochet N., Bert V., Tarnaud E., Sarde C.O. (2014) 16S rDNA analysis of bacterial communities associated with the hyper accumulator *Arabidopsis halleri*, grown on a Zn and Cd polluted soil. *Eur. J. Soil Biol.* 60: 16–23.
- Gomez-Eyles J.L., Sizmur T., Collins C.D., Hodson M.E. (2011) Effects of biochar and the earthworm *Eisenia fetida* on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons and potentially toxic elements. *Environ. Pollut.* 159: 616–622.
- Gong Y., Zhao D., Wang Q. (2018) An overview of field-scale studies on remediation of soil contaminated with heavy metals and metalloids: Technical progress over the last decade. *Water Res.* 147: 440–460
- González-Alcaraz M.N., Álvarez-Rogel J. (2013) Liming and vegetation favor Fe-mobilization in eutrophic wetland soils affected by mine wastes. *Ecol. Eng.* 53: 183–193.
- González-Núñez R., Alba M.D., Orta M.M., Vidal M., Rigol A. (2011) Remediation of metal-contaminated soils with the addition of materials – Part I: Characterization and viability studies for the selection of non-hazardous waste materials and silicates. *Chemosphere* 85: 1511–1517.
- González-Oreja J.A., Rozas M.A., Alkorta I., Garbisu C. (2008) Dendroremediation of heavy metal polluted soils. *Rev. Environ. Health* 23: 223–234.
- Goswami, D., Thakker, J. N., & Dhandhukia, P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1): 1127500.
- Graber E.R., Harel Y.M., Kolton M., Cytryn E., Silber A., David D.R., Tsechansky L., Borenshtein M., Elad Y. (2010) Biochar impact on development and productivity of pepper and tomato grown in fertigated soilless media. *Plant Soil*. 337: 481–496.
- Grafe M., Eick M.J., Saunders A.M. (2002) Adsorption of arsenate and arsenite on ferrihydrite in the presence
- Thèse Romain Nandillon – 2019
IDDEA – ISTO – LBLGC – BRGM

Références bibliographiques

- and absence of dissolved organic carbon. J. Environ. Qual. 31: 1115–1123.
- Grard B. (2017) Des Technosols construits à partir de produits résiduels urbains: services écosystémiques fournis et évolution. Ecologie, Environnement. Université Paris-Saclay, Français.<NNT: 2017SACLA043>.
- Gray C., Dunham S., Dennis P., Zhao F., McGrath S. (2006) Field evaluation of *In situ* remediation of a heavy metal contaminated soil using lime and red-mud, Environ. Pollut. 142: 530–539.
- Gray M., Johnson M.G., Dragila M.I., Kleber M. (2014) Water uptake in biochars: The roles of porosity and hydrophobicity. Biomass Bioenergy. 61: 196–205.
- Gregory S.J., Anderson C.W.N., Camps Arbestain M., McManus M.T. (2014) Response of plant and soil microbes to biochar amendment of an arsenic-contaminated soil. Agri. Ecosyst. Environ. 191 : 133–141.
- Grünewald G., Kaiser K., Jahn R. (2007) Alteration of secondary minerals along a time series in young alkaline soils derived from carbonatic wastes of soda production. Catena. 71: 487–496.
- Gupta A.K., Sinha S. (2007) Assessment of single extraction methods for the prediction of bioavailability of metals to *Brassica juncea* L. Czern. (var. Vaibhav) grown on tannery waste contaminated soil. J. Hazard. Mater. 149: 144–150.
- Han D.H., Lee J.H. (1996) Effect of liming on uptake of lead and cadmium by *Raphanus sativa*, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 488–493.
- Han, H., Sheng, X., Hu, J., He, L., & Wang, Q. (2018). Metal-immobilizing *Serratia liquefaciens* CL-1 and *Bacillus thuringiensis* X30 increase biomass and reduce heavy metal accumulation of radish under field conditions. Ecotoxicol. Environ. Saf. 161: 526–533.
- Hänsch R., Mendel R.R. (2009) Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). Current Opinion in Plant Biology 12: 259–266.
- Hartley W., Lepp N.W., Edwards R. (2004) Arsenic and heavy metal mobility in iron oxide-amended contaminated soil evaluated by short and long-term leaching tests. Environ. Pollut. 131: 495–504.
- Hartley W., Lepp N.W. (2008) Remediation of arsenic contaminated soils by ironoxide application evaluated in terms of plant productivity, arsenic and phytotoxic metal uptake, Sci. Total. Environ. 390 (2008): 35–44.
- Hartley W., Dickinson N.M., Riby P., Leese E., Morton J., Lepp N.W. (2010) Arsenic mobility and speciation in a contaminated urban soil are affected by different methods of green waste compost application. Environ. Pollut. 158: 3560–3570.
- Hass A., Gonzalez J.M., Lima I.M., Godwin H.W., Halvorson J.J., Boyer D.G. (2012) Chicken manure biochar as liming and nutrient source for acid appalachian soil. J. Environ. Qual. 41: 1096–1106.
- Hattab N., Soubrand M., Guégan R., Motelica-Heino M., Bourrat X., Faure O., Bouchardon, J.L. (2014) Effect of organic amendments on the mobility of trace elements in phytoremediated techno-soils: role of the humic substances. Environmental Science and Pollution Research, 21(17): 10470–10480.
- Hazotte A.A., Peron O., Abdelouas A., Montavon G., Lebeau T. (2016) Microbial mobilization of cesium from illite: the role of organic acids and siderophores. Chemical Geology, 428: 8–14.
- He, M. (2007). Distribution and phytoavailability of antimony at an antimony mining and smelting area, Hunan, China. Environ. Geochem. Health. 29(3): 209-219.
- Henry H.F., Burken J.G., Maier R.M., Newman L.A., Rock S., Schnoor J.L., Suk W.A. (2013) Phytotechnologies: preventing exposures, improving public health. Int. J. Phytoremediation. 15: 889–899
- Hettiarachchi G.M., Pierzynski G.M., Ransom M.D. (2000) *In situ* stabilization of soil lead using phosphorus and manganese oxide, Environ. Sci. Technol. 34: 4614–4619.
- Hill K.A., Lion L.W., Ahner B.A. (2002) Reduced Cd accumulation in *Zea mays*: A protective role for
- Thèse Romain Nandillon – 2019
IDDEA – ISTO – LBLGC – BRGM

Références bibliographiques

- phytosiderophores? Environ. Sci. Technol. 36: 5363–5368.
- Hinsinger P. (1998) How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. Adv. Agron. 64: 225–265.
- Hinsinger P. (2001) Bioavailability of trace elements as related to root-induced chemical changes in the rhizosphere. in: Gobran, G.R., Wenzel, W.W., Lombi, E. (Eds.). Trace Elements in the Rhizosphere. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 25–41.
- Hodson M.E., Valsami-Jones É., Cotter-Howells J.D. (2000) Bone meal additions as a remediation treatment for metal contaminated soil, Environ. Sci. Technol. 34: 3501–3507.
- Hofmann T, Schuwirth N (2008) Zn and Pb release of sphalerite (ZnS)-bearing mine waste tailings. J. Soils Sediments. 8: 433–441.
- Holm, P.E., Rootzén, H., Borggaard, O.K., Moberg, J.P., Christensen, T.H., 2003. Correlation of cadmium distribution coefficients to soil characteristics. J. Environ. Qual. 32: 138–145.
- Hong C., Si Y., Xing Y., Li Y. (2015) Illumina MiSeq sequencing investigation on the contrasting soil bacterial community structures in different iron mining areas. Environ Sci Pollut Res. 22(14): 10788–10799.
- Hossain M., Strezov V., Chan K.Y., Ziolkowski A., Nelson P.F. (2011) Influence of pyrolysis temperature on production and nutrient properties of wastewater sludge biochar. J. Environ. Manag. 92: 223–228.
- Houben D., Pircar J., Sonnet P. (2012) Heavy metal immobilization by cost-effective amendments in a contaminated soil: effects on metal leaching and phytoavailability. J Geochem. Explor. 123: 87–94.
- Houben D., Evrard L., Sonnet P. (2013) Mobility, bioavailability and pH-dependent leaching of cadmium, zinc and lead in a contaminated soil amended with biochar. Chemosphere. 92: 1450–1457.
- Hu B (2012) Contribution des colloïdes à la mobilité des contaminants (Pb, As et Sb) : Etude spatio-temporelle in situ et test de lixiviation sur un anthroposol développé sur résidus miniers.
- Hu Y., Nan Z., Su J., Wang N. (2013) Heavy metal accumulation by poplar in calcareous soil with various degrees of multi-metal contamination: implications for phytoextraction and phytostabilization, Environ. Sci. Pollut. Res. 20: 7194–7203.
- Huang M., Zhu Y., Li Z., Huang B., Luo N., Liu C., Zeng G. (2016) Compost as a soil amendment to remediate heavy metal-contaminated agricultural soil: mechanisms, efficacy, problems, and strategies. Water, Air, & Soil Pollution, 227(10): 359.
- Idris R., Trifonova R., Puschenreiter M., Wenzel W.W., Sessitsch A. (2004) Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. Appl Environ Microbiol. 70: 2667–77.
- INERIS 2010 Arsenic et ses dérivés organiques
- INERIS 2010 Mercure et ses dérivés
- INERIS 2011 Sélénium et ses composés
- Intawongse M., Dean J.R. (2008). Use of the physiologically-based extraction test to assess the oral bioaccessibility of metals in vegetable plants grown in contaminated soil. Environ. Pollut. 152: 60–72.
- Inyang M.I., Gao B., Yao Y., Xue Y.W., Zimmerman A., Mosa A., Pullammanappallil P., Ok Y.S., Cao X.D. (2016) A review of biochar as a low-cost adsorbent for aqueous heavy metal removal. Crit. Rev. Env. Sci. Tec. 46(4): 406–433.
- IUSS (2014) World reference base for soil resources 2014 international soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. FAO, Rome.
- Jain A., Raven K.P., Loeppert R.H. (1999) Arsenite and arsenate adsorption on ferrihydrite: surface charge
- Thèse Romain Nandillon – 2019
- IDDEA – ISTO – LBLGC – BRGM

Références bibliographiques

- reduction and net OH release stoichiometry. *Environ. Sci. Tech.* 33: 1179–1184.
- Jain S., Baruah B.P., Khare P. (2014) Kinetic leaching of high sulphur mine rejects amended with biochar: buffering implication. *Ecol. Eng.* 71: 703–709.
- Jangorzo NS., Watteau F., Hajos D., Schwartz C. (2015) Nondestructive monitoring of the effect of biological activity on the pedogenesis of a Technosol. *J Soils Sediments.* 15: 1705–1715
- Jeffery S., Bezemer T.M., Cornelissen G., Kuiper T.W., Lehmann J., Mommer L., Van Groenigen J.W. (2015) The way forward in biochar research: targeting trade - offs between the potential wins. *Gcb Bioenergy.* 7(1): 1–13.
- Jiang J., Xu R., Jiang T., Li Z. (2012) Immobilization of Cu(II), Pb(II) and Cd(II) by the addition of rice straw derived biochar to a simulated polluted Ultisol. *J. Hazard. Mater.* 229–230: 145–150.
- Jin J.W., Li Y.A., Zhang J.Y., Wu S.C., Cao Y.C., Liang P., Zhang J., Wong M.H., Wang M.Y., Shan S.D., Christie P. (2016) Influence of pyrolysis temperature on properties and environmental safety of heavy metals in biochars derived from municipal sewage sludge. *J. Hazard. Mater.* 320: 417–426.
- Joe S.J., Suto K., Inoue C., Chida T. (2007) Isolation and characterization of acidophilic heterotrophic iron-oxidizing bacterium from enrichment culture obtained from acid mine drainage treatment plant. *J. Biosci. Bioeng.* 104: 117–123.
- Jones D.L., Rousk J., Edwards-Jones G., DeLuca T.H., Murphy D.V. (2012) Biochar-mediated changes in soil quality and plant growth in a three year field trial. *Soil Biol. Biochem.* 45: 112–124.
- Joussein E., Soubrand M., Wanat N. (2013) Fate and geochemical behavior of arsenic, antimony and lead from mining Technosols. *Geoderma.*
- Juhasz A.L., Weber J., Smith, E. (2011) Impact of soil particle size and bioaccessibility on children and adult lead exposure in peri-urban contaminated soils. *J. hazard. Mater.* 186(2-3): 1870-1879.
- Juste C (1995) Les micro-polluants métalliques dans les boues résiduelles des stations d'épuration urbaines. ADEME Editions, Paris.
- Katoh M., Kitahara W., Sato T. (2014) Sorption of lead in animal manure compost: contributions of inorganic and organic fractions. *Water, Air, & Soil Pollution.* 225(1): 1828.
- Kaymak H.C. (2011) Plant Growth and Health Promoting Bacteria, Plant Growth and Health Promoting Bacteria. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Khan S., Chao C., Waqas M., Arp H.P.H., Zhu Y.G. (2013) Sewage sludge biochar influence upon rice (*Oryza sativa* L.) yield, metal bioaccumulation and greenhouse gas emissions from acidic paddy soil. *Environ. Sci. Technol.* 47: 8624–8632.
- Kicińska, A., Smreczak, B., & Jadczyzyn, J. (2019). Soil Bioavailability of Cadmium, Lead, and Zinc in the Areas of Zn-Pb Ore Mining and Processing (Bukowno, Olkusz). *J. Ecol Eng.* 20(1): 84–92.
- Kidd P., Barceló J., Bernal M., Navari-Izzo F., Poschenrieder C., Shilev S., Clemente R., Monterroso, C. (2009) Trace element behaviour at the root-soil interface: implications in phytoremediation. *Environ. Exp. Bot.* 67: 243–259.
- Kim J.Y., Davis A. (2003) Stabilization of available arsenic in highly contaminated mine tailings using iron. *Environ. Sci. Technol.* 37: 189–195
- King R., Royle A., Putwain P. et Dickinson N. (2006) Changing contaminant mobility in a dredged canal sediment during a three-year phytoremediation trial. *Environ. Pollut* 143 (2): 318–326.
- King J.S., Ceulemans R., Albaugh J.M., Dillen S.Y., Domec J.C., Fichot R., Fischer M., Leggett Z., Sucre E., Trnka M., Zenone, T. (2013) The challenge of lignocellulosic bioenergy in a water-limited world. *BioScience*, 63(2) : 102–117.

Références bibliographiques

- Kinniburgh D.G., Milne C.J., Benedetti M.F., Pinheiro J.P., Filius J., Koopal L.K., Van Riemsdijk W.H. (1996) Metal ion binding by humic acid: application of the NICA-Donnan model. *Environ. Sci. Technol.* 30(5): 1687–1698.
- Kirk J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J.N., Lee H., Trevors J.T. (2004) Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Methods.* 58(2): 169–188.
- Kloss S., Zehetner F., Oburger E., Buecker J., Kitzler B., Wenzel W.W., Wimmer B., Soja G. (2014) Trace element concentrations in leachates and mustard plant tissue (*Sinapis alba* L.) after biochar application to temperate soils. *Sci. Total Environ.* 481: 498–508.
- Klöpffel L., Keiluweit M., Kleber M., Sander M. (2014) Redox Properties of Plant Biomass-Derived Black Carbon (Biochar). *Environ. Sci. Technol.* 48: 5601–5611.
- Knox A., Seaman J., Mench M., Vangronsveld J. (2001) Remediation of metal-and radionuclides-contaminated soils by *In situ* stabilization techniques, in: I.K. Iskandar (Ed.), *Environmental Restoration of Metals-Contaminated Soil*, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 21–61.
- Komárek M., Vaněk A., Ettler V. (2013) Chemical stabilization of metals and arsenic in contaminated soils using oxides: a review. *Environ. Pollut.* 172: 9–22.
- Korzeniowska J., Glubiak E.S., Igras J. (2011) Applicability of energy crops for metal phytostabilization of soils moderately contaminated with copper, nickel and zinc. *J. Food Agric. Environ.* 9: 693–697.
- Kouki, S., Saidi, N., M'hiri, F., Hafiane, A. (2015) A comparative study of nutrients, cadmium, and chromium bioremoval efficiencies of three emergent macrophytes from a metal-contaminated wastewater. *Clean Soil Air Water.* 43: 1531–1537.
- Kozhevnikova A.D., Erlikh N.T., Zhukovskaya N.V., Obroucheva N.V., Ivanov V.B., Belinskaya A.A., Khutoryanskaya M.Y., Seregin I.V. (2014) Nickel and zinc effects, accumulation and distribution in ruderal plants *Lepidium ruderalis* and *Capsella bursapastoris*. *Acta Physiol. Plant.* 36 : 3291–3305.
- Kraemer S. (2004). Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquat. Sci. - Res. Across Boundaries.* 66: 3–18.
- Kuffner M., Puschenreiter M., Wieshammer G., Gorfer M., Sessitsch A. (2008) Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant Soil.* 304(1-2): 35–44.
- Kuffner M., De Maria S., Puschenreiter M., Fallmann K., Wieshammer G., Gorfer M., Sessitsch A. (2010) Culturable bacteria from Zn - and Cd - accumulating *Salix caprea* with differential effects on plant growth and heavy metal availability. *J. Appl. Microbiol.* 108(4): 1471–1484.
- Kumpiene J., Ore S., Renella G., Mench M., Lagerkvist A., Maurice C. (2006) Assessment of zerovalent iron for stabilization of chromium, copper, and arsenic in soil. *Environ. Pollut.* 144: 62–69.
- Kumpiene J., Ore S., Lagerkvist A., Maurice C. (2007) Stabilization of Pb and Cu contaminated soil using coal fly ash and peat, *Environ. Pollut.* 145: 365–373.
- Kumpiene J., Lagerkvist A., Maurice C. (2008) Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments: a review. *Waste Manag.* 28: 215–225.
- Kumpiene J. (2010) Trace element immobilization in soil using amendments, in: P. Hooda (Ed.), *Trace Elements in Soils*, John Wiley and Sons Ltd., Wiltshire, UK, pp. 353–380.
- Kuppusamy S., Thavamani P., Megharaj M., Venkateswarlu K., Naidu R. (2016) Agronomic and remedial benefits and risks of applying biochar to soil: current knowledge and future research directions. *Environ. Int.* 87: 1–12.
- Labidia S., Firmina S., Verdina A., Bidard G., Laruelle F., Douay F., Shiralia P., Fontaine J., Lounès-Hadj Sahraoui A. (2017) Nature of fly ash amendments differently influences oxidative stress alleviation in

Références bibliographiques

- four forest tree species and metal trace element phytostabilization in aged contaminated soil: A long-term field experiment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 138: 190–198.
- Labrecque, M., Lajeunesse, S. L. (2017) GUIDE DE PRODUCTION DE SAULES EN CULTURE INTENSIVE SUR COURTES ROTATIONS.
- Labronici Bertin R., Maltez H.F., Santos de Gois J., Borges D.L.G., da Silva Campelo Borges G., Valdemiro Gonzaga L., Fett R. (2016) Mineral composition and bioaccessibility in *Sarcocornia ambigua* using ICP-MS J. Food. Compost. Anal. 47: 45–51
- Lage-Pinto F., Oliveira J.G., Da Cunha M., Souza C.M., Rezende C.E., Azevedo R.A., Vitória A.P. (2008) Chlorophyll a fluorescence and ultrastructural changes in chloroplast of water hyacinth as indicators of environmental stress. *Environ. Exp. Bot.* 64(3): 307–313.
- Laghlimi M., Baghdad B., Hadi H.E., Bouabdli A. (2015) Phytoremediation mechanisms of heavy metal contaminated soils: a review. *J. Ecol.* 5: 375–388.
- Laissus R. (1981) Determination of nitrogen fertilization of pastures in order to use potentialities of white clover (*Trifolium repens*; dry matter yield, atmospheric nitrogen fixation; France). *Comptes Rendus des Seances de l'Academie d'Agriculture de France*.
- Lambot F. (2011). Le saule dans le genie vegetal : maintien des berges et talus. *Forêt Wallonne* 112: 29–35.
- Lambrechts T., Gustot Q., Couder E., Houben D., Iserentant A., Lutts S. (2011) Comparison of EDTA-enhanced phytoextraction and phytostabilisation strategies with *Lolium perenne* on a heavy metal contaminated soil, *Chemosphere*. 85: 1290–1298.
- Lamy. (2006) Les Interactions Matières Organiques du Sol – Eléments Traces Métalliques : Enjeux Scientifiques et Environnementaux. Mémoire Habilitation à Diriger des Recherches. Université de Poitiers.
- Laperche V., Bodéan F., Dictor M., Barabger P. (2003) Guide méthodologique de l'arsenic appliqué à la gestion des sites et des sols pollués.
- Larios R., Fernandez-Martinez R., Silva V., Rucandio I. (2013) Chemical availability of arsenic and heavy metals in sediments from abandoned cinnabar mine tailings. *environ earth science*, 68, pp.
- Lasat M.M. (2002) Phytoremediation of toxic metals: a review of biological mechanisms. *J Environ. Qual.* 31: 109–120.
- Lebeau, T., Braud, A., & Jézéquel, K. (2008). Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: a review. *Environ. Pollut.* 153(3): 497–522.
- Lebrun M., Macri C., Miard F., Hattab-Hambli N., Motelica-Heino M., Morabito D., Bourgerie S. (2017) Effect of biochar amendments on As and Pb mobility and phytoavailability in contaminated mine technosols phytoremediated by *Salix*. *J. Geochem. Explor.* 182: 149–156.
- Lebrun M., Miard F., Hattab-Hambli N., Bourgerie S., Morabito D. (2018a) Assisted phytoremediation of a multi-contaminated industrial soil using biochar and garden soil amendments associated with *Salix alba* or *Salix viminalis*: abilities to stabilize As, Pb and Cu. *Water air soil pollut.* 229: 163.
- Lebrun M., Miard F., Nandillon R., Léger J.C., Hattab-Hambli N., Scippa G.S., Bourgerie S., Morabito D. (2018b) Assisted phytostabilization of a multicontaminated mine technosol using biochar amendment: early stage evaluation of biochar feedstock and particle size effects on As and Pb accumulation of two Salicaceae species (*Salix viminalis* and *Populus euramericana*). *Chemosphere*. 194 : 316–326.
- Lebrun, M., Miard, F., Renouard, S., Nandillon, R., Scippa, G. S., Morabito, D., & Bourgerie, S. (2018c). Effect of Fe-functionalized biochar on toxicity of a technosol contaminated by Pb and As: sorption and phytotoxicity tests. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(33), 33678-33690.
- Lee Y., Park J., Ryu C., Gang K.S., Yang W., Park Y.K., Jung J., Hyun S. (2013) Comparison of biochar properties from biomass residues produced by slow pyrolysis at 500°C. *Bioresour. Tech.* 148: 196–201.

Références bibliographiques

- Lee S.H., Ji W.H., Lee W.S., Koo N., Koh I.H., Kim M.S., Park J.S. (2014). Influence of amendments and aided phytostabilization on metal availability and mobility in Pb/Zn mine tailings. *J. Environ. Manage.* 139: 15–21.
- Legifrance: https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2012/3/26/DEVP1208907A/jo/article_35
- Lefèvre R. (2015) Matière organique stable du sol : dynamique et mécanismes de (dé)stabilisation. Thèse de l'université Pierre et Marie Curie.
- Le Forestier L., Motelica-Heino M., Le Coustumer P., Mench M. (2015) Phytostabilisation of a copper contaminated topsoil aided by basic slags: assessment of Cu mobility and phytoavailability. *J Soils Sediments*. 17: 1262–1271.
- Lehmann J., Rillig M.C., Thies, J., Masiello C.A., Kockaday W.C., Crowley D. (2011) Biochar effects on soil biota – a review. *Soil Biol. Biochem.* 43: 1812–1836.
- Lengke M.F., Sanpawanitchakit C., Tempel R.N. (2009) The oxidation and dissolution of arsenic-bearing sulfides. *Can Mineral* 47: 593–613.
- Leupin O.X., Hug S.J. (2005) Oxidation and removal of arsenic (III) from aerated groundwater by filtration through sand and zero-valent iron. *Water Res.* 39: 1729–1740.
- Li L., Tilman D., Lambers H., Zhang F.S. (2014a) Plant diversity and overyielding: insights from belowground facilitation of intercropping in agriculture. *New Phytol.* 203: 63–69.
- Li Q., Ji H., Qin F., (2014b) Sources and the distribution of heavy metals in the particle size of soil polluted by gold mining upstream of Miyun Reservoir, Beijing: implications for assessing the potential risks. *Environ Monit Assess.* 186: 6605–6626.
- Li X., Bond P.L., Van Nostrand J.D., Zhou J., Huang L. (2015) From lithotroph- to organotroph-dominant: directional shift of microbial community in sulphidic tailings during phytostabilization. *Sci. Rep.* 5, 12978.
- Li H., Dong X., da Silva E.B., de Oliveira L.M., Chen Y., Ma L.Q. (2017) Mechanisms of metal sorption by biochars: biochar characteristics and modifications. *Chemosphere.* 178: 466–478.
- Li, X., Wang, X., Chen, Y., Yang, X., & Cui, Z. (2019). Optimization of combined phytoremediation for heavy metal contaminated mine tailings by a field-scale orthogonal experiment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 168: 1–8.
- Lima I.M., Boateng A.A. Klasson K.T. (2009) Pyrolysis of Broiler Manure: Char and Product Gas Characterization The mention of firm names or trade products does not imply that they are endorsed or recommended by the U.S. Department of Agriculture over other firms or similar products not mentioned. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48: 1292–1297.
- Lin Y., Munroe P., Joseph S., Henderson R. (2012) Migration of dissolved organic carbon in biochars and biochar-mineral complexes. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira.* 47(5): 677–686.
- Liu C., Huang P.M. (2003) Kinetics of lead adsorption by iron oxides formed under the influence of citrate. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67(5): 1045–1054.
- Liu R., Zhao D. (2007) Reducing leachability and bioaccessibility of lead in soils using a new class of stabilized iron phosphate nanoparticles. *Water Res.* 41 : 2491–2502
- Liu S., Yang C., Xie W., Xia C., Fan P. (2012). The Effects of Cadmium on Germination and Seedling Growth of *Suaeda salsa*. *Procedia Environ. Sci.* 16: 293–298.
- Liu X., Zhang A., Ji C., Joseph S., Bian R., Li L., Pan G., Paz-Ferreiro J. (2013) Biochar's effect on crop productivity and the dependence on experimental conditions—a meta-analysis of literature data. *Plant Soil* 37: 583–594.
- Liu J., Wang H., Chen H., Liao X., Xiao S., Zhang T. (2014) Difference of lead distribution between different
- Thèse Romain Nandillon – 2019
- IDDEA – ISTO – LBLGC – BRGM

Références bibliographiques

- parts of tobacco leaf. *Tob. Sci. Technol.* 3: 82–84.
- Liu Y.N., Guo Z.H., Xiao X.Y., Wang S., Jiang Z.C., Zeng P. (2017) Phytostabilisation potential of giant reed for metals contaminated soil modified with complex organic fertiliser and fly ash: A field experiment *Science of the Total Environment* 576: 292–302.
- Liu C., Lin H., Dong Y., Li B., Liu, Y. (2018) Investigation on microbial community in remediation of lead-contaminated soil by *Trifolium repens* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 165: 52–60.
- Lombi, E., Zhao, F.J., Zhang, G.Y., Sun, B., Fitz, W., Zhang, H., McGrath, S.P., 2002. *In situ* fixation of metals in soils using bauxite residue: chemical assessment. *Environ. Pollut.* 118: 435–443.
- Lone M.I., He Z.L., Stoffella P.J., Yang X. (2008) Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: progress and perspectives. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 9: 210–220.
- Lopareva-Pohu A., Verdin A., Garçon G., Sahraoui ALH., Pourrut B., Debiante D., Waterlot C., Laruelle F., Bidar G., Douay F., Shirali P. (2011) Influence of fly ash aided phytostabilisation of Pb, Cd and Zn highly contaminated soils on *Lolium perenne* and *Trifolium repens* metal transfer and physiological stress. *Environ Pollut* 159: 1721–1729.
- Lu P., Nuhfer N.T., Kelly S., Li Q., Konishi H., Elswick E., Zhu C. (2011) Lead coprecipitation with iron oxyhydroxide nano-particles. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 75(16): 4547–4561.
- Lu W., Ding W. Zhang J., Li Y., Luo J., Bolen N., Xie Z. (2014) Biochar suppressed the decomposition of organic carbon in a cultivated sandy loam soil: a negative priming effect. *Soil Biol. Biochem.* 76: 12–21.
- Lu Q., Li J., Chen F., Liao M., Lin L., Tang Y., Liang D., Xia H., Yunsong Lai Y., Wang X., Chen C., Ren W. (2017) Effects of mutual intercropping on the cadmium accumulation in accumulator plants *Stellaria media*, *Malachium aquaticum*, and *Galium aparine*. *Environ. Monit. Assess.* 189: 622.
- Luo, Q., Sun L., Hu X., Zhou R. (2014) The variation of root exudates from the hyperaccumulator *Sedum alfredii* under cadmium stress: metabolomics analysis. *PLoS ONE* 9, e115581.
- Luo J., Qi S., Gu X.W.S., Hou T., Lin L. (2016) Ecological risk assessment of EDTA-assisted phytoremediation of Cd under different cultivation systems, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 96: 259–264.
- Luo, L., Qi, S., Peng, L., Xie, X. (2017) Enhanced phytoremediation capacity of a mixed-species plantation of *Eucalyptus globulus* and Chickpeas. *J. Geochem. Explor.* 182: 201–205.
- Ma Y., Lin C. (2012). Arsenate immobilization associated with microbial oxidation of ferrous ion in complex acid sulfate water. *Journal of hazardous materials*, 217: 238–245.
- Ma Y., Rajkumar M., Zhang C., Freitas H. (2016) Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *J. Environ. Manage.* 174: 14–25.
- Machado I, Cesio M.V., Pistón M. (2017) In vitro bioaccessibility study of As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb and Zn from raw edible artichoke heads (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*). *Microchemical J.* 133: 663–668.
- Maestrini B., Nannipieri P. Abiven S. (2014) A meta-analysis on pyrogenic organic matter induced priming effect. *GCB Bioenergy.* 7(4): 577–590.
- Majone M., Petrangeli Papini M., Rolle E. (1996) Modeling Lead adsorption on clays by models with and without electrostatic terms, *The Journal of Colloid and Interface Science*, 179, pp. 412–425.
- Malá J., Cvrčková H., Máchová P., Dostál J., Šíma P. (2010) Heavy metal accumulation by willow clones in short-time hydroponics. *Journal of Forest Science*, 56(1): 28–34.
- Margesin R. (2004) Bioremediation of petroleum TPHs-polluted soils in extreme temperature environments. *Soil. Biol.* 1: 215–226.
- Marks E., Alcañiz J., Domene X. (2014) Unintended effects of biochars on shortterm plant growth in a calcareous soil. *Plant Soil.* 385: 87–105.

Références bibliographiques

- Marques A.P.G.C., Oliveira R.S., Rangel A.O.S.S., Castro P.M.L. (2008) Application of manure and compost to contaminated soils and its effect on zinc accumulation by *Solanum nigrum* inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Environ. Pollut.* 151: 608–620.
- Marques A.P.G.C., Rangel A.O.S.S., Castro P.M.L. (2009) Remediation of heavy metal contaminated soils: Phytoremediation as a potentially promising clean-up technology. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 39: 622–654.
- Martin T.A., Ruby M.V. (2003) *In situ* remediation of arsenic in contaminated soils. *Remediat J.* 14: 21–31
- Martinez C.E., McBride M.B. (1998) Solubility of Cd²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺, and Zn²⁺ in aged coprecipitates with amorphous iron hydroxides. *Environmental Science & Technology*, 32, pp.743–748.
- Marmioli M., Pietrini F., Maestri E. (2011) Growth, physiological and molecular traits in *Salicaceae* trees investigated for phytoremediation of heavy metals and organics. *Tree Physiology*. 31 (12): 1319–1334.
- Masue Y., Loeppert R.H., Kramer T.A. (2007) Arsenate and arsenite adsorption and desorption behavior on coprecipitated aluminum: iron hydroxides. *Environ. Sci. Technol.* 41(3): 837–842.
- McCann C.M., Gray N.D., Tournay J., Daveport R.J., Wade M., Finlay N., Hudson- Edwards K.A., Johnson K.L. (2015) Remediation of a historically Pb contaminated soil using a model natural Mn oxide waste. *Chemosphere*. 138: 211–217
- McCann C.M., Peacock C.L., Hudson-Edwards K.A., Shrimpton T., Gray ND., Johnson K.L. (2018) *In situ* arsenic oxidation and sorption by a Fe-Mn binary oxide waste in soil. *J. Hazard. Mater.* 342: 724–731.
- Meeinkuirt W., Kruatrachue M., Tanhan P., Chaiyarat R., Pokethitiyook P. (2013) Phytostabilization potential of Pb mine tailings by two grass species, *Thysanolaena maxima* and *Vetiveria zizanioides*, *Water Air Soil Pollut.* 224, <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-013-1750-7>, Article 1750, 12pages.
- Meeinkuirt W., Kruatrachue M., Pichtel J., Phusantisampan T., Saengwilai P. (2016) Influence of organic amendments on phytostabilization of Cd-contaminated soil by *Eucalyptus camaldulensis*, *Sci. Asia* 42: 83–91.
- Meers E., Van Slycken S., Adriaensen K., Ruttens A., Vangronsveld J., Du Laing G., Tack, F. M.G. (2010) The use of bio-energy crops (*Zea mays*) for ‘phytoattenuation’ of heavy metals on moderately contaminated soils: a field experiment. *Chemosphere*. 78(1): 35–41.
- Mench M., Vangronsveld J., Lepp N., Edwards R. (1998) Physico-chemical aspects and efficiency of trace element immobilization by soil amendments. In: Vangronsveld, J., Cunningham, S. (Eds.), *In-situ Inactivation and Phytoremediation of Metal Contaminated Soils*. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, pp. 151–182
- Mench M., Manceau A., Vangronsveld J., Clijsters H., Mocquot B. (2000) Capacity of soil amendments in lowering the phytoavailability of sludge-borne zinc. *Agron.* 20: 383–397.
- Mench M., Bussière S., Boisson J., Castaing E., Vangronsveld J., Ruttens A., De Koe T., Bleeker P., Assunção A., Manceau A. (2003) Progress in remediation and revegetation of the barren Jales gold mine spoil after *In situ* treatments. *Plant Soil* 249 : 187–202.
- Mench M., Vangronsveld J., Beckx C., Ruttens A. (2006) Progress in assisted natural remediation of an arsenic contaminated agricultural soil. *Environ. Pollut.* 144: 51–61.
- Mench M., Lepp N., Bert V., Schwitzguébel J.P., Gawronski S.W., Schöder P., Vangronsveld J. (2010) Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *J. Soils Sediments*. 10 : 1039–1070.
- Mench 2017 Phytomanagement de sols contaminés et/ou dégradés : de la sélection des assemblages plantes-microorganismes aux processus et fonctions écologiques sources de services écosystémiques Réseau des écotoxicologues de l’INRA Fiche thématique N°9 - juin 2017

Références bibliographiques

- Mendoza C.J., Garrido R.T., Quilodrán R.C., Segovia C.M., Parada A.P. (2017) Evaluation of the bioaccessible gastric and intestinal fractions of heavy metals in contaminated soils by means of a simple bioaccessibility extraction test. *Chemosphere*. 176: 81–88
- Mendoza-Cózatl D.G., Moreno-Sanchez R. (2005). Cd²⁺ transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1706: 88–97.
- Merrington G., Alloway B.J. (1994) The transfer and fate of Cd, Cu, Pb and Zn from two historic metalliferous mine sites in the U.K. *Appl Geochem*. 9: 677–687.
- Mertens J., Van Nevel L., De Schrijver A. (2007) Tree species effect on the redistribution of soil metals. *Environ. Pollut.* 149 (2): 173–181.
- Migeon A., Richaud P., Guinet F. (2009) Metal Accumulation by Woody Species on Contaminated Sites in the North of France. *Water Air Soil Pollut.* 204 (1-4): 89–101.
- Miretzky P., Fernandez Cirelli A. (2010) Remediation of arsenic-contaminated soils by iron amendments: a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 40: 93–115.
- Mitchell P. and Barr D. (1995) - The nature and significance of public exposure to arsenic: a review of its relevance to South West England. *Environ. Geochem. Health*. 17: 57-82.
- Mleczek M., Rutkowski P., Rissmann I. (2010) Biomass productivity and phytoremediation potential of *Salix alba* and *Salix viminalis*. *Biomass Bioenergy*. 34 (9): 1410–1418.
- Molnár M., Vaszi E., Farkas E., Ujaczki E., Fekete-Kertész I., Tolner H., Kleberez O., Kirchkeszner C., Gruiz K., Uzinger N., Feigl V. (2016) Acidic sandy soil improvement with biochar – a microcosm study. *Sci. Total Environ.* 563–564: 855–865.
- Moon D.H., Dermatas D., Menounou N. (2004) Arsenic immobilization by calcium–arsenic precipitates in lime treated soils, *Sci. Total Environ.* 330: 171–185.
- Morel J.L., Chenu C., Lorenz K. (2014) Ecosystem services provided by soils of urban, industrial, traffic, mining, and military areas (SUITMAs). *J Soils Sediments*.
- Moreno-Jiménez E., Clemente R., Mestrot A., Meharg A.A. (2013) Arsenic and selenium mobilisation from organic matter treated mine spoil with and without inorganic fertilisation. *Environ. Pollut.* 173: 238–244.
- Mulle J.B., Ramos D.T., Larose C., Fernandes M., Lazzarin H.S.C., Vogel T.M., Corseuil H.X. (2017) Combined iron and sulfate reduction biostimulation as a novel approach to enhance BTEX and PAH source-zone biodegradation in biodiesel blend-contaminated groundwater. *J. Hazard. Mater.* 326: 229–236.
- Nagajyoti P., Lee K., Sreekanth T. (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ. Chem. Lett.* 8: 199–216.
- Namgay T., Singh B., Singh B.P. (2010) Influence of biochar application to soil on the availability of As, Cd, Cu, Pb, and Zn to maize (*Zea mays L.*). *Soil Research* 48: 638–647.
- Narendrula-Kotha R., Nkongolo K.K. (2017) Bacterial and fungal community structure and diversity in a mining region under long-term metal exposure revealed by metagenomics sequencing. *Ecol Genet Genom.* 2: 13–24.
- Ndayiragije, S., Delvaux, B., 2003. Coexistence of allophane, gibbsite, kaolinite and hydroxy-Al-interlayered 2:1 clay minerals in a perudic Andosol. *Geoderma* 117, 203–214. doi:10.1016/S0016-7061(03)00123-X
- Néel C., Bril H., Courtin-Nomade A., Dutreuil JP. (2003) Factors affecting natural development of soil on 35-year-old sulphide-rich mine tailings. *Geoderma*. 111: 1–20.
- Nejeschlebová L., Sracek O., Mihaljevič M., Ettler V., Kříbek B., Kněsl I., Vaněk A., Penížek V., Dolníček Z., Mapani B. (2015) Geochemistry and potential environmental impact of the mine tailings at Rosh Pinah, southern Namibia. *J. Afr. Earth Sci.* 105: 17–28.

Références bibliographiques

- Nguyen B.T., Lehmann J., Hockaday W.C., Joseph S., Masiello C.A. (2010) Temperature sensitivity of black carbon decomposition and oxidation. *Environ. Sci. Technol.* 44: 3324–3331.
- Nitzsche K.S., Weigold P., Lösekann-Behrens T., Kappler A., Behrens S. (2015) Microbial community composition of a household sand filter used for arsenic, iron, and manganese removal from groundwater in Vietnam. *Chemosphere* 138, 47–59.
- Nordstrom D. K. (2009) Acid rock drainage and climate change. *Journal of Geochemical Exploration* 100, Issues 2–3: 97–104.
- Nordstrom D. K. (2009) Acid rock drainage and climate change. *J. Geochem. Explor.* 100, Issues 2–3: 97–104.
- Norme iso: international organization for standardization (2008). soil quality — avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour — part 1: test with earthworms (*eisenia fetida* and *eisenia andrei*). iso 17512-1.
- Nye P.H. (1981) Changes of pH across the rhizosphere induced by roots. *Plant Soil* 61 : 7–26.
- Obbard J.P., Jones K.C. (2001) Measurement of symbiotic nitrogen-fixation in leguminous host-plants grown in heavy metal-contaminated soils amended with sewage sludge. *Environ. Pollut.* 111: 311–320.
- O'Day P.A., Vlassopoulos D. (2010). Mineral-Based Amendments for Remediation. *Elements (Que)* 6(6) : 375–381
- Oliveira, F. R., Patel, A. K., Jaisi, D. P., Adhikari, S., Lu, H., & Khanal, S. K. (2017). Environmental application of biochar: Current status and perspectives. *Bioresour. Technol.* 246: 110–122.
- Orchard C., León-Lobos P., Ginocchio R. (2009) Phytostabilization of massive mine wastes with native phytogenetic resources: potential for sustainable use and conservation of the native flora in north-central Chile. *Ciencia e investigación agraria* 36: 329–352.
- Oste .L.A., Temminghoff E.J.M., Van Riemsdijk W.H. (2002) Solid-solution partitioning of organic matter in soils as influenced by an increase in pH or Ca concentration. *Environ. Sci. Technol.* 36: 208–214.
- Pais I., Benton J. (2000) The handbook of Trace Elements. Boca Raton, FL, St. Lucie Press pp.223.
- Pandey V., Patel A., Patra, D.D. (2016). Biochar ameliorates crop productivity, soil fertility, essential oil yield and aroma profiling in basil (*Ocimum basilicum L.*). *Ecol. Eng.* 90: 361–366.
- Paradelo R., Barral, M.T. (2012) Evaluation of the potential capacity as biosorbents of two MSW composts with different Cu, Pb and Zn concentrations. *Bioresour. Technol.* 104: 810–813.
- Pardo T., Martínez-Fernández D., Clemente R., Walker D.J., Bernal M.P. (2014) The use of olive-mill waste compost to promote the plant vegetation cover in trace-element-contaminated soil, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21: 1029–1038.
- Pardo, J., Mondaca, P., Celis-Diez, J. L., Ginocchio, R., Navarro-Villarroel, C., & Neaman, A. (2018). Assessment of revegetation of an acidic metal (loid)-polluted soils six years after the incorporation of lime with and without compost. *Geoderma*. 331: 81–86.
- Park J.H., Choppala G.K., Bolan N.S., Chung J.W., Chuasavathi T. (2011) Biochar reduces the bioavailability and phytotoxicity of heavy metals. *Plant Soil*. 348: 439–451.
- Parraga-Aguado I., González-Alcaraz M.N., Schulin R., Conesa H.M. (2015) The potential use of *Piptatherum miliaceum* for the phytomanagement of mine tailings in semiarid areas: Role of soil fertility and plant competition. *J. Environ. Manage.* 158: 74–84.
- Parrotta L., Guerriero G., Sergeant K., Cai G., Hausman J.F. (2015) Target or barrier? The cell wall of early- and later-diverging plants vs cadmium toxicity: differences in the response mechanisms. *Frontiers in plant science*. 6: 133.
- Pascaud G., Leveque T., Soubrand M., Boussen S., Joussein E., Dumat C. (2014) Environmental and health risk assessment of Pb, Zn, As and Sb in soccer field soils and sediments from mine tailings: solid speciation
- Thèse Romain Nandillon – 2019
- IDDEA – ISTO – LBLGC – BRGM

Références bibliographiques

- and bioaccessibility. Environ. Sci. Pollut. Res. 21: 4254–4264.
- Pascaud G., Boussen S., Soubrand M., Joussein E., Fondanèche P., Abdeljaouad S., Bril H. (2015) Particulate transport and risk assessment of Cd, Pb and Zn in a Wadi contaminated by runoff from mining wastes in a carbonated semi-arid context. J. Geochem. Explor. 152 : 27–36.
- Pascaud G. (2015). Etude des processus pédogénétiques de technosols miniers: De l'analogie naturel à la stratégie de remédiation Thèse Université de Limoges.
- Pearson M.S., Maenpaa K., Pierzynski G.M., Lydy M.J. (2000) Effects of soil amendment on the bioavailability of lead, zinc and cadmium to earthworms, J. Environ. Qual. 29: 1611–1617.
- Pejman A., Bidhendi G.N., Ardestani M., Saeedi M., Baghvand A. (2017) Fractionation of heavy metals in sediments and assessment of their availability risk: A case study in the northwestern of Persian Gulf. Marine pollution bulletin. 114(2): 881-887.
- Pelfrène A., Kleckerová A., Pourrut B., Nsanganwimana F., Douay F., Waterlot C. (2015) Effect of Miscanthus cultivation on metal fractionation and human bioaccessibility in metal-contaminated soils: comparison between greenhouse and field experiments. Environ Sci Pollut Res Int. 22(4): 3043–3054.
- Pereira L.B., Vicentini R., Ottoboni, L.M. (2015) Characterization of the core microbiota of the drainage and surrounding soil of a Brazilian copper mine. Genet. Mol. Boil. 38(4): 484–489.
- Pérez-Cid B, Lavilla I, Bendicho C (1998) Speeding up of a three-stage sequential extraction method for metal speciation using focused ultrasound. Anal Chim Acta. 360: 35–41.
- Pérez-de-Mora A., Ortega-Calvo J.J., Cabrera F., Madejon E. (2005) Changes in enzyme activities and microbial biomass after “*In situ*” remediation of heavy metal-contaminated soil. Appl. Soil Ecol. 28: 125–137.
- Pérez-Esteban J., Escolaso C., Moliner A., Masaguer A., Ruiz-Fernandez J. (2014) Phytostabilization of metals in mine soils using *Brassica juncea* in combination with organic amendments. Plant Soil. 377: 97–109.
- Pérez-López R., Álvarez-Valero A.M., Nieto J.M., Sáez R., Matos J.X. (2008) Use of sequential extraction procedure for assessing the environmental impact at regional scale of the São Domingos Mine (Iberian Pyrite Belt). Appl. Geochem. 23: 3452–3463.
- Pietikäinen J., Kiikkilä O., Fritze H. (2000) Charcoal as a habitat for microbes and its effect on the microbial community of the underlying humus. Oikos. 89: 231-242.
- Pietrosanti L., Pietrini F., Zacchini M. (2009). Phytoremediation of a metal contaminated industrial soil of Porto Margheba by a short rotation forestry stand. Proceedings of the 11th International Conference on Environmental Science and Technology Chania, Crete, Greece, 3 – 5 September 2009.
- Pini R., Pedron F., Petruzzelli G., Scatena M., Guidi G.V. (2009) Modifications of the structural characteristics of new soil forming on industrial waste colonized by woody plants. Geoderma 149: 373–378.
- Pilon-Smits, E., 2005. Phytoremediation. Annual review of Plant Biology 56: 15–39.
- Piracha M.A., Ashraf, M., Shahzad, S.M., Siddiqui, A.R., Nazeer, S. (2016) Arsenic behavior in different textured soils amended with phosphate rock and farm yard manure. J. Environ. Agric. 1: 55–67.
- Pitten F., Muller G., König P., Schmidt D., Thurow K. and Kramer A. (1999) – Risk assessment of a former base contaminated with organoarsenic-based agents: uptake of arsenic by terrestrial plants. Sci. Total. Environ. 226: 237–245.
- Placek A., Grobelak A., Kacprzak M. (2016) Improving the phytoremediation of heavy metals contaminated soil by use of sewage sludge, Int. J. Phytoremediation 18: 605–618.
- Porter S.K., Scheckel K.G., Impellitteri C.A., Ryan J.A. (2004) Toxic metals in the environment: thermodynamic considerations for possible immobilization strategies for Pb, Cd, As, and Hg, Crit. Rev. Environ Sci. Technol. 34: 495–604.

Références bibliographiques

- Pourrut B., Shahid M., Dumat C., Winterton P., Pinelli F. (2011) Eric lead uptake, Toxicity, and detoxification in plants. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 213: 113–136.
- Prado R.M, Fernandes F.M, Natale W (2003) Residual effect on calcium silicate slag as soil acidity corrective in sugar cane ratoon. *Revista Brasileira De Ciencia Do Solo* 27(2): 287–296.
- Puga A.P., Abreu C.A., Melo L.C.A., Beesley L. (2015) Biochar application to a contaminated soil reduces the availability and plant uptake of zinc, lead and cadmium. *J. Environ. Manag.* 159: 86–93.
- Pukalchik, M., Mercl, F., Panova, M., Břendová, K., Terekhova, V. A., & Tlustoš, P. (2017). The improvement of multi-contaminated sandy loam soil chemical and biological properties by the biochar, wood ash, and humic substances amendments. *Environ. pollut.* 229: 516–524.
- Purdy J.J., Smart L.B. (2008) Hydroponic screening of shrub willow (*Salix spp.*) for arsenic tolerance and uptake. *International journal of phytoremediation*, 10(6): 515–528.
- Qasim. (2015) Détermination, spéciation et biodisponibilité des éléments traces métalliques dans les sols contaminés et technosols. Thèse Université d'Orléans.
- Qasim B., Motelica-Heino M., Joussein E., Soubrand S., Gauthier A. (2015) Potentially toxic element phytoavailability assessment in Technosols from former smelting and mining areas. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22: 5961–5974.
- Rahman, M.A., Hasegawa, H., Ueda, K., Maki, T., Rahman, M.M. (2008). Arsenic uptake by aquatic macrophyte *Spirodela polyrhiza* L.: Interactions with phosphate and iron. *Journal of hazardous materials*, 160(2-3): 356–361.
- Rajkumar M., Sandhya S., Prasad M.N., Freitas H. (2012). Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances* 30 (6): 1562–74.
- RECORD : Dabin A., Guignonnet-Sergent A., Algros E., Charissou AM. (2012) Biodisponibilité et bioaccessibilité des polluants dans le cas des sols pollués. Etat des connaissances et pistes de recherche. record, étude n° 10-0671/1a, 260p.
- Redman A.D., Macalady D., Ahmann D. (2002) Natural organic matter affects arsenic speciation and sorption onto hematite, *Environ. Sci. Technol.* 36: 2889–2896.
- Rees F. (2014). Mobilité des métaux dans les systèmes sol-plante-biochar. Thèse Université de Lorraine.
- Reichard P.U., Kraemer S.M., Frazier S.W., Kretzschmar R. (2005). Goethite dissolution in the presence of phytosiderophores: Rates, mechanisms, and the synergistic effect of oxalate. *Plant Soil* 276 : 115-132.
- Reichard P.U., Kretzschmar R., Kraemer S.M. (2007) Dissolution mechanisms of goethite in the presence of siderophores and organic acids. *Geochim Cosmochim Acta* 71: 5635–5650.
- Reis M.P., Dias M.F., Costa P.S., Avila M.P., Leite L.R., de Araújo F.M.G., Salim A.C.M., Bucciarelli-Rodriguez M., Oliveira G., Chartone-Souza E., Nascimento A.M.A. (2016) Metagenomic signatures of a tropical mining impacted stream reveal complex microbial and metabolic networks. *Chemosphere* 161: 266–273.
- Remon E., (2006) Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques: vers de nouvelles méthodes de bio-dépollution. Thèse. Université Jean Monnet Faculté des Sciences et Techniques.
- Rengel Z. (2015) Availability of Mn, Zn and Fe in the rhizosphere. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 15 : 397–404.
- Reubens B., Poesen J., Danjon F., Geudens G., Muys B. (2007) The role of fine and coarse roots in shallow slope stability and soil erosion control with a focus on root system architecture: a review. *Trees-Struct. Funct.* 21: 385–402.
- Robert M. (1996) Le sol : Interface dans l'environnement, ressource pour le développement. Paris : Masson. 244 p.
- Thèse Romain Nandillon – 2019
- IDDEA – ISTO – LBLGC – BRGM

Références bibliographiques

- Römheld V., Müller C., Marschner H. (1984) Localization and capacity of proton pumps in roots of intact sunflower plants. *Plant Physiology*, 76(3): 603–606.
- Rondon M.A., Lehmann J., Ramirez J., Hurtado M. (2007) Biological nitrogen fixation by common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) increases with biochar additions. *Biol. Fert. Soils* 43: 699–708.
- Rosenzweig N., Bradeen J.M., Tu Z.J., McKay S.J., Kinkel L.L. (2013) Rhizosphere bacterial communities associated with long-lived perennial prairie plants vary in diversity, composition, and structure. *Canadian J. Microbiol.* 59(7): 494–502.
- Roussel C., Néel C., Bril H. (2000) Minerals controlling arsenic and lead solubility in an abandoned gold mine tailings. *Sci. Total Environ.* 263: 209–219.
- Ruby M.V., Davis A., Schof R., Eberle S., Sellstone C.M. (1996) Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test. *Environ. Sci. Technol.* 30(2): 422–430.
- Ruttens A., Colpaert J.V., Mench M., Boisson J., Carleer R., Vangronsveld J. (2006) Phytostabilization of a metal contaminated sandy soil. II: influence of compost and/or inorganic metal immobilizing soil amendments on metal leaching. *Environ. Pollut.* 144: 533–539.
- Ruttens A., Boulet J., Weyens N., Smeets K., Adriaensen K., Meers E., Van Slycken S., Tack F., Meiresonne L., Thewys T., Witters N., Carleer R., Dupae J., Vangronsveld J. (2011) Short rotation coppice culture of willows and poplars as energy crops on metal contaminated agricultural soils. *International journal of phytoremediation*, 13(sup1) : 194–207.
- Sabourault P., Cottard F., Gentil P., Pidon A., Roger G. (2015) Mise en sécurité du site de résidus de traitement de minerai de plomb argentifère - district de Pontgibaud (63) - Secteur de Roure - Les Rosiers - Dossier de demande d'autorisation au titre de l'article L. 214-3 du code de l'environnement. 98 p., 82 ill., 7 ann.
- Salam, M.M.A., Kaipiainen, E., Mohsin, M., Villa, A., Kuittinen, S., Pulkkinen, P., Pelkonen, P., Mehtätalo, L., Pappinen, A., 2016. Effects of contaminated soil on the growth performance of young *Salix* (*Salix schwerinii* E. L. Wolf) and the potential for phytoremediation of heavy metals. *J. Environm. Manag.* 183: 467–477.
- Samsuri, A.W., Sadegh-Zadeh, F., Seh-Bardan, B.J. (2013) Sorption of As(III) and As(V) by Fe coated biochars and biochars produced from empty fruit bunch and rice husk. *J. Environ. Chem. Eng.* 1: 981–988.
- Santini J.M., Vanden Hoven, R.N. (2004) Molybdenum-Containing Arsenite Oxidase of the Chemolithoautotrophic Arsenite Oxidizer NT-26. *J. Bacteriol.* 186: 1614–1619.
- Santini T.C., Fey M.V. (2015) Fly ash as a permeable cap for tailings management: pedogenesis in bauxite residue tailings. *J. Soils Sediments.* 15: 552–564.
- Sarwar N., Imran M., Shaheen M.R., Ishaque W., Kamran M.A., Matloob A., Hussain S. (2017) Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives. *Chemosphere.* 171: 710–721.
- Satapanajaru T., Anurakpongsatorn P., Pengthamkeerati P., Boparai H. (2008) Remediation of Atrazine-contaminated Soil and Water by Nano Zero valent Iron. *Water Air Soil Pollut.* 192: 349–359.
- Sauvé S., Hendershot W., Allen H.E. (2000) Solid–solution partitioning of metals in contaminated soils. Dependence on pH, total metal burden, and organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 34: 1125–1131.
- Schaidler L.A., Senn D.B., Brabander D.J., McCarthy K.D., Shine J.P. (2007) Characterisation of zinc, lead, and cadmium in mine waste : implication for transport, exposure, and bioavailability, *environ. sci. technol*, 41, pp 4164–4171.
- Schalk I.J., Hannauer M., Braud A. (2011) New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environmental microbiology*, 13(11): 2844–2854.

Références bibliographiques

- Schenkeveld W.D.C., Kimber R.L., Walter M., Oburger E., Puschenreiter M., Kraemer S.M. (2017) Experimental considerations in metal mobilization from soil by chelating ligands: the influence of soil-solution ratio and pre-equilibration – a case study on Fe acquisition by phytosiderophores. *Sci. Total Environ.* 579: 1831–1842.
- Schoof R.A. (2003) Guide for Incorporating bioavailability adjustments into human health and ecological risk assessments at US department of defense facilities. Part 1: overview of metals bioavailability. *Battelle, Columbus*.
- Sebag D., Copard Y., Di Giovanni C., Durand A., Laignel B., Ogier S., Lallier-Verges E. (2006) Palynofacies as useful tool to study origins and transfers of particulate organic matter in recent terrestrial environments: synopsis and prospects. *Ear. Sci. Rev.* 79: 241–259.
- Seshadri B., Bolan N., Naidu R. (2015) Rhizosphere-induced heavy metal (loid) transformation in relation to bioavailability and remediation. *J. Soil Sci. Plant. Nutr.* 15: 524–548.
- Sessitsch A., Kuffner M., Kidd P., Vangronsveld J., Wenzel W.W., Fallmann K., Puschenreiter, M. (2013) The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biol. Biochem.* 60: 182–194.
- Shackelford C.D., Sevick G.W., Eykholt G.R. (2010) Hydraulic conductivity of geosynthetic clay liners to tailings impoundment solutions. *Geotext Geomembr.* 28: 149–162.
- Shaheen S.M., Shams M.S., Khalifa M.R., El-Daly M.A., Rinklebe J. (2017b) Various soil amendments and wastes affect the (im)mobilization and phytoavailability of potentially toxic elements in a sewage effluent irrigated sandy soil. *Ecotoxicol. Environ.Saf.* 142: 375–387.
- Shahid, M., Pinelli, E., Dumat, C., 2012. Review of Pb availability and toxicity to plants in relation with metal speciation: Role of synthetic and natural organic ligands. *J. Hazard. Mater.* 219–220.
- Shaw, G. S. (1993). The effect of processing variables on steel surface chemistry (Doctoral dissertation, Case Western Reserve University).
- Singh N., Abiven S., Torn M.S., Schmidt M.W.I. (2012) Fire-derived organic carbon in soil turns over on a centennial scale. *Biogeosciences.* 9: 2847-2857.
- Singh R., Babu J.N., Kumar R., Srivastava P., Singh P., Raghubanshi A.S. (2015). Multifaceted application of crop residue biochar as a tool for sustainable agriculture: an ecological perspective. *Ecological Engineering*, 77: 324–347.
- Sigg L., Behra P., Stumm W. (2001) *Chimie des milieux aquatiques: chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement*. Dunod, Paris, pp.567.
- Smith R.G., Gross K.L., Robertson G.P. (2008) Effects of crop diversity on agroecosystem function: crop yield response. *Ecosystems.* 11: 355–366.
- Smider B., Singh B. (2014) Agronomic performance of a high ash biochar in two contrasting soils. *Agri. Ecosyst. Environ.* 191: 99–107
- Sneddon I.R., Orueetxebarria M., Hodson M.E., Schofield P.F., Valsami- Jones E. (2006) Use of bone meal amendments to immobilise Pb, Zn and Cd in soil: A leaching column study. *Environ. Pollut.* 144 : 816–825.
- Soares M.A., Marto S., Quina M.J., Gando-Ferreira L., Quinta-Ferreira R. (2016) Evaluation of eggshell-rich compost as biosorbent for removal of Pb (II) from aqueous solutions. *Water, Air, Soil Pollut.* 227(5): 150.
- Sobariu D.L., Fertu D.I.T., Diaconu M., Pavel L.V., Hlihor R.M., Drăgoi E.N., Gavrilescu M. (2017). Rhizobacteria and plant symbiosis in heavy metal uptake and its implications for soil bioremediation. *New biotechnology.* 39: 125–134.
- Spokas K.A., Baker J.M., Reicosky DC. (2010) Ethylene: Potential key for biochar amendment impacts. *Plant Soil.* 333: 443-452.

Références bibliographiques

- Sposito G. (1989) The chemistry of soils. Edition Oxford University Press, pp. 277.
- Stewart B.A., Robinson .CA., Parker D.B. (2000) Examples and case studies of beneficial reuse of beef cattle by-products. In: Dick, W.A. (Ed.), Land Application of Agricultural, Industrial and Municipal By-products. Soil Science Society of America, Madison, pp. 387–407.
- Stolz J., Basu P., and Oremland R. (2002) Microbial transformation of elements: the case of arsenic and selenium. *Int. Microbiol.* 5: 201–207.
- Stumm W., Morgan J.J. (1996) Aquatic chemistry – Chemical equilibria and rates in natural waters. John Wiley & Sons, New York, pp.1022.
- Subacz J.L., Barnett M.O., Jardine P.M., Stewart M.A. (2007) Decreasing arsenic bioaccessibility bioavailability in soils with iron amendments. *J Environ Sci Health, Part A.* 42: 1317–1329.
- Subedi R., Taupe N., Pelissetti S., Petruzzelli L., Bertora C., Leahy J., Grignani C. (2016) Greenhouse gas emissions and soil properties following amendment with manure-derived biochars: influence of pyrolysis temperature and feedstock type. *J. Environ. Manag.* 166: 73–83.
- Sun Y., Zhang J.P., Wen C., Zhang L. (2016) An enhanced approach for biochar preparation using fluidized bed and its application for H₂S removal. *Chem. Eng. Process. Proc Inten.* 104: 1–12.
- Takeno N. (2005). Atlas of Eh-pH diagrams. Geological survey of Japan open file report, 419, 102.
- Taleb K., Markovski J., Milosavljević M. (2015) Efficient arsenic removal by cross-linked macroporous polymer impregnated with hydrous iron oxide: Material performance. *Chem Eng J.* 279: 66–78.
- Tessier A., Campbell P.G.C., Bisson M. (1979) Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *analytical chemical.* 51: 44–850.
- Thavamani P., Samkumar R.A., Satheesh V., Subashchandrabose S.R., Ramadass K., Naidu R., Megharaj M. (2017) Microbes from mined sites: Harnessing their potential for reclamation of derelict mine sites. *Environ. pollut.* 230: 495–505.
- Thummes K., Schäfer J., Kämpfer P., Jäckel U. (2007) Thermophilic methanogenic Archaea in compost material: occurrence, persistence and possible mechanisms for their distribution to other environments. *Syst. Appl. Microbiol.* 30(8): 634–643.
- Touceda-González M., Alvarez-López V., Prieto-Fernández A., Rodríguez-Garrido B., Trasar-Cepeda C., Mench M., Puschenreiter M., Quintela-Sabarís C., Macías-García F., Kidd P.S. (2017) Aided phytostabilisation reduces metal toxicity, improves soil fertility and enhances microbial activity in Cu-rich mine tailings. *J. Environl Manag.* 186: 301–313
- Trupiano, D., Coccozza, C., Baronti, S., Amendola, C., Vaccari, F. P., Lustrato, G., ... & Scippa, G. S. (2017). The effects of biochar and its combination with compost on lettuce (*Lactuca sativa* L.) growth, soil properties, and soil microbial activity and abundance. *International Journal of Agronomy*.
- Tsang D.C., Yip A.C., Olds W.E., Weber P.A. (2014) Arsenic and copper stabilisation in a contaminated soil by coal fly ash and green waste compost. *Environ Sci Pollut Res.* 21(17): 10194–10204.
- Uren N.C. (2007) Types, Amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. In: Pinton, R., Varanini, Z. and Nannipieri, P. (Eds.). *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-plant Interface*. Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 1-21.
- U.S. EPA. 2007 Estimation of relative bioavailability of lead in soil and soil-like materials using in vivo and in vitro methods. Oswer 9285.7-77, office of solid waste and emergency response.
- U.S. EPA, 2012. Standard Operating Procedure for an in Vitro Bioaccessibility Assay for Lead in Soil, 9200.2e86. April 2012. (available on-line at <http://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P100GESL.PDF?Dockey¼P100GESL.PDF>)

Références bibliographiques

- Vacheron J., Desbrosses G., Bouffaud M.L., Touraine B., Moëgne-Locco, Y., Muller D., Prigent-Combaret C. (2013) Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in plant science*. 4 356.
- Vamerali T., Bandiera M., Coletto L., Zanetti F., Dickinson N.M., Mosca G. (2009) Phytoremediation trials on metal and arsenic-contaminated pyrite wastes (Torviscosa, Italy). *Environ. Pollut.* 157: 887–894.
- Vamerali T., Bandiera M., Mosca G. (2010) Field crops for phytoremediation of metalcontaminated land. A review. *Environ. Chem. Lett.* 8 (1): 1–17.
- Van der Perk M. (2013) *Soil and Water Contamination*. CRC Press.
- Vangronsveld J., Herzig R., Weyens N., Boulet J., Adriaensen K., Ruttens A., Thewys T., Vassilev A., Meers E., Nehnevajova E., Van der Lelie D., Mench M. (2009) Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16: 765–794.
- Vannoppen W., Vanmaercke M., De Baets S., Poesen J. (2015) A review of the mechanical effects of plant roots on concentrated flow erosion rates. *Earth Sci. Rev.* 150: 666–678.
- Van Zwieten L., Singh B.P., Kimber S.W.L., Murphy D.V., Macdonald L.M., Rust J., Morris S. (2014) An incubation study investigating the mechanisms that impact N₂O flux from soil following biochar application. *Agric. Ecosyst. Environ.* 191: 53–62.
- Vazquez S., Agha R., Granado A., Sarro M.J., Esteban E., Penalosa J.M., Carpena R.O. (2006) Use of white lupin plant for phytostabilization of Cd and As polluted acid soil. *Water Air Soil Pollut.* 177: 349–365.
- Védie. (2008) Fertilité chimique du sol : savoir interpréter les analyses pour gérer les apports d'éléments majeurs (phosphore, potasse, magnésie) en maraîchage biologique. *MARAICHAGE BIO INFOS* N°56.
- Venegas A., Rigol A., Vidal M. (2015) Viability of organic wastes and biochars as amendments for the remediation of heavy metal-contaminated soils. *Chemosphere*. 119: 190–198.
- Ventura M., Alberti G., Viger M., Jenkins J.R., Girardin C., Baronti S., Zaldei A., Taylor G., Rumpel C., Miglietta F. et Tonon G. (2014) Biochar mineralization and priming effect on SOM decomposition in two European short rotation coppices. *GCB Bioenergy*.
- Verheijen F., Jeffery S., Bastos A., Van der Velde M., Diafas I. (2010) *Biochar Application to Soils. A Critical Scientific Review of Effects on Soil Properties, Processes, and Functions* (EUR 24099:162).
- Vernay P., Gauthier-Moussard C., Jean L., Bordas F., Faure O., Ledoigt G., Hitmi A. (2008) Effect of chromium species on phytochemical and physiological parameters in *Datura innoxia*. *Chemosphere*, 72(5): 763–771.
- Vervaeke P., Luyssaert S., Mertens J. (2003) Phytoremediation prospects of willow stands on contaminated sediment: a field trial. *Environ. Pollut.* 126 (2): 275–282.
- Vessey J.K. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255: 571–586. doi:10.1023/A:1026037216893
- Viger M., Hancock R.D., Miglietta F., Taylor G. (2014) More plant growth but less plant defence? First global gene expression data for plants grown in soil amended with biochar. *GCB Bioenergy*.
- Vingiani, S., Righi, O., Petit, S., Terribile, F., 2004. Mixed-layer kaolinite-smectite minerals in a red-black soil sequence from basalt in Sardinia (Italy). *clays and clay minerals* 52, 473–483. doi:10.1346/CCMN.2004.0520408
- Violante A., Krishnamurti G.S.R., Pigna M. (2008) Factors affecting the sorption-desorption of trace elements in soil environments. in: Violante, A., Huang, P.M., Gadd, G.M. (Eds.). *Biophysico-Chemical Processes of Heavy Metals and Metalloids in Soil Environments*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, pp. 169–213.
- Vishnoi S.R., Srivastava P.N. (2008) Phytoremediation-green for environmental clean. In: *Proceedings of the 12th World Lake Conference*, pp. 1016–1021.

Références bibliographiques

- Wahsha M., Bini C., Argese E., Minello F., Fontana S., Wahsheh H. (2012) Heavy metals accumulation in willows growing on Spolic Technosols from the abandoned Imperina Valley mine in Italy. *J. Geochem Explor.* (123): 19–24.
- Walker D.J., Clemente R., Bernal M.P. (2004) Contrasting effects of manure and compost on soil pH, heavy metal availability and growth of *Chenopodium album* L. in a soil contaminated by pyritic mine waste. *Chem.* 57: 215–224.
- Wan X., Lei M., Chen T. (2016) Cost–benefit calculation of phytoremediation technology for heavy-metal-contaminated soil. *Sci. Total Environ.* 563: 796–802.
- Wang J., Zhao F.J., Meharg A.A., Raab A., Feldmann J., McGrath S.P. (2002) Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. *Plant physiology.* 130(3): 1552–1561.
- Wang X.B., Zhou W., Liang G.Q., Song D.L., Zhang X.Y. (2015a). Characteristics of maize biochar with different pyrolysis temperatures and its effects on organic carbon, nitrogen and enzymatic activities after addition to fluvo-aquic soil. *Sci. Total Environ.* 538: 137–144.
- Wang S.S., Gao B., Zimmerman A.R., Li Y.C., Ma L.Q., Harris W.G., Migliaccio K.W. (2015b) Removal of arsenic by magnetic biochar prepared from pinewood and natural hematite. *Bioresour. Technol.* 175: 391–395.
- Wang L., Ji B., Hu Y., Liu R., Sun W. (2017) A review on *In situ* phytoremediation of mine tailings. *Chemosphere.* 184: 594–600.
- Wahsha M., Bini C., Argese E., Minello F., Fontana S., Wahsheh H. (2012). Heavy metals accumulation in willows growing on Spolic Technosols from the abandoned Imperina Valley mine in Italy. *J. Geochem Explor.* 123: 19–24.
- Watanabe T., Osaki M. (2002) Mechanisms of adaptation to high aluminum condition in native plant species growing in acid soils: a review. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 33: 1247–1260.
- Weber K.A., Urrutia M.M., Churchill P.F., Kukkadapu R.K., Roden E.E. (2006) Anaerobic redox cycling of iron by freshwater sediment microorganisms. *Environ. Microbiol.* 8(1): 100–113.
- Wiszniewska A., Hanus-Fajerska E., Muszyńska E., Ciarkowska K. (2016) Natural organic amendments for improved phytoremediation of polluted soils: A review of recent progress. *Pedosphere.* 26(1): 1–12.
- Wu Y., Li Y., Zheng C., Zhang Y., Sun Z. (2013) Organic amendment application influence soil organism abundance in saline alkali soil. *Eur. J. soil Biol.* 54 : 32–40.
- Wu W., Dong C., Wu J., Liu X., Wu Y., Chen X., Yu S. (2017) Ecological effects of soil properties and metal concentrations on the composition and diversity of microbial communities associated with land use patterns in an electronic waste recycling region. *Sci. Total Environ.* 601: 57–65.
- Xia, Q., Peng, C., Lamb, D., Mallavarapu, M., Naidu, R., & Ng, J. C. (2016). Bioaccessibility of arsenic and cadmium assessed for in vitro bioaccessibility in spiked soils and their interaction during the Unified BARGE Method (UBM) extraction. *Chemosphere.* 147: 444–450.
- Xiao X., Chen Z., Chen B. (2016) H/C atomic ratio as a smart linkage between pyrolytic temperatures, aromatic clusters and sorption properties of biochars derived from diverse precursory materials. *Sci. Rep.* 6 (226), 44.
- Xu D., Zhou P., Zhan J., Gao Y., Dou C., Sun Q. (2013) Assessment of trace metal bioavailability in garden soils and health risks via consumption of vegetables in the vicinity of Tongling mining area, China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 90: 103–111.
- Xu, X.Y., Cao, X.D., Zhao, L., Zhou, H.J., Luo, Q.S. (2014) Interaction of organic and norganic fractions of biochar with Pb(II) ion: further elucidation of mechanisms for Pb(II) removal by biochar. *RSC Adv.* 4 : 44930.

Références bibliographiques

- Xu N., Tan G., Wang H., Gai X. (2016) Effect of biochar additions to soil on nitrogen leaching, microbial biomass and bacterial community structure. *Eur. J. Soil Biol.* 74: 1-8.
- Yao F.X., Arbestain M.C., Virgel S., Blanco F., Arostegui J., Maciá-Agulló J.A., Macías F. (2010) Simulated geochemical weathering of a mineral ash-rich biochar in a modified Soxhlet reactor. *Chemosphere*, 80 : 724–732.
- Yin D., Wang X., Chen C., Peng B., Tan C., Li H. (2016) Varying effect of biochar on Cd, Pb and As mobility in a multi-metal contaminated paddy soil. *Chemosphere*. 152: 196–206.
- Yong RN. (1993) Selective sequential extraction analysis of heavy-metal retention in soil. *Canadian geotechnical journal*, 30(5): 834–847.
- Yuan J.H., Xu R.K., Zhang H. (2011) The forms of alkalis in the biochar produced from crop residues at different temperatures. *Bioresour. Technol.* 102: 3488–3497.
- Yusuf M., Fariduddin Q., Hayat S., Ahmad A. (2011) Nickel: An overview of uptake, essentiality and toxicity in plants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 86 (1): 1–17.
- Zanuzzi A., Arocena J.M., Van Mourik J.M., Cano A.F. (2009): Amendments with organic and industrial wastes stimulate soil formation in mine tailings as revealed by micromorphology. *Geoderma*. 154 : 69–75.
- Zappellini C. (2018). Étude des communautés microbiennes rhizosphériques de ligneux indigènes de sols anthropogéniques, issus d'effluents industriels. Thèse université de Bourgogne Franche-Comté.
- Zeng X.C., Yang Y., Shi W., Peng Z., Chen X., Zhu X., Wang Y. (2018) Microbially Mediated Methylation of Arsenic in the Arsenic-Rich Soils and Sediments of Jiangnan Plain. *Front Microbiol.* 9:1389.
- Zhang H., Selim H.M. (2008) Reaction and transport of arsenic in soils: equilibrium and kinetic modelling. *Adv. Agron.* 98: 45–115.
- Zhang G., Liu H., Liu R., Qu J. (2009) Adsorption behaviour and mechanism of arsenate at Fe-Mn binary oxide/water interface. *J. Hazard. Mater.* 168: 820–825.
- Zhang H., Voroney R.P., Price G.W. (2015a) Effects of temperature and processing conditions on biochar chemical properties and their influence on soil C and N transformations. *Soil Biol. Biochem.* 83: 19–28.
- Zhang J., Liu J., Liu R.L. (2015b) Effects of pyrolysis temperature and heating time on biochar obtained from the pyrolysis of straw and lignosulfonate. *Bioresour. Technol.* 176: 288–291.
- Zhang, M., & Wang, H. (2016). Preparation of immobilized sulfate reducing bacteria (SRB) granules for effective bioremediation of acid mine drainage and bacterial community analysis. *Minerals Engineering*, 92: 63-71.
- Zhang, G., Bai, J., Xiao, R., Zhao, Q., Jia, J., Cui, B., & Liu, X. (2017). Heavy metal fractions and ecological risk assessment in sediments from urban, rural and reclamation-affected rivers of the Pearl River Estuary, China. *Chemosphere*, 184, 278-288.
- Zhao H., Wu L., Chai T. (2012) The effects of copper, manganese and zinc on plant growth and elemental accumulation in the manganese-hyperaccumulator *Phytolacca americana*. *J. Plant Physiol.* 169 (13): 1243–1252.
- Zhao L., Cao X., Mašek O., Zimmerman A. (2013) Heterogeneity of biochar properties as a function of feedstock sources and production temperatures. *J. Hazard. Mater.* 256: 1–9.
- Zhao F.J., Ma Y., Zhu Y.G., Tang Z., McGrath, S.P. (2015) Soil contamination in China: current status and mitigation strategies. *Environ. Sci. Technol.* 49: 750–759.
- Zhivotovsky O.P., Kuzovkina J. A., Schulthess C.P., Morris T., Pettinelli D., Ge, M. (2010) Hydroponic screening of willows (*Salix L.*) for lead tolerance and accumulation. *Int. J. Phytoremediation*. 13(1): 75–94.

Références bibliographiques

- Zimmer D., Kruse J., Baum C., Borca C., Laue M., Hause G., Meissner R., Leinweber P. (2011) Spatial distribution of arsenic and heavy metals in willow roots from a contaminated floodplain soil measured by X-ray fluorescence spectroscopy. *Sci. Total Environ.* 409: 4094–4100.
- Zimmerman A.R., Gao B., Ahn M.Y. (2011) Positive and negative carbon mineralization priming effects among a variety of biochar-amended soils. *Soil Biol. Biochem.* 43: 1169–1179.

ANNEXE 1

Tableau I.1 : Etudes de terrain de procédé de phytostabilisation menées entre 2010 et 2018, classées par ordre chronologique. Une brève description est donnée pour chaque étude en annexe 1 (adapté de Gerhardt *et al.*, 2017 et mis à jour).

Contaminants	Espèces de plantes	Amendements utilisés	Localisation du site	Durée de l'expérience	Références
Cd, Pb, Zn	<i>Zea Mays</i>	chaux et faible apport de N	Flandres, Belgique	25 semaines	Meers et al., 2010
Contamination historique diffuse de terres agricoles par les dépôts atmosphériques de métaux provenant de la fonderie ; approche de gestion phytosanitaire axée principalement sur l'utilisation alternative des terres et la réduction des risques pour les terres contaminées - l'objectif de la phytoextraction était secondaire et devrait être à long terme ; valorisation par la production de bioénergie du maïs ; faibles taux de phytoextraction pour Cd et Pb ; diminution de 0,4-0,7 mg kg ⁻¹ du Zn en surface.					
Pb, Zn	<i>Pistacia lentiscus</i> , <i>Scrophularia canina subsp. bicolor</i>	compost, fertilisant chimique, zeolithe (seul ou combiné)	Sardaigne, Italie	2 ans	Bacchetta et al., 2012
Contamination par les activités minières ; une phytostabilisation dans les racines de <i>P. lentiscus</i> a été observée ; en général, les amendements ont diminué la fraction de métal biodisponible, en particulier le Pb dans les parcelles avec compost ; <i>P. lentiscus</i> a été jugé approprié pour la restauration environnementale de la mine abandonnée.					
As, Cd, Cu, Mn, Pb, Zn	<i>Atriplex halimus L.</i>	compost, lisiers de porcs	Carthagène, Espagne	2 ans	Clemente et al., 2012
Ancienne mine multi-métallique; les concentrations de métaux et métalloïdes dans le sol dépassaient les niveaux de référence génériques de plus de 100 fois ; il y a eu peu d'effet des amendements sur la biodisponibilité, mais les auteurs ont observé une augmentation de la biomasse végétale et microbienne ; <i>A. halimus</i> a été jugé approprié pour phytostabiliser les sols moyennement contaminés dans les zones semi-arides pour minimiser l'érosion et la dispersion des contaminants.					
Cu, Mn, Pb, Zn	<i>Lolium perenne L.</i> , <i>Festuca rubra L.</i> , <i>Poa pratensis L.</i>	chaux dolomique, phosphate	delta, Colombie britannique, Canada	> 39 semaines	Pdmavathiamma et al., 2012
Contamination par des métaux dans les sols adjacents à une route ; durée des expériences : 90 jours (<i>Lolium</i>), 180 jours (<i>Festuca</i> , <i>Poa</i>) et 270 jours (<i>Lolium</i> + <i>Festuca</i> + <i>Poa</i>) ; amendements réduisant la fraction échangeable et l'absorption des quatre métaux par les végétaux.					
Pb	<i>Thysanolaena maxima</i> , <i>Vetiveria zizanioides</i>	Osmocote, fumier de vache, fertilisant organique	Distict de Thong Pha Phum, Province de Kanchanaburi, Thaïlande	1 an	Meeinkuirt et al., 2013
Contamination par les activités minières de Pb ; engrais améliorant la croissance des plantes et l'absorption de Pb et une accumulation de Pb dans les racines.					
Cd, Cu, Pb, Zn	<i>Populus alba L. var. pyramidalis</i>		Shapopang, Province de Gansu, Chine	> à 7 ans	Hu et al., 2013
Des terres arables près d'une fonderie de Pb/Zn contaminées par 40 ans d'irrigation par des eaux usées ; une phytostabilisation du Cu et du Pb et une phytoextraction du Cd et du Zn ont été observées ; il y avait de fortes concentrations de Cd et de Zn dans les feuilles ; il faudrait donc recueillir de la litière ; on a estimé à 24 et 16 ans les délais pour remédier le Cd et le Zn, respectivement.					
Cr	plantes indigènes poussant dans la région ont été récoltées, des graminées sélectionnées (3 espèces), des plantes à fleurs (2 espèces) et des arbres (10		Jajmau, Inde	4 mois, 1 an	Sinka et al., 2013

espèces) ont été plantés.

Contamination due à l'irrigation par les eaux usées des tanneries depuis plus de 30 ans ; les plantes à fleurs ont été cultivées pendant 4 mois et les arbres pendant un an ; *Vetiveria zizanoides*, *Chrysanthemum coronarium* et *Cymbopogon winterianus* conviennent à la phytoextraction du Cr ; ce sont des plantes saisonnières qui doivent donc être récoltées pour empêcher le relargage de Cr dans l'environnement ; les arbres issus de ces expériences peuvent être utilisés avec succès pour la phytostabilisation ; une valorisation économique pour les arbres serait possible en raison de la faible accumulation de Cr ($34 \mu\text{g.g}^{-1}$ de matière sèche).

Pb, Zn	<i>Festuca rubra</i>	divers amendements organiques	Province de Biscay, Espagne	6 mois	Galende et al., 2014
Contamination d'une mine de Pb/Zn abandonnée ; les amendements ont réduit la disponibilité du Pb et du Zn et amélioré la qualité du sol, ce qui a entraîné une augmentation de la biomasse végétale ; les auteurs ont noté le problème de l'hétérogénéité du sol qui ne permet pas de montrer les réponses induites par le traitement.					
As, Cd, Cu, Mn, Pb, Zn	<i>Bituminaria bituminosa</i>	compost mature fertilisé au NPK (fumier de vache et compost de moulin à olive)	Murcia, Espagne	2 ans	Pardo et al., 2014
Contamination due à 2500 ans d'exploitation minière ; les plantes ont bien poussé et le site a ensuite été colonisé par 29 autres espèces (phytorestauration), entraînant la phytostabilisation du sol pour minimiser l'érosion ; les amendements ont eu peu d'effet sur l'extractibilité des métaux.					
Cd, Cr, Ni, Pb	<i>Cymbopogon martinii</i>	boue de tannerie	Lucknow, Inde	3 récoltes	Pandey et al., 2015
Les boues de tannerie ont été utilisées comme amendement pour tester le potentiel d'utilisation de <i>C. martinii</i> comme phytostabilisateur ; les boues contenaient de nombreux éléments nutritifs, ainsi que des métaux ; les boues ont amélioré la qualité du sol ; la phytoaccumulation des métaux était principalement dans les racines de <i>C. martinii</i> ; cette espèce peut donc être utilisée comme phytostabilisant pour les sols contaminés par les boues de tannerie.					
Cd, Pb, Zn	<i>Miscanthus x giganteus</i>		Nord de la France	3 ans	Pelfrène et al., 2015
La contamination du sol par les émissions d'une fonderie de plomb dans une zone houillère ; la présence de plantes a modifié la distribution des métaux dans le sol ; des changements complexes dans la bioaccessibilité ont été observés ; la biomasse pourrait servir de bioénergie dans une approche de phytogestion.					
Cd	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	fertilisants organiques, fumier de vache, fumier de cochon	District de Mae Sot, province de Tak, Thaïlande	9 mois	Meeinkuirt et al., 2015
Contamination des sols agricoles près de mines de zinc ; la phytostabilisation a été réalisée avec des engrais organiques ; <i>E. camaldulensis</i> était considérée comme une espèce prometteuse pour la phytostabilisation des sols contaminés au cadmium ; une approche la phytogestion des sols était proposée pour le papier ou la fabrication de mobilier en bois pour la valorisation.					
Cd, Pb, Zn	<i>Pinus sylvestris</i> , <i>Picea abies</i> , <i>Quercus robur</i>	boues d'épuration (faible teneur en métaux lourds et œufs de parasites)	région de Silesia, Pologne	2 ans	Placek et al., 2016
Sol de mauvaise qualité près d'une fonderie de Zn ; <i>P. sylvestris</i> et <i>P. abies</i> ont été jugés appropriés pour la phytoextraction de Cd et Zn et la phytostabilisation du Pb ; <i>Q. robur</i> ne convenait pas en raison de l'accumulation de Cd dans les feuilles, qui pouvait remobiliser le Cd dans l'environnement ; un lessivage du Zn a été observé, probablement en raison des changements induits par les exsudats racinaires dans la rhizosphère.					
Pb, Zn	divers exludeurs natifs du site	endophyte consortium (5 isolats)	Biscay, Espagne	9 semaines	Burges et al., 2016

Mine de Pb/Zn abandonnée ; un consortium d'endophytes a été constitué à partir d'isolats d'espèces végétales saines et tolérantes aux métaux (*Festuca rubra* L., *Noccaea caerulescens* J. & C. Presl., *Rumex acetosa* L., *Betula alba* Ehrh. et *Salix atrocinerea* Brot) poussant sur le site ; une souche de *Microbacterium* sp. et 4 souches de *Pseudomonas* sp. ont été utilisées pour le consortium ; le consortium a été pulvérisé sur la végétation et le sol du site, une fois par semaine pendant 3 semaines ; des concentrations plus faibles de Pb et de Zn ont été observées dans les plantes indigènes en raison de l'inoculation, mais aucun effet sur la biomasse.

Cd	<i>Eucalyptus globules, Cicer arietinum</i>	EDTA	Guiyu, province de Guangdong, Chine	5 mois	Luo et al., 2016
La contamination par le Cd après 30 ans de démantèlement et de recyclage des déchets électroniques ; les sols contenaient également du Pb, du Cu, du Hg ; l'EDTA a accru la mobilité et l'extractibilité du Cd, mais a également entraîné un lessivage et un risque accru pour les récepteurs écologiques; le Cd a été séquestré dans les racines ; les auteurs estiment à 41 ans, 11 ans avec addition d'EDTA, pour remédier aux critères généraux en utilisant ces espèces.					
As, Cd, Pb	<i>Pteris vittata, Sedum alfredii, Sugar cane, mulberry tree</i>	fertilisants (inorganiques et organiques)	comté de Huanjiang Maonan, Chine	2 ans	Wan et al., 2016
Terres agricoles contaminées par le dépôt de déchets miniers à la suite d'une inondation ; des diminutions significatives des concentrations biodisponibles de l'As, du Cd et du Pb ont été observées. Critères réglementaires respectés : les produits agricoles cultivés sur des sols phytoremédiés répondaient aux normes nationales en matière de concentrations de métaux.					
As, Pb, Zn, Cd, Cu, Ni	<i>Ericameria nauseosa, Quercus turbinella, Gutierrezia sarothrae, Salix spp, Juglans major, Populus fremontii</i>	compost	Comté de Yavapai, Arizona, Etats-Unis	4 ans	Gil-Loaiza et al., 2016
Ancienne mine qui a produit plusieurs métaux (Au, Ag, Cu, Pb et Zn) Un couvert végétal variant de 21 à 61 % s'est développé après 41 mois dans les traitements avec le compost. Amélioration de la quantité de bactéries hétérotrophes neutrophiles avec la présence de plantes. L'accumulation des métaux et métalloïdes dans les tissus des parties aériennes était égale ou inférieure aux limites de toxicité pour les animaux domestiques, à quelques exceptions près pour les plantes traitées avec moins de compost..					
Fe, Cd, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn	<i>Salix spp, Populus nigra L. ou Agrostis capillaris L.</i>	compost	Coruña, Espagne	3 ans	Touceda-Gonzalez et al., 2017
Ancienne mine de cuivre abandonné ; amélioration des propriétés agronomiques et diminution de la disponibilité du cuivre. Stimulation de l'activité enzymatique du sol et importants changements dans la structure de la communauté bactérienne au cours du temps. <i>S. viminalis</i> et <i>A. capillaris</i> , ont montré les meilleurs résultats en termes de croissance végétale et de production de biomasse. Les effets bénéfiques du processus de phytostabilisation ont été maintenus au moins trois ans après le traitement.					
As, Pb, Cd	<i>Arundo donax</i>	fertilisant organique et cendres volantes	Province du Hunan, Chine	150 jours	Liu et al., 2017
Rizière abandonnée et contaminée par les fumées d'une fonderie (Pb/Zn) à proximité. Diminution d'arsenic (As) et de plomb (Pb) dans le sol de 8,45 % à 2,19 % et de 29,6 % à 13,5 %, respectivement, et celui du cadmium (Cd) a été réduit de 25,3 % à 6,49 %. L'accumulation d'As, de Cd et de Pb dans le roseau géant était de 1,57, 4,06 et 11,25 mg par individu. Enrichissement de la communauté bactérienne par l'augmentation de la densité de plantation des roseaux géants..					
Cd, Pb, Zn	<i>Robinia pseudoacacia, Alnus glutinosa, Acer pseudoplatanus, Salix alba</i>	2 types de Cendres volantes de charbon	Nord de la France	11 ans	Labidi et al., 2017

Parcelle agricole à proximité d'une ancienne fonderie de plomb et de zinc. Diminution de la fraction extractible du Cd et du Zn dans le. Cependant, aucun effet significatif n'a été observé sur les concentrations d'éléments métalliques dans les feuilles. L'étude a mis en évidence une réduction du stress oxydatif dans les feuilles des arbres en raison de l'ajout des amendements. La mobilité des métaux dans les sols contaminés et leur accumulation dans les feuilles différaient selon la nature des amendements et les essences végétales sélectionnées.

	chaux, compost	Los Maitenes, Chili	6 ans	Pardo et al., 2018
--	----------------	------------------------	-------	--------------------

Cu, Pb, Zn, Cd, As

Sols contaminé par les fumées d'une fonderie de cuivre à proximité. maintien du pH et de la végétation mis en place spontanément six ans après l'incorporation des amendements, mais diminution de la teneur en matière organique. Variation de la concentration des métaux dans la végétation probablement due aux conditions météorologiques

Pb, Zn, Cu, Mn, Cd	<i>Glycine max</i> , la rose arc-en-ciel, <i>Bassia scoparia</i>	biochar, engrais organique, paille de riz, ceramsite et micro- organismes (<i>M.</i> <i>Circinelloides</i>)	province de liaoning, Chine	105 jours	Li et al., 2019
--------------------	--	--	--------------------------------	-----------	-----------------

Résidus miniers comportant une contamination multi-métallique. Diminution de la fraction phydisponible de Pb, Cd, Cu, Zn et Mn. Amélioration de l'abondance de la communauté bactérienne. L'étude a également mis en avant l'amélioration de catalase, d'uréase et de phosphatase, ainsi que la plus grande efficacité du soja pour la phytoremédiation

Caractéristiques des différentes espèces de saules étudiées.

Il est donc intéressant de connaître les caractéristiques générales de chaque espèce implantée (source : Tela Botanica).

Salix alba : c'est le plus grand des saules, sa taille peut en effet atteindre 25 m. On le rencontre souvent dans les prairies des vallées, solitaire, ou dans les haies en bordure des rivières.

L'écorce de l'arbre âgé est épaisse et profondément crevassée, rappelant celle du peuplier noir. Il se retrouve en Europe, Asie tempérée, Afrique septentrionale, et a été introduit en Amérique.

Salix purpurea : c'est un arbuste qui atteint 4 m. Il se répartit sur tout le continent eurasiatique.

Salix triandra : cet arbre de 25 mètres se retrouve de l'Europe à l'Asie occidentale et boréale et même en Algérie.

Salix viminalis : ce petit arbre, qui peut atteindre 7 m, est présent dans les milieux humides. Il est souvent planté et traité en têtard dont les rameaux, droits, longs et souples, sont coupés chaque année pour servir à la vannerie. Sa répartition est très vaste allant de l'Europe à l'Asie tempérée et a été naturalisé en Amérique.

Tableau I.2 : bilan des conditions optimales pour la croissance des espèces de saules étudiées (source : Tela Botanica)

Espèces	Caractéristiques climatiques				Caractéristiques du sol					
	lum	hdté	temp	cont	pH	hdté	text	nu	sal	MO
<i>Salix alba</i>	++	++	0	0	+	+	+	+	--	++
<i>Salix purpurea</i>	++	++	0	-	++	+	-	0	--	--
<i>Salix triandra</i>	+	++	0	0	+	+	--	+	--	++
<i>Salix viminalis</i>	++	++	0	0	++	+	--	+	--	++

lum : luminosité : ombre -- lumière ++

hdté : humidité : sec -- humide ++

temp : température : froid -- chaud ++

cont : continentalité : marin -- continental ++

pH : acide -- basique ++

hdté : humidité : sec -- humide ++

text : texture : argile -- graviers ++

nu : nutriment : pauvre -- riche ++

sal : salinité : non tolérant -- tolérant ++

MO : Matière Organique : pauvre -- riche ++

Tableau I.3 : Statistiques de la distribution du plomb selon le protocole d'extraction séquentielle (BCR) sélectionné au moment de l'incorporation des amendements (T0) et à T6 sur les blocs non végétalisés pour les différents traitements. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. NV : non végétalisé. F1, fraction acido-soluble ; F2, fraction réductible ; F3, fraction oxydable ; F4, fraction résiduelle.

	P	PB T0	PB T6 NV	PC T0	PC T6 NV	PBC T0	PBC T6 NV	PBCS T0	PBCS T6 NV
F4	a	bc	A	b	A	b	A	c	A
		***		ns		ns		***	
F3	b	a	A	a	A	a	A	a	A
		***		ns		ns		***	
F2	b	a	B	a	A	a	A	a	AB
		ns		ns		***		ns	
F1	b	a	A	b	C	c	C	c	B
		ns		ns		ns		***	

Les lettres minuscules indiquent une différence significative entre les traitements pour les sous-blocs non végétalisés; les lettres majuscules indiquent une différence significative entre les sous-blocs végétalisés avec du trèfle ($p < 0,05$) ($n = 3 \pm SE$). ***Différence significative ($p < 0,001$), et ns : non significatif, différence entre T0 et T6.

Tableau I.4 : Statistiques de la distribution du plomb selon le protocole d'extraction séquentielle (BCR) sélectionné à T6 sur les blocs non végétalisés et végétalisé pour les différents traitements. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. NV : non végétalisé, Tr : végétalisé avec Trifolium repens STr : végétalisé avec Salix et Trifolium repens. F1, fraction acido-soluble ; F2, fraction réductible; F3, fraction oxydable ; F4, fraction résiduelle.

	PB NV	PB Tr	PB STr	PC NV	PC Tr	PC STr	PBC NV	PBC Tr	PBC STr	PBCS NV	PBCS Tr	PBCS STr
F4	a	A	β	a	B	α	a	AB	$\alpha\beta$	a	B	β
	ns			ns			**			**		
F3	a	B	β	a	A	β	a	AB	$\alpha\beta$	a	AB	α
	ns			ns			**			**		
F2	b	B	α	a	A	β	a	AB	α	ab	AB	α
	ns			ns			ns			ns		
F1	a	A	α	c	C	γ	c	B	$\alpha\beta\gamma$	b	B	β
	ns			ns			***			ns		

Les lettres minuscules indiquent une différence significative entre les traitements pour les sous-blocs non végétalisés; les lettres majuscules indiquent une différence significative entre les sous-blocs végétalisés avec du trèfle et les lettres grecques indiquent une différence pour les blocs végétalisés avec du sauke et du trèfle ($p < 0,05$) ($n = 3 \pm SE$). ***Différence significative ($p < 0,001$), ** : différence significative ($p < 0,01$) et ns : non significatif, différence entre T0 et T6.

Tableau I.5: Statistiques de la distribution du plomb selon le protocole d'extraction séquentielle (BCR) sélectionné au moment de l'incorporation des amendements (T0) et à T6 sur les blocs non végétalisés pour les différents traitements. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. NV : non végétalisé. F1, fraction acido-soluble ; F2, fraction réductible ; F3, fraction oxydable ; F4, fraction résiduelle.

	P	PB T0	PB T6 NV	PC T0	PC T6 NV	PBC T0	PBC T6 NV	PBCS T0	PBCS T6 NV
F4	a	d	B	b	A	c	A	c	A
		ns		ns		ns		ns	
F3	c	a	A	c	C	b	B	b	C
		ns		ns		*		*	
F2	c	a	A	b	B	b	B	b	B
		ns		ns		ns		ns	
F1	c	a	A	b	C	a	B	b	C
		***		ns		ns		ns	

Les lettres minuscules indiquent une différence significative entre les traitements pour les sous-blocs non végétalisés; les lettres majuscules indiquent une différence significative entre les sous-blocs végétalisés avec du trèfle ($p < 0,05$) ($n = 3 \pm SE$). ***Différence significative ($p < 0,001$), * : différence significative ($p < 0,05$) et ns : non significatif, différence entre T0 et T6.

Tableau I.6 : Statistiques de la distribution de l'arsenic selon le protocole d'extraction séquentielle (BCR) sélectionné à T6 sur les blocs non végétalisés et végétalisé pour les différents traitements. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. NV : non végétalisé, Tr : végétalisé avec Trifolium repens STTr : végétalisé avec Salix et Trifolium repens. F1, fraction acido-soluble ; F2, fraction réductible; F3, fraction oxydable ; F4, fraction résiduelle.

	PB NV	PB T	PB ST	PC NV	PC T	PC ST	PBC NV	PBC T	PBC ST	PBCS NV	PBCS T	PBCS ST
F4	b	A	β	a	A	α	a	A	α	a	A	α
	ns			ns			ns			ns		
F3	a	B	α	c	B	γ	b	AB	β	c	A	$\alpha\beta$
	ns			ns			ns			*		
F2	a	A	α	b	B	β	b	AB	β	b	B	β
	*			ns			ns			ns		
F1	a	B	α	c	B	β	b	A	α	c	B	β
	*			ns			ns			ns		

Les lettres minuscules indiquent une différence significative entre les traitements pour les sous-blocs non végétalisés; les lettres majuscules indiquent une différence significative entre les sous-blocs végétalisés avec du trèfle et les lettres grecques indiquent une différence pour les blocs végétalisés avec du sauke et du trèfle ($p < 0,05$) ($n = 3 \pm SE$). * : différence significative ($p < 0,05$) et ns : non significatif, différence entre T0 et T6.

Tableau I.7: Fraction bioaccessible (%) du plomb et de l'arsenic, après ajout d'amendements (T0) et 6,5 mois après l'apport d'amendements (T6) pour les différents blocs. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. NV : non végétalisé, Tr : végétalisé avec *Trifolium repens* STTr : végétalisé avec *Salix* et *Trifolium repens*.

Blocs	Pb			As		
	Phase gastrique	Phase gastro-intestinale	Effet temps	Phase gastrique	Phase gastro-intestinale	Effet temps
PB T0	69,1±0,9 b	6,2±2,4 C	***	13,6±0,0 b	14,8±1,5 A	ns
PB T6 NV	71,2±2,3 b	8,8±0,6 C	***	10,2±0,2 c	20,5±5,2 A	ns
PB T6 Tr	67,6±0,5 b	9,3±0,7 C	***	10,8±0,1 c	13,8±0,6 A	ns
PB T6 STTr	72,7±0,4 b	9,7±1,0 C	***	12,8±0,6 b	15,8±0,0 A	ns
PC T0	74,1±0,5 b	8,5±1,4 C	***	11,1±0,4 bc	13,0±2,7 AB	ns
PC T6 NV	63,9±0,6 c	15,7±1,4 B	***	9,5±0,3 c	9,1±1,6 BC	ns
PC T6 Tr	63,7±0,6 c	10,6±1,2 BC	***	8,4±0,2 d	10,1±0,4 B	ns
PC T6 STTr	59,1±0,1 c	2,8±0,4 E	***	7,8±0,5 d	13,6±0,4 A	*
PBC T0	80,7±1,0 a	7,6±2,3 C	***	20,5±1,7 a	17,2±6,2 A	ns
PBC T6 NV	85,5±3,7 a	0,6±0,2 E	***	8,7±0,1 cd	10,3±2,2 ABC	ns
PBC T6 Tr	88,8±1,5 a	0,2±0,0 E	***	11,9±0,2 b	17,0±0,3 A	*
PBC T6 STTr	85,1±0,6 a	0,2±0,0 E	***	9,6±0,7 cd	14,1±0,7 A	*
PBCS T0	70,1±0,9 b	6,8±0,5 C	***	9,7±0,0 cd	11,5±1,0 AB	ns
PBCS T6 NV	78,7±0,1 ab	1,2±0,1 E	***	10,2±0,0 cd	16,5±3,4 A	ns
PBCS T6 Tr	86,4±1,9 a	6,4±2,0 C	***	9,9±0,2 cd	8,5±0,8 BC	ns
PBCS T6 STTr	78,3±0,6 ab	21,5±0,5 A	*	9,3±0,3 cd	7,7±0,3 C	*

Les lettres minuscules indiquent une différence significative entre les traitements pour la phase gastrique ; les lettres majuscules indiquent une différence significative entre les traitements pour la phase gastro-intestinale ($p < 0,05$) ($n = 3 \pm \text{SE}$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ et ns : non significatif, différence entre T0 et T6.

Tableau I.8 : Suivi de la concentration en plomb (mg.kg^{-1}) dans les feuilles des quatre espèces de saules durant deux années de croissance aux printemps 2017 (T2), automne 2017 (T6), printemps 2018 (T14) et automne 2018 (T20) sur les différents blocs de la parcelle expérimentale. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%.

Blocs et Salix	[Pb] (mg.kg^{-1})			[Pb] (mg.kg^{-1})		
	T2	T6	effet temps	T14	T20	effet temps
PB S.Al	29,1±6,5 b	35,0±0,0 B	ns	85,5±16,8 a	43,0±7,9 A	*
PB S.Vi	16,4±0,8 b	32,8±0,0 B	***	94,7±27,8 a	18,8±4,3 B	ns
PB S.Tr	13,4±3,5 b	20,3±0,0 C	ns	23,6±4,3 a	12,5±2,3 B	*
PB S.Pu	175,6±18,9 a	57,8±0,6 A	*	54,0±6,8 a	20,4±2,7 B	**
PC S.Al	18,0±0,7 a	27,5±0,0 A	***	35,5±11,1 ab	21,9±5,0 AB	ns
PC S.Vi	11,6±2,6 ab	23,9±0,0 B	**	30,6±7,4 a	28,5±4,4 A	ns
PC S.Tr	7,5±1,3 b	11,0±0,0 C	*	17,2±2,3 ab	5,1±1,7 C	**
PC S.Pu	14,6±7,5 ab	20,9±2,76 B	ns	13,7±2,5 b	14,2±1,1 BC	ns
PBC S.Al	14,0±0,8 ab	14,4±0,0 B	ns	61,9±5,7 a	8,8±5,4 A	***
PBC S.Vi	24,4±1,8 a	20,8±0,0 A	ns	28,1±0,7 b	15,9±2,5 A	**
PBC S.Tr	7,2±2,2 b	12,7±0,0 B	ns	35,8±4,5 b	16,5±3,0 A	*
PBC S.Pu	6,9±3,7 b	21,3±0,01 A	*	51,3±1,9 a	22,2±2,0 A	***
PBCS S.Al	23,7±3,1 b	7,9±0,0 B	**	33,1±1,7 a	36,2±1,7 A	ns
PBCS S.Vi	94,7±18,5 a	25,6±0,0 A	*	32,4±3,2 a	16,1±4,0 B	*
PBCS S.Tr	14,1±2,2 b	8,2±0,0 B	*	14,8±1,9 b	18,0±1,1 B	ns
PBCS S.Pu	17,7±9,0 b	11,8±0,0 B	ns	24,7±3,9 ab	31,6±4,2 A	ns

Les lettres minuscules indiquent une différence significative entre les différentes espèces de saules à T0 et à T14 ; les lettres majuscules indiquent une différence significative entre les différentes espèces de saules à T6 et à T20. *** différence significative ($p < 0,001$) entre T2 et T6 ou entre T14 et T20, ** différence significative ($p < 0,01$) entre T2 et T6 ou entre T14 et T20, * différence significative ($p < 0,05$) entre T2 et T6 ou entre T14 et T20 et ns : non significatif. ($n = 3$).

Tableau I.9 : Suivi de la concentration en plomb dans les feuilles des quatre espèces de saules durant deux années de croissance aux printemps 2017 (T2), automne 2017 (T6), printemps 2018 (T14) et automne 2018 (T20) sur les différents blocs de la parcelle expérimentale. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%.

Blocs et Salix	[Pb] (mg.kg ⁻¹)			
	T2	T14	T6	T20
PB S.Al	*			ns
PB S.Vi	**			*
PB S.Tr	*			*
PB S.Pu	*			***
PC S.Al	ns			ns
PC S.Vi	**			ns
PC S.Tr	*			*
PC S.Pu	ns			ns
PBC S.Al	**			ns
PBC S.Vi	ns			ns
PBC S.Tr	*			ns
PBC S.Pu	**			ns
PBCS S.Al	ns			***
PBCS S.Vi	**			ns
PBCS S.Tr	ns			***
PBCS S.Pu	ns			**

*** différence significative ($p < 0,001$) entre T2 et T6 ou entre T14 et T20, ** différence significative ($p < 0,01$) entre T2 et T6 ou entre T14 et T20, * différence significative ($p < 0,05$) entre T2 et T6 ou entre T14 et T20 et ns : non significatif. (n = 3).

Tableau I.10 : Facteurs de bioconcentration (FBC) de plomb pour les quatre espèces de saules et pour le trèfle durant deux années de croissances, à T2, T6, T14 et T20, sur les différents blocs de la parcelle expérimentale. T2 : prélèvements 2 mois après amendement, T6 : prélèvements six mois après amendement, T14 : prélèvements 14 mois après amendement, T20 : prélèvements 20 mois après amendement. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. S.Vi : *Salix viminalis*, S.Al : *Salix alba*, S.Tr : *Salix triandra*, S.Pu : *Salix purpurea*.

Blocs	Pb FBC			
	T2	T6	T14	T20
<i>Salix</i>				
PB S.Vi	0,00	0,00	0,01	0,00
PB S.Al	0,00	0,00	0,01	0,01
PB S.Tr	0,00	0,00	0,00	0,00
PB S.Pu	0,02	0,00	0,01	0,00
PC S.Vi	0,00	0,00	0,00	0,00
PC S.Al	0,00	0,00	0,00	0,00
PC S.Tr	0,00	0,00	0,00	0,00
PC S.Pu	0,00	0,00	0,00	0,00
PBC S.Vi	0,00	0,00	0,00	0,00
PBC S.Al	0,01	0,00	0,01	0,00
PBC S.Tr	0,00	0,00	0,00	0,00
PBC S.Pu	0,01	0,00	0,01	0,00
PBCS S.Vi	0,01	0,00	0,00	0,00
PBCS S.Al	0,02	0,00	0,00	0,00
PBCS S.Tr	0,01	0,00	0,00	0,00
PBCS S.Pu	0,01	0,00	0,00	0,00
<i>Trifolium repens</i>				
PC	ND	0,13	0,04	0,15
PBC	ND	0,04	0,05	0,06
PBCS	ND	0,11	0,06	0,05

ND = Non déterminé

Tableau I.11 : Suivi de la concentration en arsenic (mg.kg^{-1}) dans les feuilles des quatre espèces de saules durant deux années de croissance aux printemps 2017 (T2), automne 2017 (T6), printemps 2018 (T14) et automne 2018 (T20) sur les différents blocs de la parcelle expérimentale. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%.

Blocs et Salix	[As] (mg.kg^{-1})			[As] (mg.kg^{-1})		
	T2	T6	effet temps	T14	T20	effet temps
PB S.Al	4,8±1,5 bc	6,9±0,3 B	ns	28,7±1,8 a	22,8±2,5 A	ns
PB S.Vi	7,2±2,1 bc	9,3±0,2 A	ns	31,2±4,5 a	25,4±2,4 A	ns
PB S.Tr	4,0±1,8 c	3,5±0,7 C	ns	25,1±1,7 a	27,8±0,7 A	ns
PB S.Pu	12,6±1,9 ab	10,4±0,3 A	ns	28,0±1,8 a	29,0±1,4 A	ns
PC S.Al	6,5±0,1 a	9,0±2,1 A	ns	22,0±3,6 a	31,7±2,9 A	ns
PC S.Vi	7,3±0,6 a	7,5±0,8 A	ns	27,5±2,3 a	33,1±3,6 A	ns
PC S.Tr	6,0±1,9 a	3,7±1,3 A	ns	31,5±7,7 a	30,0±0,9 A	ns
PC S.Pu	7,6±0,74 a	5,9±0,3 A	ns	22,4±2,4 a	30,1±5,9 A	ns
PBC S.Al	5,6±0,3 a	3,4±1,4 A	ns	25,5±4,7 a	24,4±6,2 A	ns
PBC S.Vi	6,7±0,5 a	7,1±1,8 A	ns	39,4±6,8 a	31,2±2,2 A	ns
PBC S.Tr	5,8±1,9 a	3,9±1,5 A	ns	32,4±3,3 a	26,6±2,5 A	ns
PBC S.Pu	6,7±4,9 a	5,0±0,4 A	ns	23,5±0,8 a	27,8±2,0 A	ns
PBCS S.Al	9,1±2,0 ab	1,5±1,3 A	ns	26,1±2,3 a	27,5±1,7 A	ns
PBCS S.Vi	15,6±2,5 a	3,6±1,9 A	*	24,5±1,2 a	30,1±4,2 A	ns
PBCS S.Tr	8,0±0,9 b	5,3±1,9 A	ns	22,0±1,8 a	30,0±1,3 A	*
PBCS S.Pu	7,4±2,6 ab	3,1±0,9 A	ns	29,0±2,2 a	25,7±4,9 A	ns

Les lettres minuscules indiquent une différence significative entre les différentes espèces de saules à T0 et à T14 ; les lettres majuscules indiquent une différence significative entre les différentes espèces de saules à T6 et à T20. *** différence significative ($p < 0,001$), ** différence significative ($p < 0,01$), * différence significative ($p < 0,05$) et ns : non significatif. ($n = 3$).

Tableau I.12 : Suivi de la concentration en arsenic (mg.kg^{-1}) dans les feuilles des quatre espèces de saules durant deux années de croissance aux printemps 2017 (T2), automne 2017 (T6), printemps 2018 (T14) et automne 2018 (T20) sur les différents blocs de la parcelle expérimentale. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%.

Blocs et Salix	[As] (mg.kg^{-1})			
	T2	T14	T6	T20
PB S.Al	***			**
PB S.Vi	***			**
PB S.Tr	*			***
PB S.Pu	**			**
PC S.Al	**			**
PC S.Vi	***			**
PC S.Tr	*			***
PC S.Pu	*			*
PBC S.Al	*			*
PBC S.Vi	**			***
PBC S.Tr	**			***
PBC S.Pu	**			***
PBCS S.Al	**			***
PBCS S.Vi	**			**
PBCS S.Tr	**			***
PBCS S.Pu	**			**

*** différence significative ($p < 0,001$) entre T2 et T6 ou entre T14 et T20, ** différence significative ($p < 0,01$) entre T2 et T6 ou entre T14 et T20, * différence significative ($p < 0,05$) entre T2 et T6 ou entre T14 et T20 (n = 3).

Tableau I.13 : Facteurs de bioconcentration (FBC) de l'arsenic pour les quatre espèces de saules et pour le trèfle durant deux années de croissances, à T2, T6, T14 et T20, sur les différents blocs de la parcelle expérimentale. T2 : prélèvements 2 mois après amendement, T6 : prélèvements six mois après amendement, T14 : prélèvements 14 mois après amendement, T20 : prélèvements 20 mois après amendement. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. S.Vi : *Salix viminalis*, S.Al : *Salix alba*, S.Tr : *Salix triandra*, S.Pu : *Salix purpurea*.

Blocs	As FBC			
	T2	T6	T14	T20
<i>Salix</i>				
PB S.Vi	0,01	0,01	0,04	0,03
PB S.Al	0,01	0,01	0,04	0,03
PB S.Tr	0,01	0,00	0,06	0,04
PB S.Pu	0,01	0,01	0,04	0,04
PC S.Vi	0,01	0,01	0,03	0,03
PC S.Al	0,01	0,01	0,02	0,03
PC S.Tr	0,01	0,01	0,03	0,03
PC S.Pu	0,01	0,01	0,02	0,03
PBC S.Vi	0,01	0,00	0,05	0,04
PBC S.Al	0,01	0,01	0,03	0,03
PBC S.Tr	0,01	0,00	0,04	0,03
PBC S.Pu	0,01	0,01	0,03	0,03
PBCS S.Vi	0,01	0,00	0,04	0,04
PBCS S.Al	0,01	0,01	0,04	0,04
PBCS S.Tr	0,01	0,01	0,03	0,04
PBCS S.Pu	0,01	0,00	0,04	0,04
<i>Trifolium repens</i>				
PC	ND	0,05	0,03	0,03
PBC	ND	0,02	0,04	0,04
PBCS	ND	0,06	0,04	0,04

ND = Non déterminé

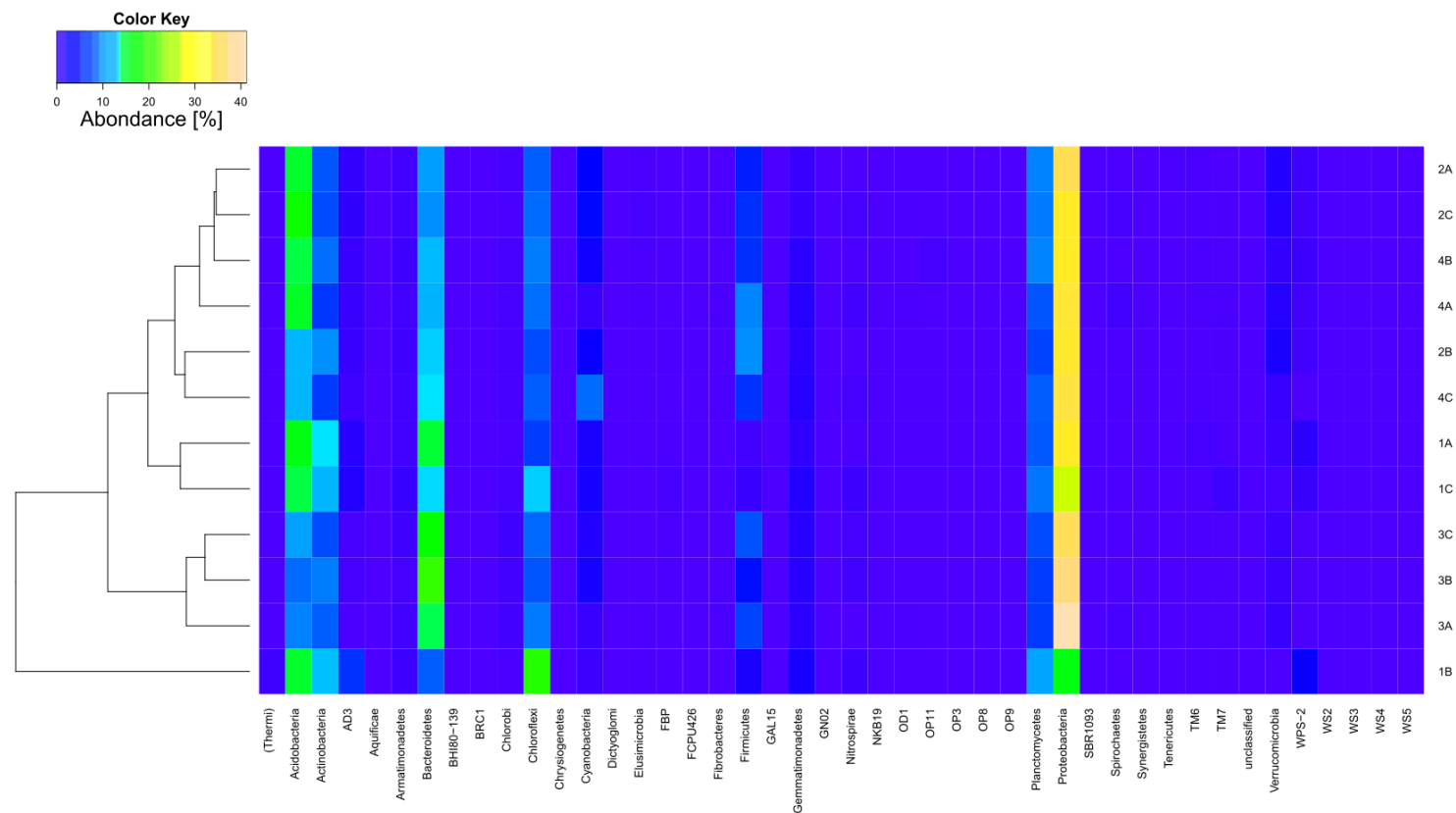


Figure I.1 : Comparaison de la structure de la diversité bactérienne au niveau phylum. Les échantillons sont comparés en fonction de l’abondance de leur phylum (en pourcentage). L’intensité de la couleur dans chaque panneau indique le pourcentage d’un phylum dans un échantillon, en se référant à la clé de couleur en haut à gauche. 1A correspond à PB NV, 1B à PB Tr, 1C à PB STr ; 2A correspond à PC NV, 2B à PC Tr, 2C à PC STr, 3A correspond à PBC NV, 3B à PBC Tr, 3C à PBC STr et enfin 4A correspond à PBCS NV, 4B à *PBCS* Tr et 4C à PBCS STr.

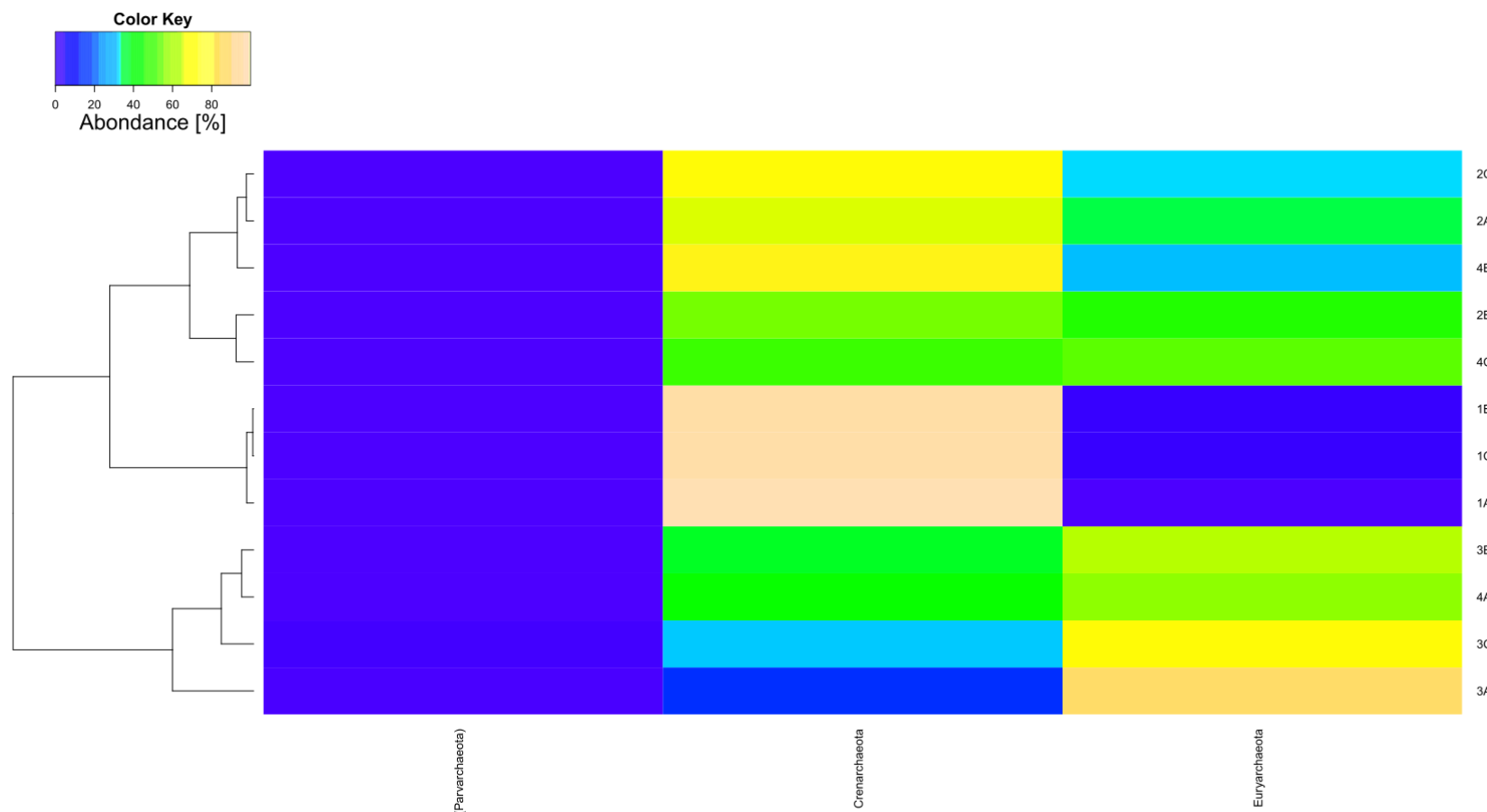


Figure I.2 : Comparaison de la structure de la diversité archée au niveau phylum. Les échantillons sont comparés en fonction de l'abondance de leur phylum (en pourcentage). L'intensité de la couleur dans chaque panneau indique le pourcentage d'un phylum dans un échantillon, en se référant à la clé de couleur en haut à gauche. 1A correspond à PB NV, 1B à PB Tr, 1C à PB STr ; 2A correspond à PC NV, 2B à PC Tr, 2C à PC STr, 3A correspond à PBC NV, 3B à PBC Tr, 3C à PBC STr et enfin 4A correspond à PBCS NV, 4B à *PBCS* Tr et 4C à PBCS STr.

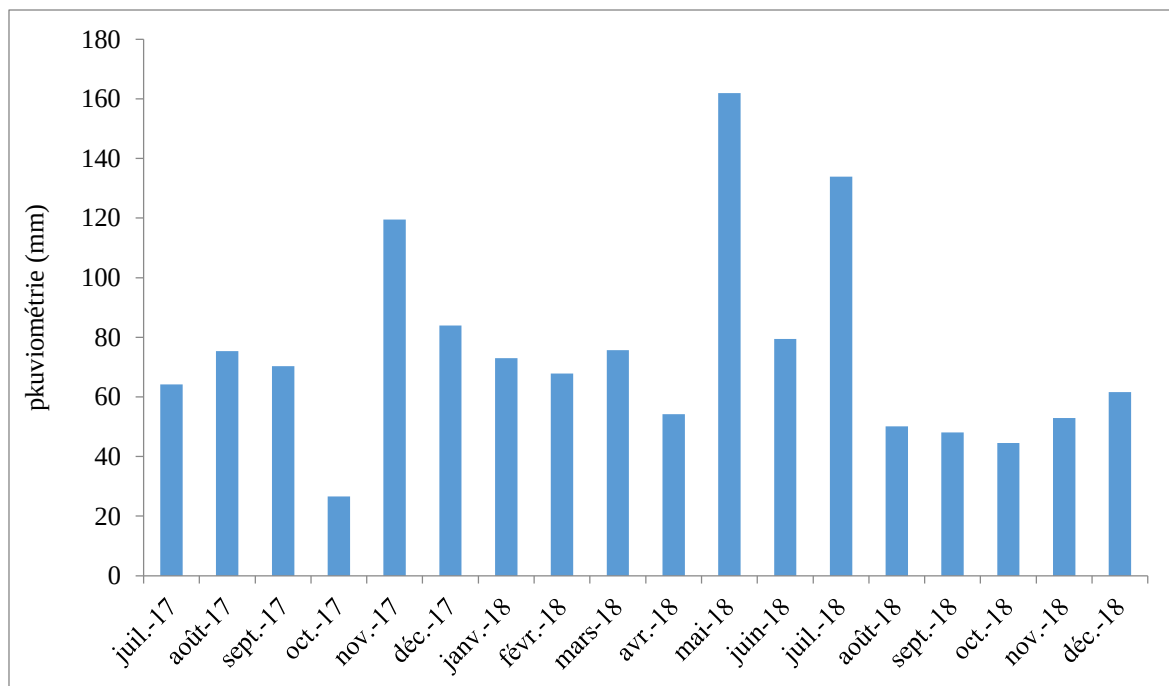


Figure I.3 : Cumul des précipitations mensuel en mm récupérées sur trois stations à proximité de la parcelle expérimentale (stations de Gelle, Olby et Pontgibaud) sur la période juillet 2017 décembre 2018.

Tableau I.14 : Vraition mensuelle de la profondeur de l'eau hypodermique sur la période juillet 2017 octobre 2018 sur les différents sous-blocs de la parcelle expérimentale. (P) : Sol de Pontgibaud, (PB) : P + Biochar 2%, (PC) : P + Compost 5%, (PBC) : P + Biochar 2% + Compost 5%, (PBCS) : P + Biochar 2% + Compost 5% + Sulfate de fer 0,15%. NV : non végétalisé, Tr : végétalisé avec *Trifolium repens* STr : végétalisé avec *Salix* et *Trifolium repens*.

Sous-blocs	juil-17	août-17	sept-17	oct-17	nov-17	déc-17	janv-18	févr-18	mars-18	avr-18	mai-18	juin-18	juil-18	août-18	sept-18	oct-18
PB T6 NV	46	49	53	55	50	30	38	38	35	37	43	64	56	62	60	60
PB T6 Tr	49	51	57	56	50	31	39	39	36	37	43	66	53	63	59	61
PB T6 STr	45	49	53	50	46	30	35	35	31	35	39	60	48	57	57	56
PC T6 NV	48	48	52	53	45	26	33	34	30	34	38	64	50	59	58	57
PC T6 Tr	24	28	32	32	26	9	14	13	11	13	18	39	32	40	42	38
PC T6 STr	28	30	32	33	28	13	15	15	13	15	20	44	29	41	39	38
PBC T6 NV	31	30	30	34	35	17	20	19	18	20	24	39	32	38	39	36
PBC T6 Tr	37	35	33	36	33	20	17	16	16	18	23	42	32	40	42	39
PBC T6 STr	32	30	33	36	33	23	24	24	24	25	27	46	36	39	40	39
PBCS T6 NV	34	32	36	37	34	23	25	25	23	25	28	43	36	41	41	40
PBCS T6 Tr	33	31	35	36	33	20	23	23	21	25	28	42	38	40	40	39
PBCS T6 STr	23	25	26	29	28	18	19	19	17	19	22	35	30	33	34	32

ANNEXE 2

Effect of Biochar and Amendments on Pb and As Phytotoxicity and Phytoavailability in a Technosol

Romain Nandillon, Florie Miard, Manhattan Lebrun, Marie Gaillard, Stéphane Sabatier, Sylvain Bourgerie, Fabienne Battaglia-Brunet, and Domenico Morabito*

Phytostabilization has been proposed as a promising tool for long-term management of polluted sites. Optimization of the process efficiency involves choosing suitable amendments to allow both efficient plant growth and the immobilization of contaminants. The objectives of this study are to evaluate the effect of amendments on (i) the physicochemical properties of technosol and (ii) the mobility and phyto-availability of metal(loid)s. A dwarf bean growth test is conducted on technosols amended with compost, garden soil, slag, and biochar. The physicochemical properties of soil pore water (SPW) are determined as well as the phyto-available concentrations of metal(loid)s by simple extraction tests. All amendments used are able to increase SPW pH and electrical conductivity, allowing a decrease in the lead concentration in SPW by 90% and the lead phytoavailable part by 93%. However, for all amendments, SPW As concentration increased. Lastly, the amendments improve bean growth and tend to decrease the metal(oid) concentrations in aerial organs. As concentration in roots did not decrease whereas Pb concentration decreased. Metal(loid) concentrations of Pb accumulated in the aerial parts of beans and their extractable concentrations show a significant positive correlation with the extraction procedures. In contrast, the phytoavailable As shows a weak correlation with As concentrations in the aerial parts. The 1-M NH_4NO_3 extraction procedure is the most appropriate and provides the most useful indications of the phyto-availability for the studied elements.

1. Introduction

High concentrations of metal(loid)s in soils generated by mining activities could have negative effects on health when spread into the environment through wind and water erosion. One of the key factors in decreasing health risks and rehabilitating these polluted areas is a thorough understanding of the metal(loid) dynamics, not only within the soils, but also in their transfer to the environment. The rehabilitation of these sterile sites by adding amendments will improve their agronomic characteristics and stabilize the metal(loid)s in the soil, allowing the establishment of a plant cover which will limit the spread of metal(loid)s. Therefore, it is important to study the soil characteristics that control the phyto-availability of metal(loid)s and their accumulation in plants. Measuring the total toxic element contents in a soil will not give information about their potential mobilization and transfer to the environment. It is therefore necessary to study their bioavailability in order to estimate the potential danger linked to a possible run off of such toxic elements firstly into the hydrosphere, and then into living organisms such as plants.

The final consequence will be a negative effect on human health due to entry into the food chain.^[1] Therefore, it appears to be important to get more information on metal(loid) availability in soil and their uptake by aerial organs of plants.

The International Organization for Standardization (ISO) defines bioavailability as chemicals in soils that can be absorbed or metabolized by humans or ecological receptors, or that are available for interaction with biological systems (ISO 11074, 2005). The phyto-availability of metals in soils depends on the metal(loid) species and their distribution between the solid phase and the pore water due to the soil physico-chemical characteristics. Thus, many studies have been carried out on polluted soil to evaluate metal(loid) phyto-availability.^[1,2] Moreover, a wide range of individual and sequential extraction schemes have been designed to evaluate the different forms of metal binding in soils using neutral salts (CaCl_2 and NH_4NO_3).^[3]

R. Nandillon, F. Miard, M. Lebrun, Dr. S. Bourgerie, Dr. D. Morabito
 University of Orleans
 INRA USC1328
 LBLGC EA 1207 Orléans, France
 E-mail: domenico.morabito@univ-orleans.fr

R. Nandillon, Dr. M. Gaillard, S. Sabatier
 IDEEA
 Environmental Consulting Engineering
 Olivet 45160, France

R. Nandillon, Dr. F. Battaglia-Brunet
 BRGM
 ISTO
 UMR 7327 Orléans, France

M. Lebrun
 University of Molise, Dipartimento di Bioscienze e Territorio
 Pesche 86090, Italy

DOI: 10.1002/clean.201800220

Plant ability to stabilize metal(loid)s in soils can be improved by using amendments that will reduce the mobility and bioavailability of metal(loid)s. Moreover, such amendments will contribute to the restoration of physical and chemical soil properties, as well as promoting efficient agronomical properties.^[4–6] Several organic and inorganic amendments (compost, biosolids, lime, coal fly ash, phosphates, red mud, iron shot, and Fe/Mn/Al oxides) on polluted soils have already been proposed to enhance metal(loid) soil immobilization and biomass production.^[6–8] Such bioavailability reduction is achieved by various complex processes, for example adsorption on mineral surfaces, formation of stable compounds with organic ligands, surface precipitation, and ion exchange.^[6] Finally, the addition of organic-rich amendments such as compost, manure, various organic wastes, garden soil or biochar,^[9,10] is commonly known to stimulate plant growth. However, these various amendments can add metal(loid)s to the soil. It is therefore essential to carry out preliminary analyses of the amendments, to make sure they are free of any contaminants.

The effect of organic matter on the bioavailability of metal(loid)s in a specific soil depends on amendment characteristics such as: (i) nature, (ii) microbial degradability, (iii) salt content, and (iv) effects on soil pH and redox potential.^[11] Moreover, organic amendments may contain a high proportion of highly variable humified organic matter, which has a great capacity to interact with metal ions and to mobilize or immobilize metal(loid)s^[12] by the formation of either more or less stable complexes.

Organic matter can also compete with As for sorption sites, and displace As(V) and As(III) from iron oxides (hematite).^[13] It can influence the speciation of arsenic.^[14]

However, the supply of organic matter is essential for plant growth. Thus, an effective amendment for arsenic immobilization must be used, as shown by Le Forestier et al.,^[15] where alkaline slags (a by-product of the iron and steel industry containing metal oxides) have been used to improve contaminated acid soils by making metals less soluble through oxidation precipitation and adsorption on the slag surfaces. Amorphous Fe(III) hydroxide (ferrihydrite), which is present in slag, can be an effective sorbent for anions and cations. Possible adsorption of arsenite, As(III), As(V) and arsenate, on ferrihydrite are summarized by Jain et al.^[16] The surface of the Fe hydroxide particles can be positively or negatively charged depending on the pH, allowing them to be amphoteric Fe hydroxide compounds. Leupin and Hug^[17] observed that the slow and continuous release of Fe(II) in soils by the corrosion of iron provides ideal conditions for the oxidation of As(III) to As(V), which is easily adsorbed to iron hydroxides.

Among the organic amendments, biochar is considered an alkaline amendment able to increase soil pH, which induces Pb soil immobilization.^[6,18] However, alkaline materials are described as undesirable in As-contaminated soils since they increase ion leaching, including As.^[19] The same negative results on As mobilization have been observed when contaminated soil was amended with lime.^[20] In contrast, Hartley et al.^[19] found that lime could reduce arsenic leaching in moderation by the possible formation of As–Ca precipitant complexes (calcium hydrogenarsenate, CaHAsO_4 , and calcium arsenate,

$\text{Ca}_3(\text{AsO}_4)_2$) under highly oxidizing and moderate pH conditions.^[21]

In addition, the application of biochar improves plant growth by improving the agronomic properties of soils. Agegnehu et al.^[22] demonstrated that addition of biochar (either alone or in combination with compost) improved peanut yield for site and pot experiments. These positive effects were associated with better plant N, P, and K uptake and an increase in soil-soluble organic carbon availability to soil microorganisms. Gartler et al.^[23] demonstrated an efficient biochar effect on plants' Ca, Mg, and Zn availability, and on soil water retention capacity.

The objective of the present study was to evaluate the influence of a range of amendments on the phyto-availability of As and Pb, two toxic elements present in a mining technosol with contrasting biogeochemical behaviors. Biochar was used due to its capacity to immobilize Pb when added to a metal(loid) contaminated mining soil.^[2] Slag amendment was associated to biochar in order to limit the As soil pore water availability which had increased levels in the presence of biochar. For this purpose, As and Pb mobility were measured in soil pore water (SPW) and in the soil salt extractable fraction of amended and non-amended soils. Phytotoxicity tests using bean germination were established, with plant dry weight, and As and Pb metal(loid) organ concentrations being measured and correlated to metal(loid) concentration in SPW.

2. Experimental Section

2.1. Soil Sampling

The studied site was in Roure-les-Rosiers, located in the Massif Central near Clermont-Ferrand (Saint-Pierre-le-Chastel (63), France) and was a former silver-lead extraction mine in the Pontgibaud mining district. The site is crossed by two rivers: the Veyssière, which constitutes the southern edge of the deposits, and the Faye which borders the northwest edge of the deposits before crossing them to join the Veyssière. The coordinates of the study area in Lambert II are: X: 638147.54; Y: 2087962.79.

The old mining site is subject to a semi-continental climate with hot summers (up to 40  C), which can be marked by severe and localized thunderstorms, and snowy winters. On average, the Roure-les-Rosiers sector receives about 770 mm rainfall/year and is located at around 700 m.a.s.l.

The area mainly consists of deposits of silver-bearing lead ore that still contain a certain number of toxic elements (mainly lead $11655 \pm 448 \text{ mg kg}^{-1}$ and arsenic $483 \pm 13 \text{ mg kg}^{-1}$).

Surface soils (0–20 cm) were sampled with a stainless-steel shovel. All soil samples collected were carefully transferred to clean polyethylene bags before being transported to the laboratory. The collected soil samples were air dried (40  C) and homogenized manually. One fraction was used to determine the physico-chemical properties of the soil while the other fraction was used for the chemical analysis of the metal(loid)s.

Samples for chemical analysis were screened first using a 2-mm mesh sieve to remove crude plant material.^[1]

2.2. Soil Physicochemical Analysis

The pH and electrical conductivity were determined according to AFNOR NF T01-013, using a combined pH-EC meter (WTW, Profiline 1970i, Germany).

Total organic carbon (TOC) was determined in the soil samples by Rock-Eval pyrolysis (Rock-Eval 6 Turbo; Vinci Technologies, France).^[24]

2.3. Amendments

The different types of amendments selected for this study were garden soil, slag, compost, and biochar (Table 1).

Garden soil was collected on the grounds of the University of Orleans, France. The garden soil allows an input of organic matter as well as essential elements. Its purchase cost is very low, generating a low financial impact. However, it can be of great heterogeneity, with soils of varying quality.

The base slag Valorseed 630 semolina was supplied by AXERREAL. Slag is a steel-based amendment used to improve soil characteristics in the context of agronomic studies (e.g., improvement of soil fertilization and soil pH in acid soils). This basic slag is composed of Ca, P, and metal oxides, and is an alkaline by-product of steel plants and waste incineration processes.

The compost used in this study was an Algoflash horticultural compost (NF U44-551 growing medium) composed of peat moss, softwood bark compost, green compost, seaweed (Compo France, Roche-lez-Beaupré, France).

Biochar was supplied by La Carbonerie (Crissey, France). It was obtained from a slow pyrolysis (500 °C) of platelets and hardwood chips, composed of oak biomass, hornbeam, and beech. After pyrolysis, the product was passed through different sieves to recover a particle size range of 0.2–0.4 mm.

2.4. Soil Mixture Preparation

All types of amendments as well as the Pontgibaud technosol (Ps) were homogenized and sieved at 2 mm. Amendments (biochar (B), compost (C), garden soil (G), slag (S)) were mixed according to the combinations and the ratios are listed in Table 2.

A mixture of B with Ps was distributed into different batches for the following treatments: Ps + B, Ps + B + C, Ps + B + G, and

Table 2. Treatment designations and percentage of different amendments per treatment

Sample	Modality and amendment percentage (w/w)
Ps	Pontgibaud soil (Ps)
PsC	Ps + Compost (C) 5%
PsG	Ps + Garden soil (G) 5%
PsS	Ps + Slag (S) 2.5%
PsCS	Ps + C 5% + S 2.5%
PsB	Ps + Biochar (B) 2%
PsBC	Ps + B 2% + C 5%
PsBG	Ps + B 2% + G 5%
PsBS	Ps + B 2% + S 2.5%
PsBCS	Ps + B 2% + C 5% + S 2.5%

Ps + B + C + S (Table 2). The different amendments were added, then the mixtures were divided into five replicates. A compost mixture was also prepared for treatments: Ps + C and Ps + C + S, and then each mixture was divided into five replicates. This procedure was applied to limit weighing errors and to have better sample representation. A total of 300 g of mixture was distributed into each pot. The pots were then placed outside for 30 days for soil equilibration. The seeds were then added and left for 13 days. The total duration of the experiment was 43 days.

2.5. Germination Tests

Before being seeded, *Phaseolus vulgaris* "contender" variety seeds (dwarf bean) were sprouted in perlite. After 3 days the most homogeneous germinations were chosen and placed in the pots containing the technosol with different amendments. Two dwarf bean seedlings were sown in each pot and cultivated for 13 days in controlled conditions (16 h light/8 h darkness regime, 25 °C/21 °C with an approximate photon flux of 800 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The soil water holding capacity was kept between 55 and 65% by measuring the weight of each pot daily. It was adjusted with deionized water throughout the experimental period.

2.6. Pore Water Analysis

Soil pore water was collected twice during the growth experiment: at the beginning (T0) and at the end of the experiment, on day 13 (TF), before harvesting the plants. SPW sampling was performed using soil moisture samplers (Rhizon) (model MOM, Rhizosphere Research Products, Wageningen, the Netherlands), placed in pots at an angle of 45° over the entire depth of the pot (10 cm), and into the root system of the plant.

Collected SPWs were used directly to measure: (1) pH (pH-meter, FE20/EL20, Mettler-Toledo), (2) electrical conductivity (EC) (multimeter, WTW Multi 1970i, GEOTECH, Denver, Colorado), and (3) dissolved organic carbon (DOC), determined by a Teckmar–Dohrman Phoenix 8000 TOC analyzer. Total dissolved metal(loid) concentrations (As, Pb) were determined by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy

Table 1. Physico-chemical properties of the amendments.

	Compost	Biochar	Garden soil	Slag
Granulometry (mm)	ND	0.2–0.4	<2	<2
pH	7.4 ± 0.0a	9.0 ± 0.0b	5.5 ± 0.0c	9.2 ± 0.0b
EC (μScm^{-1})	801 ± 24a	432 ± 2b	553 ± 2c	3266 ± 13d
WHC (%)	51 ± 1a	183 ± 3b	30 ± 2a	ND

ND, not determined; WHC, water holding capacity (% mass). Letters indicate significant difference ($p < 0.05$) ($n = 5$) between compost, biochar, garden soil, and slag.

(ICP-AES) (ULTIMA 2, HORIBA, Labcompare, San Francisco, USA) after acidification, according to Bart et al.^[25]

2.7. Plant Analysis

Plants were harvested 13 days after sowing. The above-ground plant tissues (primary leaves) were cut and rinsed thoroughly with double deionized water. Rinsed leaves were dried at 40 °C for 72 h before recording the dry matter yield. Roots were washed abundantly with tap water (twice) and washed once in distilled water to remove soil particles bound to roots. The bean organs were dried at 40 °C for 72 h before recording the dry matter yield, then ground with a laboratory grinder and digested using aqua regia with a pressurized vacuum microwave system (Multiwave 3000, Anton Paar, Austria).

The digestion program consisted of a gradual increase of 15 min at 180 °C, a digestion step of 15 min at 180 °C followed by a cooling step stopping at 55 °C for 15 min. After cooling to room temperature, the samples were added to 30 mL of ultra-pure water (18 MΩ cm⁻¹) and then filtered under vacuum on a 0.45-μm nitrocellulose membrane. ICP-AES measurements were performed from plant digestions to determine metal(loid) concentrations in dwarf bean organs.

2.8. As and Pb Pseudo-Total and Phytoavailable Concentrations

Soil was analyzed at the end of the experiment. The pseudo-total element concentrations were determined by aqua regia treatment with a solid/liquid ratio of 1/45.9 mL of aqua regia (HNO₃ (65%)/HCl (37%), 1:3 v/v) were added. The digestion program consisted of a gradual increase in temperature to 180 °C over 15 min, a digestion step of 15 min at 180 °C, followed by a 15 min cooling step. After cooling to room temperature, the samples were taken up in a volume of 50 mL with ultra-pure water (18 MΩ cm⁻¹) and then filtered on a 0.45-μm nitrocellulose membrane.

The As and Pb phytoavailable fractions were obtained as described by Qasim et al.^[1] using two extractants: (i) CaCl₂ and (ii) NH₄NO₃. The acidified supernatants were stored at 4 °C until analysis. Metal(loid) concentrations were determined by ICP-AES (ULTIMA 2, HORIBA, Labcompare, San Francisco, USA).

2.9. Statistical Analysis

All tests were performed in five replicates and results are presented as mean ± standard error. The data were analyzed statistically using R statistical software Version 3.1.2 (R Development Core Team, 2009). Statistical analysis included calculation of Pearson's correlation coefficient to determine the relationships between the metal(loid) concentrations in the aerial parts of dwarf bean, and the extractable metal(loid) concentrations in soils for the different single extraction methods. The correlations were examined based on concentrations in dry plant weight. The level of significance was set at $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1. Effects of Amendments and Plants on Soil and SPW Properties

At the beginning of the experiment the pH of the technosol SPW was acidic (4.57 ± 0.08) and EC was $713 \pm 11 \mu\text{S cm}^{-1}$ (Table 3). No significant difference was observed between T0 and TF for either the pH or EC of SPW.

When adding amendments to Pontgibaud soil (Ps), SPW pH and EC increased significantly ($p < 0.05$). However, converse effects were observed when comparing amendments. At the end of the experiment, garden soil addition was the least efficient in increasing SPW pH (5.02 ± 0.04). Whereas for compost, slag or biochar when added alone or in combination, the SPW pH value reached 7.5. When added alone to Ps, compost and biochar increased Pontgibaud SPW pH in the same way and did not induce statistical differences between treatments.

Pontgibaud SPW EC at the beginning and end of the experiment was $\approx 700 \mu\text{S cm}^{-1}$. EC doubled when compost, garden soil or biochar were added to Ps, whereas slag amendment when added alone or in combination with the other three tested amendments caused an EC increase ($1979\text{--}2408 \mu\text{S cm}^{-1}$).

Such pH evolution was consistent with other studies.^[26,27] Jones et al.^[28] found a pH increase of a Cu-contaminated soil (clayey sand) correlating with biochar applications from 1 to 3%. In 2013, Chintala et al.^[29] also observed an increase in pH and EC after a 2, 4, or 6% biochar application to an acid soil from a cultured Entisol. Moreover, Beesley et al.^[27] showed that the pH of the pore water of a contaminated soil increased from 3.8 to 7.1, with addition of compost combined with biochar.

This increase in pH can be explained by two mechanisms: (i) the biochar alkaline pH induces a liming,^[2] and (ii) the

Table 3. SPW physico-chemical characteristics (pH, EC, and DOC) in the different treatments, at the beginning (T0) and at the end of the experiment (TF) (13 days).

	pH		EC ($\mu\text{S cm}^{-1}$)		DOC (mg L^{-1})
	T0	TF ^{ns}	T0	TF ^{ns}	TF
Ps	$4.57 \pm 0.08a$	$4.50 \pm 0.03a$	$713 \pm 11a$	$670 \pm 24a$	$5.62 \pm 0.30a$
PsC	$7.12 \pm 0.05b$	$7.22 \pm 0.04b$	$1331 \pm 3b$	$1347 \pm 9b$	$29.05 \pm 4.40b$
PsG	$4.97 \pm 0.01c$	$5.02 \pm 0.04c$	$1422 \pm 5c$	$1406 \pm 8c$	$6.32 \pm 0.45a$
PsS	$7.61 \pm 0.04d$	$7.70 \pm 0.04d$	$2408 \pm 40d$	$2417 \pm 44d$	$7.44 \pm 2.33ad$
PsCS	$7.72 \pm 0.02d$	$7.73 \pm 0.02d$	$2137 \pm 15e$	$2137 \pm 15e$	$43.65 \pm 3.86c$
PsB	$7.28 \pm 0.02b$	$7.24 \pm 0.02b$	$1307 \pm 32b$	$1307 \pm 32b$	$7.17 \pm 1.09a$
PsBC	$7.52 \pm 0.02e$	$7.57 \pm 0.05e$	$1347 \pm 9b$	$1344 \pm 8b$	$27.25 \pm 4.85b$
PsBG	$7.28 \pm 0.02b$	$7.25 \pm 0.02b$	$1406 \pm 8c$	$1404 \pm 10c$	$7.31 \pm 0.56a$
PsBS	$7.56 \pm 0.02f$	$7.60 \pm 0.01f$	$2367 \pm 54d$	$2367 \pm 54d$	$11.91 \pm 1.35d$
PsBCS	$7.75 \pm 0.02d$	$7.76 \pm 0.02d$	$1979 \pm 26f$	$1979 \pm 26f$	$47.91 \pm 7.34c$

(Ps): Pontgibaud soil, (PsC): Ps + compost (C) 5%, (PsG): Ps + garden soil (G) 5%, (PsS): Ps + slag (S) 2.5%, (PsCS): Ps + C 5% + S 2.5%, (PsB): Ps + biochar (B) 2%, (PsBC): Ps + B 2% + C 5%, (PsGB): Ps + B 2% + G 5%, (PsBS): Ps + B 2% + S 2.5%, (PsBCS): Ps + B 2% + C 5% + S 2.5%. Letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) ($n = 5$). ns, no significant difference between T0 and TF.

incorporation of biochar and soil organic amendments allows the acidity of the soil solution to be reduced by the proton consumption reactions in the soil.^[2,29]

The low pH increase measured on PsG can be attributed to the fact that the pH of the garden soil was close to that of the technosol and lower than that of the other amendments.

The EC of Ps was low $713 \pm 11 \mu\text{S cm}^{-1}$ and was significantly increased by biochar addition $1307 \pm 32 \mu\text{S cm}^{-1}$. To a lesser extent, the same results were observed by Molnár et al.^[26] as EC increased by 24% when 0.1% biochar of paper fiber feedstock was added to a sandy agricultural soil in Hungary.

The biochar and compost amendments significantly increased the TOC in the solid phases (Table S1, Supporting Information), whereas garden soil and slag did not. Pontgibaud DOC value was 5.62 mg L^{-1} . When G, S, or B were added alone to Ps no significant difference was observed between these treatments and Ps. Treatments with C showed the highest DOC levels from 29.05 ± 4.40 to $47.91 \pm 7.34 \text{ mg L}^{-1}$. When C was added alone to Ps or in combination with B, DOC increased significantly by about five times ($27.25 \pm 4.85 \text{ mg L}^{-1}$). This effect was amplified when S was added as a supplementary amendment and DOC reached a value of around 45 mg L^{-1} . Finally, when S and B were added to Ps, DOC was only doubled ($11.91 \pm 1.35 \text{ mg L}^{-1}$).

According to Beesley et al.^[27] treatments including compost induced a significant increase of DOC in SPW. But it should also be noted that for all modalities containing slag associated with one or more amendments (B and C), DOC levels were significantly higher than PsS from 11.91 ± 1.35 to $43.65 \pm 3.86 \text{ mg L}^{-1}$. The influence of biochar on the DOC in SPW was weak. Whether biochar was applied on field or on pot studies, Jones et al.^[28] showed that biochar amendment did not induce variations in SPW DOC concentrations, even though biochar is mainly composed of carbon. This is explained by the biochar carbon being refractory to physico-chemical or micro-organisms degradation. It has been demonstrated that the biochar carbon pool is relatively stable and insoluble for centuries and could not be remobilized.^[27] The modalities containing compost demonstrated a higher DOC rate, which could be explained by the fact that even though the compost is mainly composed of refractory humified material it is also composed of fresh organic matter, and therefore very labile.^[30] Compost provides more labile organic carbon than biochar, which would explain a higher DOC concentration.

The presence of slag mixed with biochar or compost increases SPW DOC content, which means that the minerals brought in by the slag could compete with some organic matter, inducing the solubilization of specific carbonic chemical groups released in SPW.^[30] However, it must be mentioned that in some studies a decrease in DOC was observed when biochar was used as an amendment.^[2] Hass et al.^[31] proposed two mechanisms to explain such a phenomenon: (i) specific biochar structure could bind to carbon and (ii) biochar could improve soil microorganism activity inducing a mineralization of the soluble carbon organic matter. Because of the short experimental period it was impossible to stimulate soil microbial activities, which is no SPW DOC decrease was observed when biochar was added to Ps.

3.2. Effects of Amendments on Soil and SPW Physico-Chemical Characteristics

Measuring metal(loid) concentration in the SPW makes it possible to estimate the highly mobilizable metal(loid) part of a soil, and therefore the most easily phyto-available for plants growing in such conditions. Phyto-availability tests were done by measuring the metal(loid) fractions in NH_4NO_3 and CaCl_2 as selective extractants. A correlation between selective extractants, and the metal(loid) concentration in organs will determine which selective extractant best reflects the metal(loid) SPW fraction available for plants.

3.2.1. Arsenic Concentrations in SPW and Selective Extractions

At T0 all amendments induced a significant As concentration increase in the SPW. The lowest value ($0.010 \pm 0.00 \text{ mg L}^{-1}$) was observed when biochar was added alone to Ps and corresponded to a 27% increase. However, when all amendments were added to Ps (PsBCS), As concentration in SPW was the most important compared to the other treatments and corresponded to 140% of the concentration measured in Ps. For all treatments, arsenic concentration was significantly less important at TF than T0, and no differences between Ps, PsC, and PsS were observed at the end of the experiment. At TF for the PsBCS treatment, arsenic concentration was strongly mobilized, up to 480% compared to Ps. This As concentration increase was positively correlated to pH (0.49) and DOC (0.87) (Table 5). It should also be noted that at TF for most treatments, As concentrations in the SPW were below the environmental release standard stated at 0.1 mg L^{-1} (Legifrance), and that garden soil amendment resulted in a decrease in SPW As concentration to almost 0 mg L^{-1} .

The results of selective extractants, which were used to estimate the arsenic phyto-availability, demonstrated a higher arsenic extraction when using NH_4NO_3 compared to CaCl_2 . The difference in favor of NH_4NO_3 was between 1.6- and 5.3-fold for PsC and PsBS, respectively (Table 4). No significant correlation was demonstrated between SPW As concentration and As-selective extractant, which were -0.02 for CaCl_2 and 0.52 for NH_4NO_3 . When CaCl_2 was applied to biochar Ps amended soil, only 0.03% of total soil As was extracted, except for the PsBCS treatment, which released 0.06% of total As. With NH_4NO_3 , the lowest arsenic mobilization was observed in the PsC treatment, with 0.10% of total soil As. This value increased with the other treatments (PsG, PsS, PsCS, PsBS, and PsBCS), which exhibited extraction proportions of $\geq 0.17\%$ of total soil As. Whereas for PsB, PsBC and PsBG, NH_4NO_3 gave the same proportion of available As (0.14%) as when NH_4NO_3 was applied to Ps. It should be emphasized, however, that a positive correlation was found between the As concentration in SPW and DOC (0.87), demonstrating that there is a dependence between arsenic concentrations in SPW and soil organic matter.

Arsenic, unlike cationic metals (Cu, Zn, Pb, Cd, etc.), is present in the form of an oxyanion in solution and its mobility in soils increases with increasing soil pH. It is well known that arsenic adsorption generally decreases with increasing pH values,^[27,32] as arsenic often binds to iron oxides, which are

Table 4. As and Pb concentrations in SPW (at the beginning (T0) and at the end of the experiment (TF)) and As and Pb phyto-availability using selective extractants (CaCl₂ or NH₄NO₃).

	SPW				Phyto-availability			
	As (mg L ⁻¹)		Pb (mg L ⁻¹)		As (%)		Pb (%)	
	T0	TF**	T0	TF**	CaCl ₂	NH ₄ NO ₃ **	CaCl ₂	NH ₄ NO ₃ **
Ps	0.08 ± 0.00a	0.02 ± 0.01a	16.15 ± 2.83a	13.20 ± 0.13a	0.07 ± 0.01a	0.14 ± 0.01a	4.11 ± 0.14a	12.37 ± 1.21a
PsC	0.13 ± 0.02b	0.03 ± 0.00a	0.55 ± 0.08b	0.18 ± 0.02b	0.06 ± 0.01a	0.10 ± 0.01b	0.26 ± 0.03b	2.31 ± 0.33b
PsG	0.11 ± 0.01b	0.00 ± 0.00b	15.90 ± 1.49a	13.28 ± 0.63a	0.06 ± 0.01a	0.18 ± 0.01c	4.12 ± 0.08a	9.86 ± 1.35c
PsS	0.13 ± 0.01b	0.03 ± 0.00a	0.46 ± 0.10bc	0.23 ± 0.04bcd	0.05 ± 0.01a	0.18 ± 0.00c	0.03 ± 0.00c	0.11 ± 0.02d
PsCS	0.17 ± 0.01c	0.07 ± 0.00c	0.44 ± 0.03bc	0.29 ± 0.01d	0.06 ± 0.00a	0.17 ± 0.01c	0.02 ± 0.00c	0.03 ± 0.00e
PsB	0.010 ± 0.00d	0.01 ± 0.00b	0.36 ± 0.04bc	0.43 ± 0.06c	0.03 ± 0.01b	0.14 ± 0.00a	1.08 ± 0.06d	3.65 ± 0.23f
PsBC	0.14 ± 0.01b	0.07 ± 0.01c	0.30 ± 0.03b	0.16 ± 0.00bc	0.03 ± 0.01b	0.14 ± 0.01a	0.07 ± 0.01e	0.03 ± 0.01e
PsBG	0.11 ± 0.01d	0.01 ± 0.00b	0.58 ± 0.14bc	0.93 ± 0.06e	0.03 ± 0.01ab	0.13 ± 0.00a	0.58 ± 0.15f	1.61 ± 0.14g
PsBS	0.13 ± 0.01b	0.04 ± 0.01d	0.41 ± 0.00c	0.32 ± 0.17bcd	0.03 ± 0.00b	0.16 ± 0.02ac	0.03 ± 0.00c	0.05 ± 0.02e
PsBCS	0.19 ± 0.01e	0.12 ± 0.02e	0.37 ± 0.03bc	0.25 ± 0.01bd	0.06 ± 0.01a	0.20 ± 0.01c	0.02 ± 0.00c	0.06 ± 0.01e

(Ps): Pontgibaud soil, (PsC): Ps + Compost (C) 5%, (PsG): Ps + Garden soil (G) 5%, (PsS): Ps + Slag (S) 2.5%, (PsCS): Ps + C 5% + S 2.5%, (PsB): Ps + Biochar (B) 2%, (PsBC): Ps + B 2% + C 5%, (PsGB): Ps + B 2% + G 5%, (PsBS): Ps + B 2% + S 2.5%, (PsBCS): Ps + B 2% + C 5% + S 2.5%. Letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) ($n = 5$). **, significant difference between T0 and TF or between selective extractants CaCl₂ and NH₄NO₃.

subject to a decrease in positive surface charge when pH increases. The mobility, toxicity and availability of As in the environment are strongly influenced by soil physico-chemical properties and are mainly controlled by adsorption-desorption processes.^[32] Changes in organic matter can directly or indirectly alter the distribution and availability of metals in soils.^[7] The effect of organic residues on arsenic mobility and bioavailability depends on the type of soil and soil characteristics (EC, pH, and degree of humification).^[11] Fitz and Wenzel^[33] reported a higher As solubility in soils when pH increased from pH 3 to 8. This may also mean that the conditions induced by the addition of biochar to the soils may control the mobility of As and Pb, regardless of the capacity of the biochar as the sorbent.

The addition of compost can increase the mobility and leaching of metal(oids), and in particular arsenic.^[29] Strong increases in the arsenic concentration of the SPW of compost-modified soils have been observed, probably because DOC competes with arsenic for sorption sites on Fe oxides and Al, resulting in increased mobility of arsenic.^[7,29] The compost may also contain soluble phosphorus, which can displace arsenic from organic and inorganic binding sites.^[7] In addition, Moreno-Jiménez et al.^[34] observed that the mobilization of arsenic, Cu and Se after application of olive plant waste compost to flooded soils could be attributed to increased concentrations of DOC in interstitial water. On the other hand, Cao and Ma^[35] used compost to remediate soils contaminated with chromium-copper arsenate and reported a positive effect on arsenic adsorption. Beesley et al.^[36] found no statistically significant correlation between As and DOC concentrations in SPW of a compost-amended soil, indicating that DOC did not drive mobilization of As in this soil. The correlation between SPW As and DOC probably depends on the specific properties of the amended soil. The results obtained on amended Pontgibaud soil are in agreement with those of Moreno-Jiménez et al.^[34] who also suggested that the phosphorus brought by compost could in

part be responsible for the mobilization of arsenic. The high mobilization of As in treatments with slag may also be linked to the large amount of phosphorus supplied by this amendment. The use of slag was intended to reduce the mobility of As thanks to its content of iron and aluminum oxy(hydro)oxides. Moreover, metal oxides and clay minerals in the soils bind arsenic.^[37] However, the combination of the slag with the compost and the biochar in fact induced arsenic mobilization. This was due to the multiple competition phenomena between organic matter and arsenic for sorption on the Fe oxy(hydro)oxides, thanks to the phosphorus supplied by the slag, and the increased solubilization of organic carbon in SPW in the presence of slag.

3.2.2. Lead Concentrations in SPW and Selective Extractions

At T0, all treatments (Table 4), apart from the treatment with garden soil, decreased the total Pb content of the SPW by 97% when compared to Pontgibaud soil. For Ps and PsG, the SPW Pb concentration was almost the same at the beginning and end of the experimental period and corresponded approximately to 14.6 mg L⁻¹, whereas for the other treatments the SPW Pb concentration was between 0.1 and 0.9 mg L⁻¹.

Concerning the selective extraction, treatments can be classified into three groups: (i) Ps and PsG, which demonstrated the highest Pb phyto-available fraction (4% for CaCl₂ and 11% for NH₄NO₃); (ii) PsC, PsB, and PsBG, which demonstrated a Pb phyto-available fraction ranging from 0.2 to 1% for CaCl₂ and 1.6 to 3.6% for NH₄NO₃; (iii) PsS, PsCS, PsBC, PsBS, and PsBCS treatments, in which almost no Pb was extracted neither by CaCl₂ nor NH₄NO₃. Finally, the correlation tests (-0.99) showed that there was a strong and negative correlation between SW pH and lead availability (Table 5).

Compost, biochar, and slag have high concentrations of basic cations. Compost and biochar also have high organic matter

Table 5. Correlations between pH, EC, DOC, As concentration, Pb concentration, As CaCl₂ or NH₄NO₃ selective extractant, Pb CaCl₂ or NH₄NO₃ selective extractant, organs dry weight and organs metal(loid)s concentrations.

	SPW						Selective extractant T0				Dry weight TF		Organs metal(loid)s concentrations TF			
	pH T0	DOC TF	[As] T0	[As] TF	[Pb] T0	[Pb] TF	As CaCl ₂	As NH ₄ NO ₃	Pb CaCl ₂	Pb NH ₄ NO ₃	AP	R	[As] _{AP}	[As] _R	[Pb] _{AP}	[Pb] _R
SPW pH	1.00	0.49	0.68	0.47	-0.98	-0.98	0.32	-0.03	-0.98	-0.99	0.95	0.91	0.31	-0.16	-0.75	-0.96
SPW DOC	0.49	1.00	0.88	0.87	-0.43	-0.45	0.04	0.45	-0.52	-0.49	0.45	0.51	0.10	0.01	-0.74	-0.50
SPW [As] T0	0.68	0.88	1.00	0.90	-0.58	-0.59	-0.02	0.52	-0.68	-0.71	0.69	0.74	0.30	0.27	-0.94	-0.66
SPW [As] TF	0.47	0.87	0.90	1.00	-0.39	-0.40	-0.01	0.59	-0.50	-0.49	0.48	0.54	0.32	0.24	-0.80	-0.43
SPW [Pb] T0	-0.98	-0.43	-0.58	-0.39	1.00	1.00	-0.32	0.16	0.98	0.96	-0.93	-0.85	-0.29	0.31	0.64	0.96
SPW [Pb] TF	-0.98	-0.45	-0.59	-0.40	1.00	1.00	-0.32	0.17	0.98	0.96	-0.93	-0.85	-0.27	0.31	0.65	0.95
As CaCl ₂ selective extractant T0	0.32	0.04	-0.02	-0.01	-0.32	-0.32	1.00	0.00	-0.20	-0.23	0.07	0.15	-0.37	-0.18	0.01	-0.29
As NH ₄ NO ₃ selective extractant T0	-0.03	0.45	0.52	0.59	0.16	0.17	0.00	1.00	0.12	0.01	-0.04	0.01	0.40	0.47	-0.41	0.01
Pb CaCl ₂ selective extractant T0	-0.98	-0.52	-0.68	-0.50	0.98	0.98	-0.20	0.12	1.00	0.98	-0.97	-0.90	-0.31	0.21	0.76	0.94
Pb NH ₄ NO ₃ selective extractant T0	-0.99	-0.49	-0.71	-0.49	0.96	0.96	-0.23	0.01	0.98	1.00	-0.97	-0.92	-0.34	0.10	0.80	0.96
Aerial parts dry weight	0.95	0.45	0.69	0.48	-0.93	-0.93	0.07	-0.04	-0.97	-0.97	1.00	0.93	0.42	-0.07	-0.79	-0.89
Roots dry weight	0.91	0.51	0.74	0.54	-0.85	-0.85	0.15	0.01	-0.90	-0.92	0.93	1.00	0.20	0.16	-0.82	-0.79
[As] _{AP}	0.31	0.10	0.30	0.32	-0.29	-0.27	-0.37	0.40	-0.31	-0.34	0.42	0.20	1.00	-0.12	-0.34	-0.33
[As] _R	-0.16	0.01	0.27	0.24	0.31	0.31	-0.18	0.47	0.21	0.10	-0.07	0.16	-0.12	1.00	-0.30	0.28
[Pb] _{AP}	-0.75	-0.74	-0.94	-0.80	0.64	0.65	0.01	-0.41	0.76	0.80	-0.79	-0.82	-0.34	-0.30	1.00	0.71
[Pb] _R	-0.96	-0.50	-0.66	-0.43	0.96	0.95	-0.29	0.01	0.94	0.96	-0.89	-0.79	-0.33	0.28	0.71	1.00

T0, beginning of the experiment; TF, end of the experiment (13 days); AP, aerial part; R, root.

content. These characteristics result in an increase in pH and cationic exchange capacity.^[38] The increase in pH therefore increased the surface charges of soil particles and thus the retention of metals.^[38,39] Humified organic matter, which has a high capacity to interact with metal ions and mobilize or immobilize metals,^[42] could reduce their mobility (and therefore their bioavailability) in the soil profile through the formation of more or less stable complexes.^[7] Moreover, biochar has a negative charge, allowing electrostatic attraction, and has a large specific surface.^[9,40] It is well known that the mobility of metal is strongly influenced by the adsorption phenomena that connect them to biochar surfaces.^[7]

Amendments can immobilize metals by three mechanisms: (i) adsorption of metals at highly accessible sites on the surface of soil components or aluminosilicates; (ii) precipitation with oxides of Al, Fe, or Mn; and (iii) formation of minerals (such as metal silicates) and diffusion through mineral surfaces.^[41] These different properties allow the implementation of different mechanisms, which can make metals unavailable for absorption by plants through changes to SPW pH and lead availability.

Compost, biochar, and slag have high basic cation concentrations. Compost and biochar also have high organic matter content. These characteristics result in a CEC and pH increase.^[38] Which modify the surface charges of soil particles and thus the retention of metals.^[38,39] Compost has also been

shown to influence the availability of metal(loid)s by binding them to humic acids.^[7]

3.3. Plant Dry Weight and Metal(loid) Uptake

The root biomass for beans grown on Ps was 39.9 mg. All treatments improved the root biomass. Plants in the first group, composed of PsS, PsCS, PsBC, PsBG, PsBS, and PsBCS, did not demonstrate significant statistical differences in terms of root biomass. Their dry weights ranged from 181.2 to 255.4 mg. The second group, which was composed of PsG, PsB, and PsC, had a root biomass between 62.9 and 145.1 mg (Figure 1).

Concerning the biomass of the aerial parts, the lowest value was observed on Ps (23.6 mg), and no difference was observed for the PsG treatment. However, for the other studied treatments the dry weight was significantly increased compared to Ps and was in fact doubled (500 mg) (Figure 1).

In this study, addition of amendments was beneficial for plant growth. This can be explained by the improvement of the physical properties of the soil, in particular the water retention capacity, notably by the addition of organic amendments.^[42] Moreover, organic matter, provided by compost improved the N, P, K nutrient cycle,^[43] allowing a better plant growth, as observed by Marques et al.^[43] on *Solanum nigrum*.

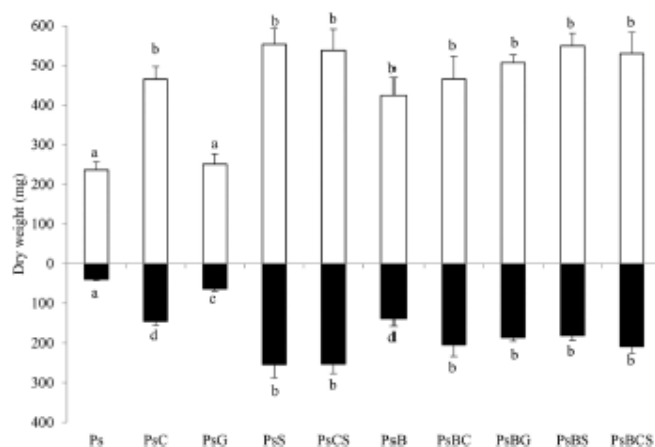


Figure 1. Dry weight (g) of dwarf beans organs (aerial parts (white column), roots (black column)) at the end of the experiment (13 days). (Ps): Pontgibaud soil, (PsC): Ps + compost (C) 5%, (PsG): Ps + garden soil (G) 5%, (PsS): Ps + slag (S) 2.5%, (PsCS): P + C 5% + S 2.5%, (PsB): Ps + biochar (B) 2%, (PsBC): Ps + B 2% + C 5%, (PsBG): Ps + B 2% + G 5%, (PsBS): Ps + B 2% + S 2.5%, (PsBCS): Ps + B 2% + C 5% + S 2.5%. Results are expressed as the mean value and standard error ($n = 10$), letters on bar graphs indicate a significant difference ($p < 0.05$).

The beneficial effect provided by biochar on root biomass (3.5-fold) and on aerial part biomass (1.8-fold) was already observed by Puga et al.^[40] on *Mucuna aterrima* when up to 5% of cane straw biochar was applied to an old zinc mining area.

Two mechanisms can be proposed to explain the plant growth improvement induced by the addition of biochar in metal(loid) contaminated soil: (i) biochar could improve water retention capacity^[22] and (ii) biochar could increase the pH of the soil^[44] due to its alkalinity, also demonstrated by Lebrun et al.^[2] This is confirmed by the positive correlation between root biomass (0.91), aerial biomass (0.95) and pH value.

Concerning the slag, Prado et al.^[45] observed that calcium limestone and basic slag applied in sugar cane fields generated a beneficial effect in correcting soil acidity. Moreover, Le Forestier et al.^[15] showed a link between the increase of soil pH and the decrease of acid-soluble and oxidizable fractions in slag modified soils. However, in the present work, by comparing PsS and PsB modalities, a better root biomass production was observed for PsS in spite of Pb being less present in SPW than As. This observation could be explained by the higher biochar sorption capacity which could reduce plant nutrient availability and thus soil fertility.^[46]

The combination of amendments allowed a better improvement of the bean root dry weight when Ps was amended with individual amendments (C, G, B) except when S was added to Ps. Moreover, among the treatments composed of Ps and only one amendment, only compost and biochar reduced the SPW Pb concentration (Table 4), although the pH in SPW was the same as the one measured on multi-amended Ps. The combination of amendments probably improved root growth by providing more available nutrients than individual amendments.

Moreover, the increase in As concentration in SPW linked to the addition of amendments did not have any negative effects on bean growth, probably due to the fact that arsenic concentration remained below the plant toxicity threshold.

Dwarf beans growing for 13 days in soil amended differently showed an accumulation of metal(loid)s in the aerial and roots parts of plants in variable amounts (Figure 2 and 3).

In the present study, there were differences in metal(loid) concentrations between the roots and the aerial parts of plants, but no distinction between leaves and stems was observed. For all treatments metal(loid) concentrations were higher in the roots than in the aerial parts of the beans. For Pb it corresponded to 0.25 g kg^{-1} in aerial part and 6 g kg^{-1} for the roots, whereas for As it corresponded to 5 mg kg^{-1} in aerial part and 200 mg kg^{-1} for the roots.

Regardless of the amendment used, arsenic concentrations in the aerial parts of the beans ranged from 2.5 to 14.5 mg kg^{-1} , and in the roots between 110 and 290 mg kg^{-1} . For lead, the range was 0.10 – 0.36 g kg^{-1} and 4.8 – 24.5 g kg^{-1} for aerial and root parts, respectively.

In detail, for As concentrations in aerial parts, there were no significant differences between Ps and PsG treatments, with values of 14.5 ± 3.1 and $11.2 \pm 1.5 \text{ mg kg}^{-1}$, respectively. These concentrations were 4.2 times higher than those observed in the aerial parts of the beans grown on the other amended soils. Finally, the As concentrations found in the aerial parts of PsC, PsS, PsCS, PsB, PsBC, PsBG, PsBS, and PsBCS were below the value observed by Mench et al.^[47] and Carbonell-Barrachina et al.^[48] for aerial parts of beans grown on control soil, 0.38 and 5.2 mg kg^{-1} , respectively.

Pb concentration in roots of beans grown on Pontgibaud soil was 68 times higher than in aerial parts, with root Pb concentration being 24.5 g kg^{-1} , and Pb concentration in aerial parts being 0.4 g kg^{-1} (Figure 3). For all treatments, garden soil amendment decreased root Pb concentration by 1.4-fold compared to Ps whereas the other treatments decreased Pb roots concentration 4.2-fold. For the aerial parts (Figure 3) when biochar or garden soil were added alone or in combination, Pb concentration was no different to that measured on plants grown on Ps. Moreover, when amendments added to Ps containing S or a combination of B and C, Pb concentration in aerial parts was four times lower than that measured in aerial parts of beans grown on Ps.

Finally, SPW Pb concentrations were significantly correlated with root tissue Pb concentration (0.95, Table 5). However, no significant correlations could be observed for arsenic concentrations in SPW and root tissues (0.24). The fact that Pb and As are mainly found in plant roots has been already emphasized by Lebrun et al.^[2] who found the same results when *Populus* or *Salix* trees were grown on metal-contaminated soils (Co, Cu, Pb, and Zn).

The addition of a single amendment can result in reduced concentrations of metal(loid)s in plant tissues, but can also lead to the accumulation of metal(loid)s.^[38] When added to

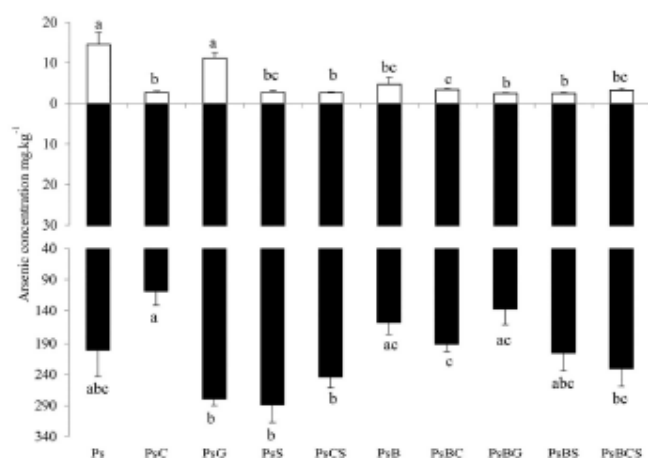


Figure 2. Arsenic concentrations (mg kg^{-1}) in dwarf bean organs (aerial parts (white column), roots (black column)) at the end of the experiment (13 days). (Ps): Pontgibaud soil, (PsC): Ps + compost (C) 5%, (PsG): Ps + garden soil (G) 5%, (PsS): Ps + slag (S) 2.5%, (PsCS): Ps + C 5% + S 2.5%, (PsB): Ps + biochar (B) 2%, (PsBC): Ps + B 2% + C 5%, (PsGB): Ps + B 2% + G 5%, (PsBS): Ps + B 2% + S 2.5%, (PsBCS): Ps + B 2% + C 5% + S 2.5%. Results are expressed as the mean value and standard error ($n = 10$), letters on bar graphs indicate a significant difference ($p < 0.05$).

Pontgibaud soil, the amendments allow a reduction of arsenic accumulation in the aerial parts. The chemical composition and sorption properties of soil influence the mobility and bioavailability of metals. Generally, only a fraction of metal(loid)s in soils

is bioavailable for uptake by plants. Metal(loid)s in soils are generally classified into three categories according to their bioavailability: (i) readily bioavailable (Cd, Ni, Zn, As, Se, Cu); (ii) moderately bioavailable (Co, Mn, Fe); and (iii) less bioavailable (Pb, Cr, U).^[49]

Gupta and Sinha^[5] have shown that the process of metal(loid) accumulation in plants depends on the concentration of available metals in soils, their mobility, and the plant species that grow on these soils. The metal(loid)s considered to be available for plant uptake are those which exist as soluble components in the soil solution or which are readily desorbed or solubilized by root exudates, often representing only a small part of the total ions,^[1] as found in the present study.

4. Conclusion

The soil of the former mining site used for this study (Pontgibaud soil) presents high concentrations of As and Pb, which inhibit the growth of endemic plants and induce a high risk of the spread of environmental metal(loid)s. However, the addition of various amendments (compost, biochar or slag) improves the physico-chemical characteristics of the soil by immobilizing metals, which allowed plant growth, and could therefore reduce the environmental risks associated to these contaminated soils.

In soil ecosystem surveys, consideration should be given to the phyto-available fraction of metals that may be transferred to the trophic chain, irrespective of the total metal(loid) content. Various extraction agents were used to assess the phyto-availability of the metal(loid)s. The CaCl_2 and NH_4NO_3 extracting procedures were shown to be appropriate methods for evaluating the mobility of lead in soil, but no informative results were obtained for arsenic. Other extraction methods should be tested for this element.

The addition of amendments promoting plant growth was correlated to the improvement of soil fertility and the reduction of metal(loid) phytotoxicity. This decrease in negative effects due to metal(loid)s could be due to specific chemical linkage between metal(loid)s and soil amendments, and the modification of metal(loid) speciation. These last hypotheses are currently being studied.

In view of the present results, it appears that the best treatment for a field application of an assisted phytostabilization strategy for the technosol of Pontgibaud would be amendments containing either biochar and compost, or biochar associated with slag.

With such combinations of amendments, a better plant growth, a low metal(loid)

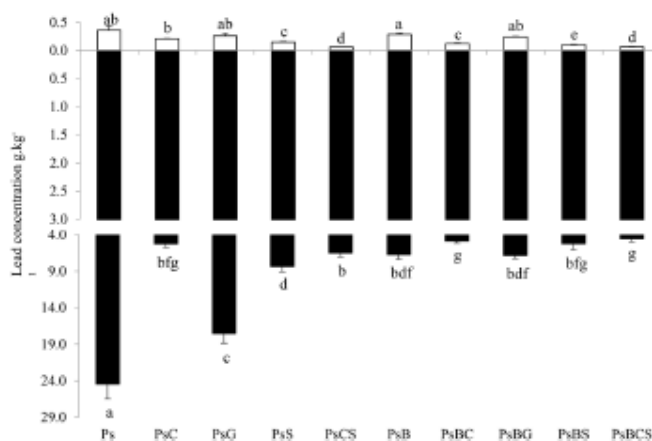


Figure 3. Lead concentrations (g kg^{-1}) in dwarf bean organs (aerial parts (white column), roots (black column)) at the end of the experiment (13 days). (Ps): Pontgibaud soil, (PsC): Ps + compost (C) 5%, (PsG): Ps + garden soil (G) 5%, (PsS): Ps + slag (S) 2.5%, (PsCS): Ps + C 5% + S 2.5%, (PsB): Ps + biochar (B) 2%, (PsBC): Ps + B 2% + C 5%, (PsGB): Ps + B 2% + G 5%, (PsBS): Ps + B 2% + S 2.5%, (PsBCS): Ps + B 2% + C 5% + S 2.5%. Results are expressed as the mean value and standard error ($n = 10$), letters on bar graphs indicate a significant difference ($p < 0.05$).

translocations in plants, and a decrease in As and Pb concentration in SPW was observed, allowing the threshold limit value for As and Pb to be reached. This will also contribute to stabilizing polluted soils, thus reducing dispersion of metal(loid)s by wind-blown soil transport or mobilization in groundwater. However, it should be noted that the experiments described here were only carried out for a very short time. For these reasons a field test is in progress to observe the effects of the proposed amendments on As and Pb soil stabilization as well as on the capacities of tree growth (*Salicaceae*) in such conditions.

Abbreviations

B, biochar; C, compost; DOC, dissolved organic carbon; EC, electrical conductivity; G, garden soil; ICP-AES, inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy; ISO, International Organization for Standardization; Ps, Pontgibaud technosol; S, slag; SPW, soil pore water; TOC, total organic carbon.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgments

The authors would like to thank Ingrid Girardeau and Louis De Lary De Labour (DPSM / BRGM) for providing the authorization to study the former Pontgibaud mine and thus to be able to carry out this experiment. R. Nandillon, ANRT research grant.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords

amendments, biochar, metal(loid)s, phyto-availability, remediation

Received: May 17, 2018
Revised: September 12, 2018
Published online:

- [1] B. Qasim, M. Motelica-Heino, E. Joussein, S. Soubrand, A. Gauthier, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 5961.
- [2] M. Lebrun, C. Macri, F. Miard, N. Hattab-Hambli, M. Motelica-Heino, D. Morabito, S. Bourgerie, *J. Geochem. Explor.* **2017**, *182*, 149.
- [3] A. K. Gupta, S. Sinha, *J. Hazard. Mater.* **2007**, *149*, 144.
- [4] A. Pérez-de-Mora, J. J. Ortega-Calvo, F. Cabrera, E. Madejon, *Appl. Soil Ecol.* **2005**, *28*, 125.
- [5] J. Kumpiene, S. Ore, G. Renella, M. Mench, A. Lagerkvist, C. Maurice, *Environ. Pollut.* **2006**, *144*, 62.
- [6] J. Kumpiene, A. Lagerkvist, C. Maurice, *Waste Manag.* **2008**, *28*, 215.
- [7] N. Bolan, A. Kunhikrishnan, R. Thangarajana, J. Kumpiene, J. Park, T. Makino, M. B. Kirkham, K. Scheckel, *J. Hazard. Mater.* **2014**, *266*, 141.
- [8] M. Mench, N. Lepp, V. Bert, J. P. Schwitzguébel, S. W. Gawronski, P. Schöder, J. Vangronsveld, *J. Soils Sediments* **2010**, *10*, 1039.
- [9] L. Beesley, M. Marmiroli, *Environ. Pollut.* **2011**, *159*, 474.
- [10] M. Lebrun, F. Miard, N. Hattab-Hambli, S. Bourgerie, D. Morabito, *Water Air Soil Pollut.* **2018**, *229*, 163.
- [11] D. J. Walker, R. Clemente, M. P. Bernal, *Chemistry* **2004**, *57*, 215.
- [12] M. Gräfe, M. J. Eick, P. R. Gross, A. M. Saunders, *J. Environ. Qual.* **2002**, *31*, 1115.
- [13] A. D. Redman, D. Macalady, D. Ahmann, *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 2889.
- [14] C. F. Balasoiu, G. J. Zagury, L. Deschênes, *Sci. Total Environ.* **2001**, *280*, 239.
- [15] L. Le Forestier, M. Motelica-Heino, P. Le Coustumer, M. Mench, *J. Soils Sediments* **2015**, *17*, 1262.
- [16] A. Jain, K. P. Raven, R. H. Loeppert, *Environ. Sci. Tech.* **1999**, *33*, 1179.
- [17] O. X. Leupin, S. J. Hug, *Water Res.* **2005**, *39*, 1729.
- [18] M. Lebrun, F. Miard, R. Nandillon, J.-C. Léger, N. Hattab-Hambli, G. S. Scippa, S. Bourgerie, D. Morabito, *Chemosphere* **2018**, *194*, 316.
- [19] W. Hartley, N. W. Lepp, R. Edwards, *Environ. Pollut.* **2004**, *131*, 495.
- [20] M. Mench, S. Bussiére, J. Boisson, E. Castaing, J. Vangronsveld, A. Ruttens, T. De Koe, P. Bleeker, A. Assunção, A. Manceau, *Plant Soil* **2003**, *249*, 187.
- [21] S. K. Porter, K. G. Scheckel, C. A. Impellitteri, J. A. Ryan, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2004**, *34*, 495.
- [22] G. Agegnehu, A. M. Bass, P. N. Nelson, B. Muirhead, G. Wright, M. I. Bird, *Agric. Ecosyst. Environ.* **2015**, *213*, 72.
- [23] J. Gantier, B. Robinson, K. Burton, L. Clucas, *Sci. Total Environ.* **2013**, *465*, 308.
- [24] D. Sebag, Y. Copard, C. Di Giovanni, A. Durand, B. Laignel, S. Ogier, E. Lallier-Verges, *Earth Sci. Rev.* **2006**, *79*, 241.
- [25] S. Bart, M. Motelica-Heino, F. Miard, E. Joussein, M. Soubrand, S. Bourgerie, D. Morabito, *Catena* **2016**, *136*, 44.
- [26] M. Molnár, E. Vaszi, E. Farkas, E. Ujaczki, I. Fekete-Kertész, H. Tolner, O. Kleber, C. Kirckhesner, K. Gruiz, N. Uzinger, V. Feigl, *Sci. Total Environ.* **2016**, *563–564*, 855.
- [27] L. Beesley, O. S. Inneh, G. J. Norton, E. Moreno-Jimenez, T. Pardo, R. Clemente, J. J. C. Dawson, *Environ. Pollut.* **2014**, *186*, 195.
- [28] D. L. Jones, J. Rousk, G. Edwards-Jones, T. H. DeLuca, D. V. Murphy, *Soil Biol. Biochem.* **2012**, *45*, 112.
- [29] R. Chintala, J. Mollineda, T. E. Schumacher, D. D. Malo, J. L. Julson, *Arch. Agron. Soil Sci.* **2013**, *60*, 393.
- [30] R. Lefèvre, *Thesis, Université Pierre et Marie Curie* **2015**.
- [31] A. Hass, J. M. Gonzalez, I. M. Lima, H. W. Godwin, J. J. Halvorson, D. G. Boyer, *J. Environ. Qual.* **2012**, *41*, 1096.
- [32] Q. Feng, Z. Zhang, Y. Chen, L. Liu, Z. Zhang, C. Chen, *Procedia Environ. Sci.* **2013**, *18*, 26.
- [33] W. J. Fitz, W. W. Wenzel, *J. Biotechnol.* **2002**, *99*, 259.
- [34] E. Moreno-Jiménez, R. Clemente, A. Mestrot, A. A. Meharg, *Environ. Pollut.* **2013**, *173*, 238.
- [35] X. D. Cao, L. Q. Ma, *Environ. Pollut.* **2004**, *132*, 435.
- [36] L. Beesley, E. M. Jimenez, J. L. Eyles, *Environ. Pollut.* **2010**, *158*, 2282.
- [37] G. Zhang, H. Liu, R. Liu, J. Qu, *J. Hazard. Mater.* **2009**, *168*, 820.
- [38] J. Pérez-Esteban, C. Escolaso, A. Moliner, A. Masaguer, J. Ruiz-Fernandez, *Plant Soil* **2014**, *377*, 97.
- [39] D. Yin, X. Wang, C. Chen, B. Peng, C. Tan, H. Li, *Chemistry* **2016**, *152*, 196.
- [40] A. P. Puga, C. A. Abreu, L. C. A. Melo, L. Beesley, *J. Environ. Manage.* **2015**, *159*, 86.

- [41] S. H. Lee, W. H. Ji, W. S. Lee, N. Koo, I. H. Koh, M. S. Kim, J. S. Park, *J. Environ. Manage.* **2014**, 139, 15.
- [42] B. A. Stewart, C. A. Robinson, D. B. Parker, in *Land Application of Agricultural, Industrial and Municipal By-Products* (Ed: W. A. Dick), Soil Science Society of America, Madison **2000**, pp. 387–407.
- [43] A. P. G. C. Marques, R. S. Oliveira, A. O. S. S. Rangel, P. M. L. Castro, *Environ. Pollut.* **2008**, 151, 608.
- [44] B. Smidert, B. Singh, *Agr. Ecosyst. Environ.* **2014**, 191, 99.
- [45] R. M. Prado, F. M. Fernandes, W. Natale, *Revista Brasileira De Ciencia Do Solo* **2003**, 27, 287.
- [46] M. A. Rondon, J. Lehmann, J. Ramirez, M. Hurtado, *Biol. Fertil. Soils* **2007**, 43, 699.
- [47] M. Mench, J. Vangronsveld, C. Beckx, A. Ruttens, *Environ. Pollut.* **2006**, 144, 51.
- [48] A. A. Carbonell-Barrachina, F. Burló-Carbonell, J. Mataix-Beneyto, *J. Plant. Nutr.* **1997**, 20, 1617.
- [49] M. N. V. Prasad, *Russ. J. Plant Physiol.* **2003**, 50, 686.

Valorisation scientifique des travaux

Article dans un journal avec comité de lecture

Premier auteur sur 1 article accepté :

- Nandillon R., Miard F., Lebrun M., Gaillard M., Sabatier S., Bourgerie S., Battaglia-Brunet F., Morabito D. *Effect of biochar associated with various amendments (compost, garden soil and slag) on the phytotoxicity and phytoavailability of Pb and As in a mining technosol CLEAN–Soil, Air, Water; 1800220.*

Premier auteur sur 2 articles soumis :

- R. Nandillon., M. Lebrun., F. Miard., M. Gaillard., S. Sabatier., M. Villar., S. Bourgerie., D. Morabito. *Capability of amendments (biochar, compost and garden soil) added to a mining technosol contaminated by Pb and As to allow poplar seeds (Populus nigra L.) germination. (Journal : Environmental Monitoring and Assessment) (retour de correction)*

- R. Nandillon, O. Lahwegue, F. Miard, M. Lebrun, M. Gaillard, S. Sabatier, F. Battaglia-Brunet, D. Morabito and S. Bourgerie *Potential use of biochar, compost and iron grit associated to Trifolium repens to stabilize Pb and As on a multi-contaminated technosol (Journal : Ecotoxicology and Environmental Safety)*

1 en cours de préparation :

- Co-cropping (Salix and Trifolium) for in-situ phytostabilisation of Pb and As from post-mining soil with various amendments (Journal visé : Plant and Soil)

Co-auteur pour 5 articles acceptés :

- Lomaglio T., Hattab-Hambli N., Miard F., Lebrun M., Nandillon R., Trupiano D., Scippa G.S., Gauthier A., Motelica-Heino M., Bourgerie S., Morabito D. (2018). Cd, Pb, and Zn mobility and (bio)availability in contaminated soils from a former smelting site amended with biochar. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(26), 25744-25756.

- Lebrun, M., Miard F., Nandillon R., Léger J. C., Hattab-Hambli N., Scippa G.S., Bourgerie S., Morabito D. (2018). Assisted phytostabilization of a multicontaminated mine technosol using biochar amendment: Early stage evaluation of biochar feedstock and particle size effects on As and Pb accumulation of two Salicaceae species (Salix viminalis and Populus euramericana). *Chemosphere*, 194, 316-326.

- Lebrun M., Miard F., Renouard S., Nandillon R., Scippa G.S., Morabito D., Bourgerie S. (2018). Effect of Fe-functionalized biochar on toxicity of a technosol contaminated by Pb and As: sorption and phytotoxicity tests. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(33), 33678-33690.

- Lebrun M., Miard F., Nandillon R., Hattab-Hambli N., Scippa G.S., Bourgerie S., Morabito, D. (2018). Eco-restoration of a mine technosol according to biochar particle size and dose application: study of soil physico-chemical properties and phytostabilization capacities of Salix viminalis. *Journal of Soils and Sediments*, 18(6), 2188-2202.

- Lebrun, M., Miard, F., Nandillon, R., Scippa, G. S., Bourgerie, S., & Morabito, D. (2019). Biochar effect associated with compost and iron to promote Pb and As soil stabilization and Salix viminalis L. growth. *Chemosphere*.

Communications en congrès

Premier auteur à des congrès internationaux :

- *Effect of biochar associated with various amendments on the toxicity of a mining technosol mainly contaminated with Pb and As (IPC Montréal 2017 et ICEPR Madrid 2018) (communications orales)*

Co-auteur à des congrès internationaux :

- *Lebrun, M., Miard, F., Nandillon, R., Trupiano, D., De Zio, E., Scippa, G. S., Bourgerie, S., Morabito, D. Biochar Amendment Associated to Compost and/or Iron in Order to Improve Lead and Arsenic Soil Stabilization and Salix Viminalis Growth. (ICEPR Madrid 2018) (communication orale)*

- *Chevolleau, S., Beaumont, F., Miard, F., Lebrun, M., Nandillon, R., Gautret, P., Bourgerie, S., Morabito, D. Biochar Obtained from Different Wood Trunk Layers Allow to Stabilize Pb and As in a Mining Technosol. (ICEPR Madrid 2018) (communication orale)*

- *Miard, F., Nandillon, R., Lebrun, M., Gaillard, M., Sabatier, S., Bourgerie, S., & Morabito, D. Poplar Seeds Capabilities to Germinate on a Metal (Loid) S Contaminated Mining Technosol Differently Amended. (ICEPR Madrid 2018) (communication orale)*

- *Lebrun, M., Miard, F., Renouard, S., Nandillon, R., Scippa, G. S., Morabito, D., Bourgerie, S. Capabilities of Fe-Functionalized Biochar to Decrease Soil Pb and As Phytodisponibility. (ICEPR Madrid 2018) (communication orale)*

Divers :

- *Participation aux journées des doctorants (BRGM) avril 2017 et 2018 (poster)*

Séminaire interne (ISTO) (Mai 2018) « Phytostabilisation des éléments métalliques d'un technosol minier végétalisé par le genre Salix assistée par du biochar »

- *Participation à la vidéo centre science (Mai 2018) « Des plantes au secours de la dépollution des sols »*

- *Participation orale aux rendez-vous Carnot (Octobre 2019) « Phytostabilisation des éléments métalliques d'un technosol minier végétalisé par le genre Salix assistée par du biochar »*

Phytostabilisation des éléments métalliques d'un technosol minier végétalisé par le genre *Salix* assistée par du biochar

L'activité minière a contribué pour une grande part à la pollution de l'environnement par les métaux et métalloïdes. Les déchets miniers du site de Roure-les-Rosiers (district de Pontgibaud, Puy de Dômes), en raison de l'abondante quantité de plomb et d'arsenic qu'ils contiennent, peuvent contribuer à la contamination des écosystèmes environnants. Il est donc nécessaire à minima de limiter leur propagation et, idéalement, d'envisager leur stabilisation à long terme. Pour ce type de site, le phytomanagement apparaît alors comme une approche écologique et peu coûteuse, alternative aux techniques dites conventionnelles. Au vu des caractéristiques particulières du technosol minier étudié (toxicité élevée et faible qualité agronomique), l'apport d'amendements (biochar, compost et sulfate de fer) a été nécessaire. Dans ce but, des tests en mésocosmes ont été menés pour évaluer l'impact de ces amendements sur la biodisponibilité des polluants. Les résultats obtenus ont montré que l'ajout de biochar et de compost a induit un abaissement de la concentration de plomb dans l'eau porale de plus de 90 %. Quant au sulfate de fer, il a aidé à maîtriser la mobilisation de l'arsenic causée par l'apport de compost nécessaire à l'amélioration agronomique du technosol. Ainsi, les concentrations en arsenic dans les eaux interstitielles ont été maintenues au-dessous de la valeur limite généralement admise pour un rejet dans l'environnement (100 µg.L⁻¹). Tous ces bénéfices liés à l'apport d'amendements ont permis, sur une parcelle expérimentale du site, de mettre en place un couvert végétal, combinant différentes espèces de saules et du trèfle. Le suivi de cette végétation sur deux années de croissance a validé l'approche adoptée, avec l'observation d'une accumulation très faible de plomb et d'arsenic dans les parties aériennes des espèces étudiées, compte tenu des concentrations retrouvées dans le technosol. Par ailleurs, une analyse du compartiment microbiologique des sols a montré que l'apport de compost a amélioré la diversité des microorganismes, suggérant un processus de refonctionnalisation. Le suivi de la parcelle expérimentale sur plusieurs cycles de croissance de végétaux permettra de valider la stratégie de phytomanagement développée à diverses échelles, du laboratoire au site.

Mots clés : phytomanagement, technosol minier, parcelle expérimentale, plomb, arsenic, biochar, compost, sulfate de fer, saule, trèfle

Metal elements phytostabilization of a mining technosol vegetated by *Salix* assisted by biochar

The mining activity has significantly contributed to the pollution of the environment by metals and metalloids. The mining site of Roure-les-Rosiers (Pontgibaud district, Puy de Dômes), due to the high lead and arsenic concentrations in the mine wastes, can contribute to the contamination of surrounding ecosystems. It is therefore necessary at least to limit the transfer of pollutants, and, ideally, to consider the long-term stabilization of the wastes. In such context, phytomanagement appears as an ecological and inexpensive approach, alternative to the conventional techniques. In view of the particular characteristics of the studied mining technosol (high toxicity and low agronomic quality), amendments addition (biochar, compost and iron sulphate) was necessary. To this end, mesocosm tests were conducted to assess the impact of these amendments on pollutant bioavailabilities. The results showed that biochar and compost addition decreased lead concentration in the soil pore water by more than 90%. For its part, iron sulphate has helped to control the arsenic mobilization caused by the supply of compost added in order to improve the agronomic quality of the technosol. Thus, arsenic concentrations in soil pore water have been kept below the usual limit value for release into the environment (100 µg.L⁻¹). All these benefits related to the amendments made possible, on the experimental plot, to set up a vegetation cover, combining different species of willows and clover. Monitoring of this vegetation over two years of growth validated the adopted approach, with the observation of a very low lead and arsenic accumulation in the aerial parts of the studied species, taking into account the pollutants concentrations found in the technosol. In addition, the analysis of the soil microbiological compartment showed that compost improved the diversity of microorganisms suggesting a refunctionalization process. Monitoring the experimental plot over several plant growth cycles will validate the phytomanagement strategy developed at various scales, from the laboratory to the site.

Keywords: phytomanagement, mining technosol, experimental plot, lead, arsenic, biochar, compost, iron sulphate, willow, clover