

Août 2013



# Recherches écologiques post-mines sur le site des Avinières

## Rapport d'activités



Une intégration de savoir-faire différents

CEFE  
Groupe de catalyse écologique  
Resp. Pr Claude Grison

# Sommaire

## I. Introduction

## II. Site d'étude

## III. Choix de la technologie : la phytoextraction

## IV. Etude bactérienne du sol

- 1- Analyse de la population bactérienne totale du sol
- 2- Découverte d'une nouvelle espèce bactérienne en symbiose avec *Anthyllis vulneraria*
- 3- Tests de croissance de *Rhizobium metallidurans*
- 4- Synthèse du KDG, un sucre clé pour le développement de *Rhizobium metallidurans*
- 5- Tests microbiologiques de croissance compétitive
- 6- Détermination des gènes de résistance des bactéries aux métaux lourds
- 7- Conclusion

## V. Recherche des conditions optimales de phytoextraction

- 1- Essais d'inoculations microbiennes
- 2- Utilisation d'un géotextile
- 3- Installation d'une ombrière occultante
- 4- Installation d'un topsoil

## VI. Phytoextraction sur le site des Avinières

- 1- Transplantations d'individus inoculés
- 2- Transplantations en mélange
- 3- Essais de semis *in situ*
- 4- Bilan des connaissances acquises
- 5- Techniques de récolte non destructrices

## VII. Suivi environnemental des éléments traces métalliques sur le site minier des Avinières

- 1- Introduction
- 2- Méthodes et matériel
- 3- Résultats et discussion
- 4- Conclusion

## VIII. Enjeux socio-économiques

## IX. Des travaux de recherche et développement élaborés à partir d'un dialogue permanent avec les collectivités territoriales, communales et les villageois

## X. Publications et brevets

## XI. Conclusion générale

## I. Introduction

Les activités de la mine des Avinières (Saint-Laurent-Le-Minier, Gard) sont responsables d'importantes modifications de l'environnement. L'extraction du minerai a contribué à modifier le paysage avec la formation d'un terril important en termes de quantités de déchets accumulés et de teneurs en « éléments traces métalliques » (ou « ETM »). Les étapes de purification, lavage des minerais qui généraient de très grandes quantités de déchets à haute teneurs en ETM ont contribué à la formation d'une zone de très forte contamination du sol à l'endroit de leur stockage. Cette zone regroupe l'ensemble des anciens bassins de décantation et se caractérise par une absence quasi-totale de végétation. Cette partie du site est devenue phytotoxique. Les rares plantes qui s'y développent sont des plantes qui se sont adaptées à la pollution métallique. Elles sont tolérantes et éventuellement accumulatrices ou hyperaccumulatrices d'ETM. Toutes les surfaces environnantes présentent des contaminations intermédiaires dues essentiellement au transport des minerais, à leur combustion et aux déplacements de matériaux déjà contaminés (envol de poussières, ruissellement, dépôt de cendres des fours, ...). L'érosion éolienne et l'érosion hydrique très importantes sur ce type de site de part l'absence de végétation sont un risque important de dispersion de la contamination dans l'environnement, le sol en particulier.

Il s'agit d'un problème très préoccupant, car le sol exerce des fonctions essentielles qui déterminent en grande partie la production des produits alimentaires et la qualité de l'eau. De plus, les « ETM » font partie des composés les plus nocifs et ne sont pas biodégradables.

Au-delà des conséquences environnementales, les risques sur la santé de ces ETM sont réels : les atteintes des systèmes nerveux, rénal, pulmonaire ou des tissus osseux sont clairement établies. Des exemples récents de plombémies préoccupantes et de premier stade de saturnisme ont été mis en évidence chez des enfants habitants à proximité du site ([http://www.mairie-saintlaurentleminier.fr/municipalite\\_mairie.html](http://www.mairie-saintlaurentleminier.fr/municipalite_mairie.html)).

Les impacts spécifiques aux pollutions métalliques ne sont pas seulement d'ordre environnemental et médical ; ils affectent directement le développement économique et touristique de la commune.

Dans ce contexte, le plan de gestion proposé est une approche intégrée et interdisciplinaire de la phytoremédiation, qui s'appuie sur des connaissances solides et validées en **écologie végétale et microbienne**, en **chimie écologique** et **environnementale**. Les fils conducteurs sont **l'amélioration de la qualité environnementale du site** et une **gestion réfléchie des risques** associés en apportant les moyens de les maîtriser dans la durée.

Les techniques proposées associent réhabilitation écologique des zones polluées et procédés innovants de valorisation chimique des phytotechnologies mises en œuvre. Les activités d'Ecologie de la restauration et de Chimie écologique reposent sur des acquis solides et développés dans des programmes de recherche et développement avancés (ANR « Opportunité (E)<sup>4</sup> », FEDER « GénieEcoChim », PIR INGECO CNRS-IRSTEA, contrat doctoral ADEME), qui montrent la validité du concept. Elles sont également labellisées par deux pôles de compétitivité (Materalia et Cosmetic Valley).



Une société sera créée à l'automne 2013 en collaboration avec le CNRS pour développer à grande échelle l'ensemble des activités précitées. **Cette étape est fondamentale, car pour la première fois, un programme de réhabilitation écologique et environnementale permettra de financer un programme de restauration jusqu'à son terme.** Ainsi, le plan de gestion présenté s'attache à mettre en place les outils scientifiques, techniques et organisationnels qui contribueront à favoriser la transition d'un passé minier et industriel lourd vers une économie verte, et à proposer aux pouvoirs publics des pistes d'action, pour faciliter le développement de nouvelles technologies durables, responsables et capables de soutenir **réhabilitation écologique et (re)construction sociale.**

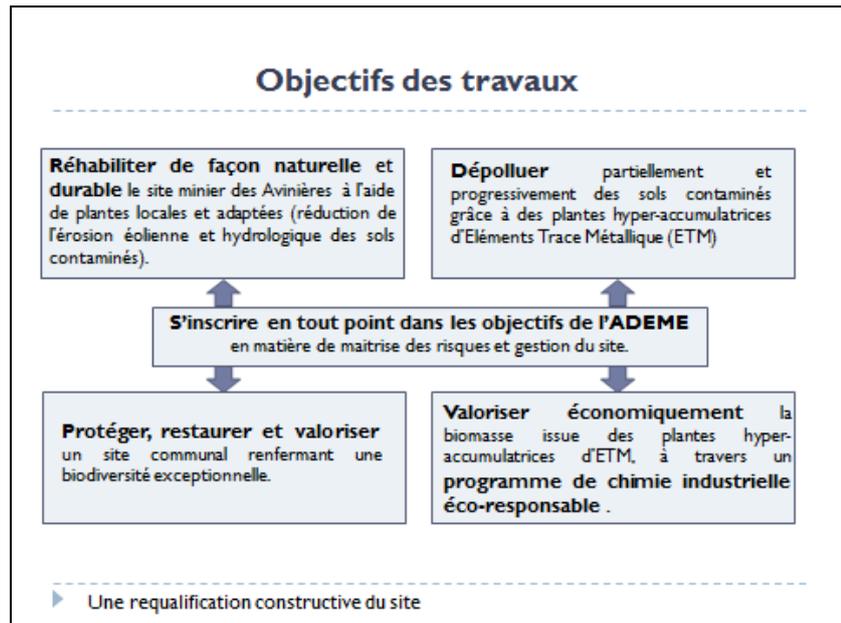
- Les premiers objectifs concrets sont ceux du développement des techniques de phytoremédiation adaptées au site et au contexte local, et capables de limiter la contamination des zones environnantes issue des bassins de décantation. Il s'agit en particulier de limiter l'érosion éolienne et hydraulique des sédiments contaminés.

La technique de phytoremédiation étudiée et proposée est la **phytoextraction**. La phytoextraction est aussi la seule technique capable de combiner amélioration de la qualité environnementale et avantages socio-économiques. Elle consiste à installer un couvert végétal de plantes hyperaccumulatrices locales. Celles-ci contribuent à stabiliser et décontaminer progressivement le sol grâce aux systèmes racinaires, limiter l'impact de l'érosion éolienne et l'envol de particules métalliques en formant une couverture naturelle sur le sol préalablement recouvert d'un topsoil adapté et protecteur.

Ces plantes en accumulant de fortes teneurs en ETM dans leurs parties aériennes sont la matière première naturelle d'une écotecnologie innovante. Elles ne sont plus un déchet contaminé, mais une biomasse à haute valeur ajoutée dans le procédé développé par l'équipe.

- Les objectifs suivants sont le développement industriel de la première perspective de valorisation de cette biomasse unique. Elle initie une nouvelle branche de la chimie verte : l'écocatalyse. Basés sur les cations métalliques phytoextraits (*e.g.*  $Zn^{2+}$ ), les catalyseurs écologiques présentent des performances très supérieures aux catalyseurs classiques conçus en laboratoire *et* des sélectivités uniques. Dans des conditions douces, ces catalyseurs écologiques permettent la synthèse de molécules à l'impact social important tels que des anticancéreux, des agents antiviraux, des molécules actives contre la malaria, des arômes naturels, des cosmétiques et des intermédiaires clés de l'industrie chimique (10 brevets CNRS, Grison et al. 2009-2013). **Il s'agit d'une révolution verte : la restauration du site des Avinières est une source d'innovation en chimie écologique et la chimie écologique est la force motrice de la restauration du site.**

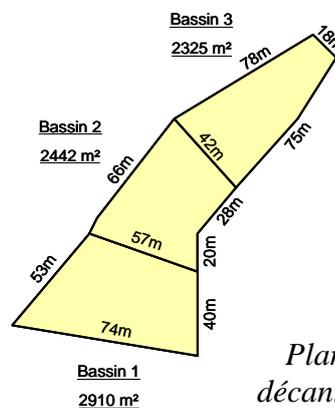
Il s'agit d'une situation inédite qui apporte un nouvel élan au développement de la phytoextraction. Jusqu'à considérée comme un déchet indésirable, la biomasse développée est en train de prendre une valeur économique capable de soutenir les efforts de restauration sur le long terme.



Une activité post-mine est aujourd'hui possible. Elle est une opportunité partagée par la commune, les structures étatiques, les acteurs des sciences de l'environnement et l'industrie chimique. Le site des Avinières représente un site pilote unique et moteur pour cette nouvelle activité. Il représente clairement un exemple pour les autres sites à l'étude (Nouvelle-Calédonie, Grèce, Chine, Gabon).

## II - Site d'étude

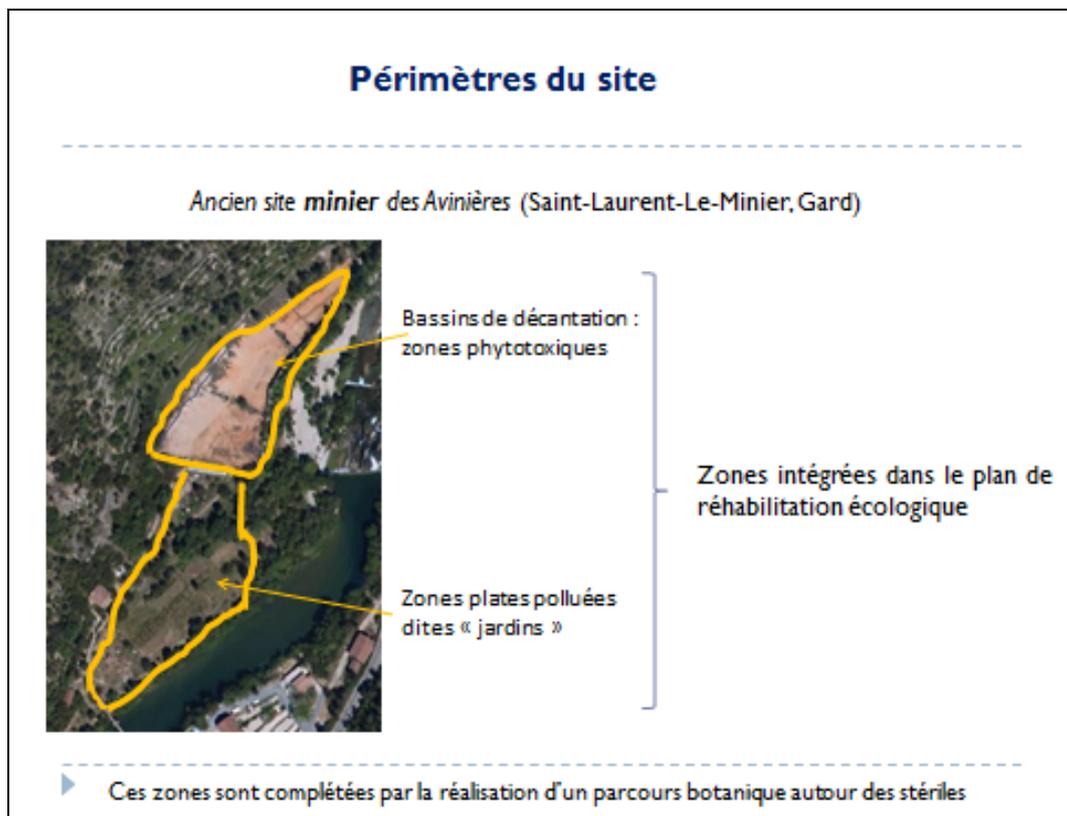
Les bassins servaient de stockage aux déchets liquides de lavage du minerai. Ces déchets, mélange d'eau et de sédiments chargés en métaux étaient déversés dans les bassins de décantation. La technique consistait ensuite à laisser les sédiments se déposer au fond par décantation avant de rejeter l'eau dans la rivière. Les bassins de décantation se remplissaient ainsi au fur et à mesure de boues à très forte teneurs en ETM. La contamination y est très importante, et le risque de contamination des écosystèmes est majeur. C'est donc au niveau de ces bassins que nous avons choisi de réaliser une grande partie de nos expériences. Les 3 bassins occupent une surface totale d'environ 7677 m<sup>2</sup> pour une longueur de 163 m le long de la rivière. Les premières habitations se trouvent en amont de l'autre côté de la rivière à une distance minimale de 131 m.



*Plan des 3 bassins de décantation de l'ancienne mine des Avinières*

La zone concernée par les études est définie par la convention d'occupation du site signée par l'ADEME, la commune, le CNRS et l'IRD. Elle est constituée de 2 zones de bassins de décantation phytotoxiques (1 partie du bassin 2 et le bassin 3).

Elles ont été complétées par des expérimentations importantes sur les zones de moindre contamination mais non négligeables, les jardins.



### III - Choix de la méthode : la phytoextraction

La **phytoextraction** est une des rares solutions intéressantes de réhabilitation durable des sols contaminés par les ETM. Les phytotechnologies les plus étudiées sont la phytostabilisation et la phytoextraction.

-La **phytostabilisation** consiste à recouvrir ces sols par des espèces végétales tolérantes aux éléments traces métalliques, la seconde permet de les extraire partiellement à l'aide d'espèces végétales hyperaccumulatrices d'ETM.

Les expériences antérieures ont montré que la phytostabilisation permettait d'immobiliser les contaminants et contribuait à la croissance de la végétation sur des zones hostiles. En revanche, elle favorise l'apparition spontanée de végétaux qui deviennent parfois capables d'accumuler les ETM. Ainsi, l'évolution dans le temps des parcelles revégétalisées pose le délicat problème de la maîtrise des risques dans la durée.

-La **phytoextraction** est une écotechnologie de dépollution partielle des sols et des sédiments par accumulation des ETM dans les parties aériennes des végétaux hyperaccumulateurs. C'est cette technique qui a été étudiée et développée sur le site des Avinières.

Les travaux de phytoextraction utilisent exclusivement des plantes indigènes et respectent scrupuleusement la biodiversité locale. Les deux hyperaccumulateurs étudiés et cultivés sur sites sont *Anthyllis vulneraria* et *Noccaea caerulescens*. La première (en jaune) est la seule légumineuse connue comme étant également une hyperaccumulatrice d'ETM, la seconde (en blanc) est le meilleur hyperaccumulateur de zinc répertorié. Il s'agit donc d'espèces uniques au monde, à protéger et valoriser.



*Anthyllis vulneraria* et *Noccaea caerulescens*

Les résultats obtenus sont donc une mise en place de techniques de culture bispécifiques à grande échelle : depuis la récolte des graines jusqu'à la récolte des feuilles. Les études réalisées et présentées ci-après ont eu pour objectif d'étudier la phytoextraction sur site, à grande échelle, de résoudre les verrous du transfert d'échelle tout en contribuant à l'amélioration environnementale du site grâce au procédé développé. Elles s'appuient sur l'obtention de :

- nouvelles connaissances sur la composition bactérienne du sol,
- l'étude de l'effet d'inoculations microbiennes (bactéries et champignons symbiotiques), au stade semis ou jeunes pousses, sur la croissance des plants et sur leur capacités à accumuler le zinc, sous serre, après transfert sur sols contaminés et sur sites,
- une étude sur le transfert des ETM vers un bioindicateur important localement, le miel produit à proximité du site,
- et une valorisation chimique de l'ensemble de ces résultats. Cet aspect n'est pas développé dans le rapport d'activités.



Une excellente maîtrise des cultures de *Noccaea caerulescens* et *Anthyllis vulneraria* sur sites, à grande échelle et à tous les degrés de contamination



► Une maîtrise résultant de travaux de recherche conséquents

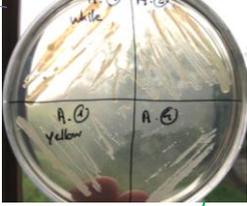
## IV- Etude bactérienne du sol des Avinières

### Résumé :



**Une étude des microorganismes associés optimisant les cultures en phytoextraction**

▶ Isolement et étude génotypique, phénotypique et métabolique d'une **nouvelle espèce** de rhizobium



N#N >> [NH4+]

diazote atmosphérique → fertilisant vert or ammonium

(Int. J. Syst. Evol. Microbio. 2013, sous presse, Claire Grison, Eddy Petit, Alan Dobson, Claude Grison)

▶ *Anthyllis vulneraria*, une légumineuse et une hyperaccumulatrice permettant conjointement une réintroduction naturelle d'azote dans un sol appauvri et l'extraction naturelle du Zn

### 1- Analyse de la population bactérienne totale du sol

Etant donnée la faible diversité végétale des Avinières, il est intéressant d'étudier la composition bactérienne présente dans ce sol. En effet, les procaryotes évoluent rapidement grâce à leur reproduction asexuée et s'adaptent donc plus facilement à des environnements de stress extrême. C'est ainsi que de nouvelles espèces bactériennes émergent. Nous avons donc étudié la diversité bactérienne des bassins de décantation 2 et 3 des Avinières.

Nous avons évalué la composition bactérienne **totale** du sol par une méthode de culture indépendante. Cette méthode permet de s'affranchir de toute mise en culture des bactéries, ce qui serait un désavantage pour le dénombrement total : croissance uniquement des bactéries vivantes et risque de mortalité lors du passage de mise en culture.

Une dizaine d'échantillons de 100g de terre a été analysée. A partir de ces échantillons, nous avons créé une librairie de 303 clones d'ADN 16S du sol des Avinières, après extraction totale de l'ADN et amplification de l'ADN 16S suivie d'un séquençage.

Selon une recherche par similarité sur BLASTN, cette librairie est composée de plus de **93% de nouvelles espèces**. Le tableau suivant présente les espèces les plus proches (95% de similarité) des nouvelles espèces trouvées.

Tableau 1 : Inventaire des espèces les plus proches (95 %) des clones de la librairie ; \* : nouvelle espèce trouvée dans le sol et dans les racines d'*Anthyllis vulneraria*

	Nombre de clones apparentés
<i>Rhizobium metallidurans</i> *	2
<i>Arenimonas metalli</i>	1
<i>Azotobacter beijerinckii</i>	1
<i>Bradyrhizobium canariense</i>	3
<i>Brevibacillus brevis</i>	4
<i>Burkholderia sp.</i>	2
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	1
<i>Limnobacter litoralis</i>	3
<i>Nitrospira sp.</i>	7
<i>Nitrosospora multiformis</i>	6
<i>Rubrobacteridae</i>	1
<i>Segetibacter koreensis</i>	3
<i>Sphingomonas elodea</i>	2
<i>Thermobaculum terrenum</i>	1
<i>Xanthomonas campestris</i>	2

## 2- Découverte d'une nouvelle espèce bactérienne en symbiose avec *Anthyllis vulneraria*

*Anthyllis vulneraria* est la seule légumineuse capable de croître sur les terrains pollués des sites de Saint-Laurent-Le-Minier. Or les légumineuses présentent un grand intérêt en agriculture. Elles sont utilisées en parallèle de cultures agroalimentaires pour enrichir le sol en engrais naturels (ammonium). Ces engrais naturels sont en fait produits par des bactéries qui se trouvent dans les racines ou dans la rhizosphère des légumineuses. Ainsi introduire des légumineuses tout en stimulant la croissance des bactéries associées sur un terrain pauvre en nutriments permet d'enrichir le sol en **engrais naturels** et ainsi de favoriser un recouvrement végétal.

C'est pourquoi nous avons étudié les bactéries des racines et de la rhizosphère d'*Anthyllis vulneraria* du site des Avinières. En 2009, Vidal et al. ont trouvé une nouvelle espèce bactérienne dans les racines d'*A. vulneraria*, il s'agit de *Mesorhizobium metallidurans*. En approfondissant ces recherches, nous n'avons jamais retrouvé cette bactérie, ni dans le sol, ni dans les racines de la légumineuse.

Cependant, nous avons trouvé une autre nouvelle espèce bactérienne dans les racines d'*A. vulneraria* et dans le sol des bassins de décantation 2 et 3 (voir **Tableau 1**), *Rhizobium metallidurans*. Nous avons donc poursuivi l'étude sur cette bactérie.

Nous l'avons d'abord entièrement caractérisée :

- Génotypiquement : séquençage de l'ADNr 16S, recA, et atpD, détermination du pourcentage de bases CG, hybridation ADN/ADN avec les plus proches voisins.

L'arbre phylogénétique suivant montre les liens de parenté de *Rhizobium metallidurans* et prouve ainsi qu'elle constitue une nouvelle espèce de *Rhizobium*.

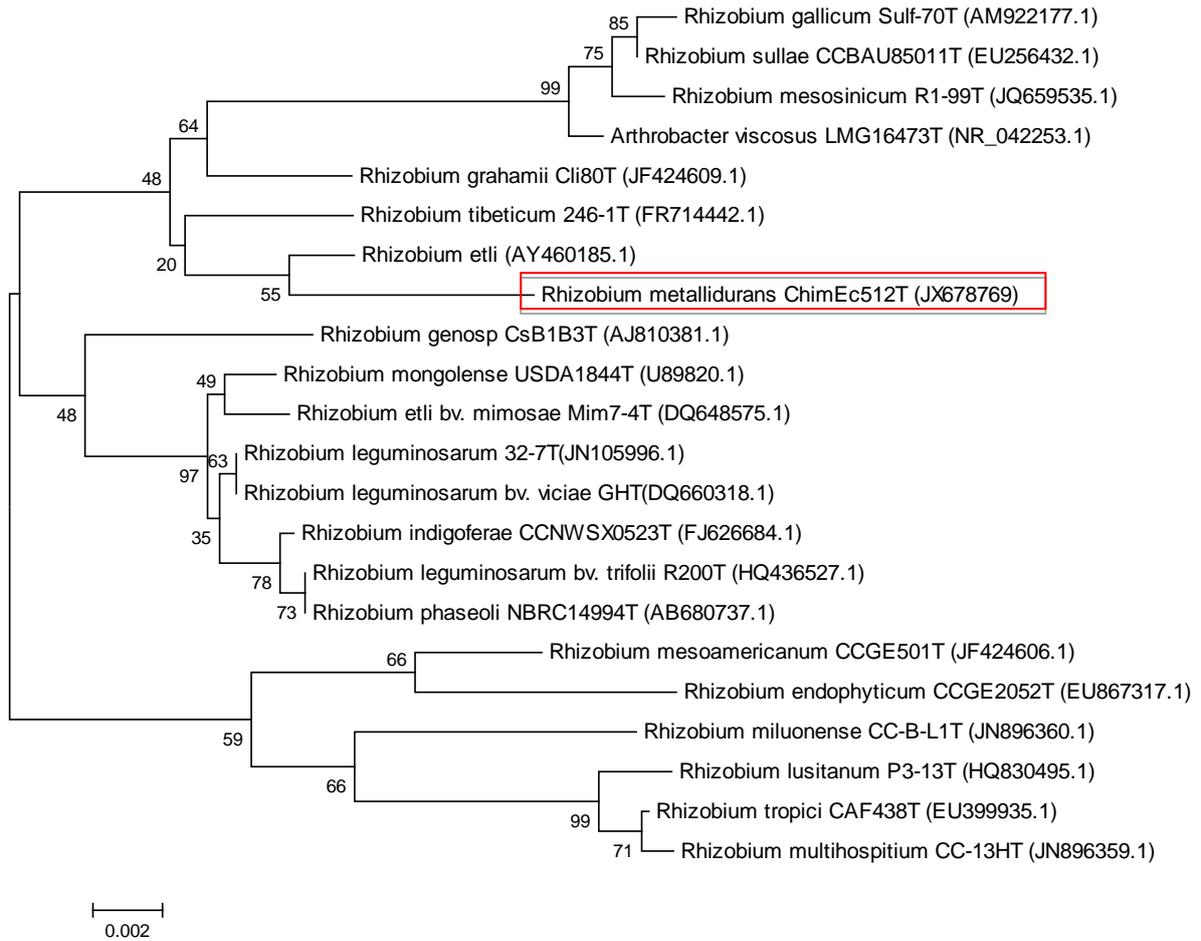


Figure 1. Arbre phylogénétique (méthode de neighbour-joining) basé sur les séquences d'ARNr 16S, montrant les relations entre notre souche *Rhizobium metallidurans* ChimEc512<sup>T</sup> et les souches de référence les plus similaires. L'analyse est basée sur 944 nt. Les nombres d'accèsion de GenBank sont donnés entre parenthèses.

- Phénotypiquement : détermination optimale des conditions de croissance, tests d'assimilation des sucres et des acides aminés, test de résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds, détermination du profil lipidique.

Le graphique suivant montre une caractéristique intéressante de la souche bactérienne. Elle est capable de résister à de très hautes concentrations en ETM. Elle fait donc partie des rares bactéries tolérantes aux ETM.

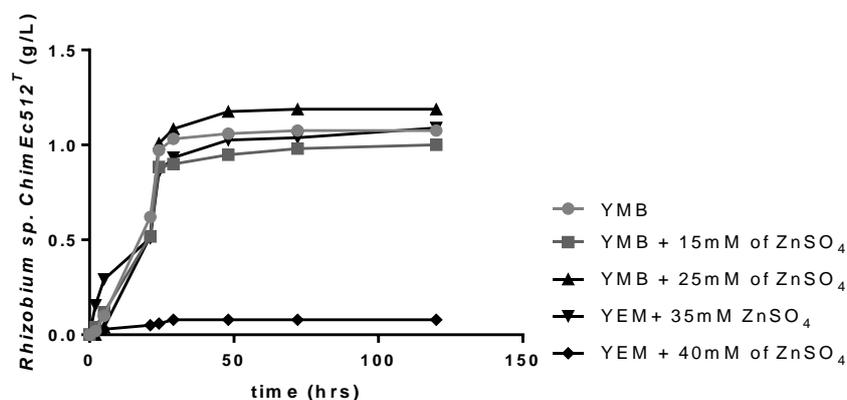


Figure 2. Cinétique de croissance de *Rhizobium metallidurans* sur milieu enrichi en Zn.

### 3- Tests de croissance de *Rhizobium metallidurans*

Nous avons ensuite étudié son métabolisme afin de pouvoir stimuler la croissance de cette bactérie qui enrichit le sol en engrais naturel. L'enjeu est de stimuler **spécifiquement** sa croissance parmi la population bactérienne totale.

Nous avons effectué différents tests de croissance, sur de nombreux milieux minima en un sucre donné. Nous avons ainsi pu prouver qu'elle ne possède pas la glycolyse comme voie de dégradation des sucres mais la voie d'Entner Doudoroff (voir **Figure 3**).

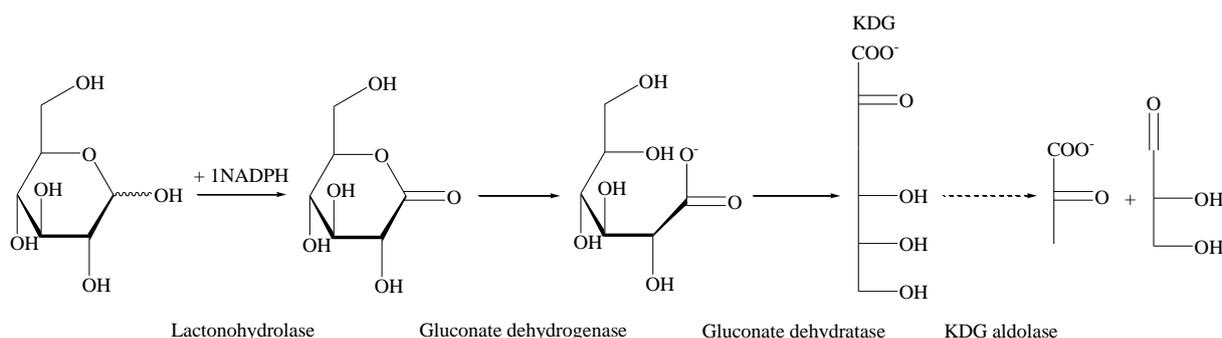


Figure 3. Voie d'Entner Doudoroff non-phosphorylative.

Cette voie métabolique de dégradation des sucres est rare. Le glucose est dégradé dans cette voie métabolique par un intermédiaire particulier, le KDG. Le KDG est présent uniquement dans cette voie et nulle part ailleurs dans la cellule. Il est donc intéressant de pouvoir nourrir cette bactérie avec du KDG, qui n'est présent que dans cette voie métabolique, qui est peu répandue au sein des bactéries vivant dans le sol. Ainsi le KDG stimulerait spécifiquement la croissance de *Rhizobium metallidurans*, ce qui permettrait un enrichissement du sol en engrais naturels. Encore faut-il savoir synthétiser ce KDG... il n'est bien sûr pas commercial et sa synthèse est quasiment inconnue (voir partie Synthèse du KDG).

### 4- Synthèse du KDG, un sucre clé pour le développement de *Rhizobium metallidurans*

#### 4.1. Introduction

Les acides ulosoniques supérieurs sont bien connus pour jouer un rôle important dans la structure des bactéries. Ce sont essentiellement des  $\alpha$ -cétoacides glucidiques tel que l'acide 2-céto-3-désoxy-D-manno-octonique (KDO), présent le plus souvent dans la membrane lipopolysaccharide (LPS) externe des bactéries Gram négatif, et tel que l'acide 2-céto-3-désoxy-D-arabino-heptonique (DAH), qui joue un rôle clé dans la voie métabolique de l'acide shikimique des bactéries et des plantes. Leurs synthèses chimiques ont donc été souvent étudiées dans le but d'élaborer de nouveaux agents antibactériens pour inhiber leurs voies biosynthétiques[1].

Cependant, un acide ulosonique peu connu, l'acide 2-céto-3-désoxy-D-érythro-hexonique (en anglais 2-keto-3-deoxy-D-gluconic acid, KDG) est l'intermédiaire métabolique clé de la voie glycolytique d'Entner-Doudoroff (ED) de certaines espèces microbiennes, et particulièrement des espèces bactériennes Gram négatif vivant dans un environnement stressant [2],[3]. Deux nouvelles espèces intéressantes de bactéries résistantes aux métaux lourds ont été découvertes,

*Rhizobium metallidurans* et *Mesorhizobium metallidurans* [4],[5]. Elles se développent sur un site hautement pollué, Les Avinières (Saint-Laurent-Le-Miner, Gard, dans le sud de la France), en symbiose avec la légumineuse hyperaccumulatrice de Zn *Anthyllis vulneraria* (154,202 mg.kg<sup>-1</sup> en Zinc) [6]. Les nouvelles souches ont été découvertes aux endroits où la pollution est la plus forte, sur les bassins de décantations (Zn: 160 g.kg<sup>-1</sup>, Pb: 84 g.kg<sup>-1</sup> Cd: 1.3 g.kg<sup>-1</sup> de sol) et où la diversité végétale et microbienne est la plus faible. Être capable de se développer sur des sols enrichis en métaux lourds et dépourvus en carbone est un challenge. Avec de telles conditions, nous pensons que leur métabolisme carboné est basé sur la voie métabolique d'ED, la seule voie de dégradation du glucose alternative à la voie glycolytique classique. Cette adaptation peut être expliquée par la forte pression sélective d'un environnement stressant [3],[7]. L'assimilation du KDG prouverait la présence et la fonctionnalité de la voie d'ED dans les souches bactériennes.

Une synthèse rapide et efficace du KDG était donc nécessaire. Toutefois, peu de synthèses stéréosélectives chimiques du KDG ont été décrites dans la littérature. En 1991, Plantier-Royon et al. [8] ont répertorié les premières voies de synthèse du KDG et ont choisi d'améliorer la plus prometteuse. Cependant, le KDG a été obtenu avec un rendement global de 35 % en 6 étapes à partir du D-glucose utilisant un réactif phosphonate de type Wittig-Horner. Durant cette période, Ramage et al. [9] ont également décrit une voie de synthèse chimique du KDG compliquée avec un faible rendement (< 7 % en 4 étapes) à partir de la dioxalan-4-one et d'un réactif de Wittig. Une nouvelle synthèse chimique du KDG est donc nécessaire. Nous avons précédemment décrit la synthèse générale d' $\alpha$ -cétoesters à partir de composés carbonyles en utilisant des alkyldichloroacétates de potassium. A partir d'un D-mannose protégé, la méthode permet la synthèse totale du KDO [10]. Cette stratégie est également très efficace pour préparer le KDO protégé sous la forme d'un ester carboxylique d'isopropyle, plus efficace pour traverser la membrane cellulaire bactérienne [11]. Nous proposons ici une synthèse originale mais simple et énantiomériquement pure de l'ester d'isopropyle du KDG et l'étude de l'apport de ce composé lors d'essais microbiologiques comme stimulateur sélectif de la croissance bactérienne.

#### **4.2. Synthèse de l'ester d'isopropyle du KDG**

A partir de nos précédents travaux sur la synthèse chimique d'acides ulosoniques supérieurs (KDO, DAH) [11], nous avons développé une stratégie rapide, basée sur l'utilisation d'alkyldihalogenoacétates, pour allonger la chaîne carbonée d'un aldose avec une unité  $\alpha$ -cétoester. C'est une méthodologie [n+2] qui aboutit à un acide ulosonique énantiopur. Comme le KDG a une configuration D-érythro, le saccharide de départ devrait être un D-érythrose protégé. Toutefois, en raison de leur instabilité, aucun précurseur non protégé de type D-érythrose n'est disponible commercialement. Evans et al. [14] ont décrit une voie d'accès au 4-*O*-tert-butyl-diméthylsilyl-2,3-*O*-isopropylidène-D-érythrose. Mais cette synthèse est compliquée et difficilement reproductible.

Un composé avec la configuration D-*thréo* a donc été choisi comme précurseur glucidique. La synthèse du KDG décrite ici est basée sur une étape clé d'épimérisation de la position  $\beta$  du D-thréose. L'épimérisation est induite par l'oxydation de Swern du D-thréitol protégé suivie d'une condensation diastéréosélective de type Darzens [15].

L'anion de type énolate de potassium dérivé du dichloroacétate d'isopropyle est un équivalent synthétique du synthon ("C(O)COO"). Il a été ajouté sur le D-thréose protégé judicieusement. Ce dernier a été préparé à partir du 2,3-*O*-isopropylidène-D-thréitol 1 commercial (Schéma 1).

D'après Condon et al. [16], **1** est monosilylé sélectivement en **2** avec le chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle et un équivalent d'une base forte, NaH. L'oxydation de Swern est effectuée en milieu basique et induit comme prévu l'épimérisation partielle de la position  $\beta$  de **2** [17]. Cette étape conduit à une mixture de D-érythrose et de D-thréose protégés **3a/3b**, qui ne sont pas isolés mais directement engagés dans l'étape suivante. La réaction de Darzens modifiée est également effectuée en milieu basique sur les aldéhydes bruts **3a/3b**, avec l'isopropyldichloroacétate de potassium **4** dans un mélange alcool-éther. La proportion des solvants (isopropanol/ether: 50/50) joue un rôle important. L'isopropanol est utilisé comme solvant protique pour stabiliser l'alcoolate formé durant la première partie de la réaction. La purification du produit brut par chromatographie sur gel de silice aboutit à un mélange de diastéréoisomères d'esters  $\alpha$ -chloroglycidiques **5** avec un rendement élevé.

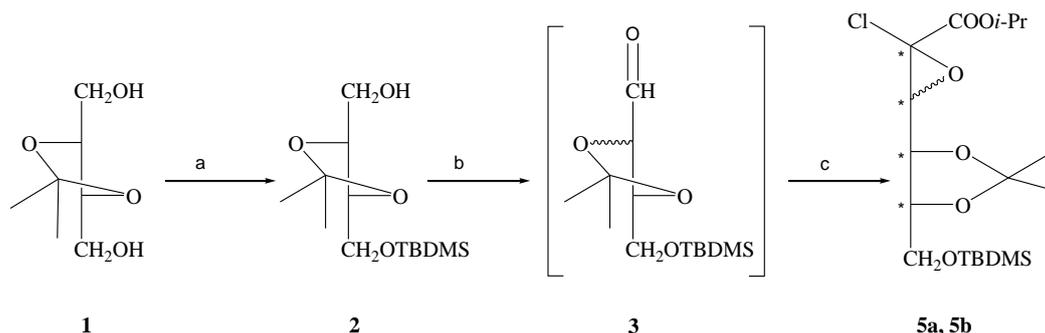


Schéma 1. Synthèse des composés **1-5**. Conditions et réactifs: (a) 1 équiv NaH, THF, 45 min, 5 °C, puis 1 équiv TBDMSCl, THF, N<sub>2</sub>, 16 h, 20 °C, 98 %; (b) 1.3 équiv ClC(O)C(O)Cl, 2.6 équiv DMSO, DCM, N<sub>2</sub>, 20 min, -78 °C; puis 5 équiv TEA, 20 °C, 1 h; (c) 2 équiv K, *i*-PrOH, Et<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>, 0 °C, 2 h, 71 %.

Il est important de souligner que la réaction de Darzens aboutit à la formation de deux nouveaux centres stéréogéniques. Si l'épimérisation en position C-4 n'est pas totale, huit diastéréoisomères peuvent être obtenus. De plus, nous avons précédemment montré que le groupement ester carboxylique se positionne toujours en *trans* de la chaîne carbonée [15]. Et d'après nos travaux sur la réaction de Darzens modifiée [9], [10] un mélange de deux configurations en C-3 est toujours obtenu. La présence de seulement deux épimères est observée en RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C. Nous concluons donc que l'épimérisation en position C-4 est totale. Le ratio des deux épimères **5a/5b** a été déterminé par l'intégration du proton H-6 (60/40).

Précédemment, nous avons décrit l'ouverture douce des  $\alpha$ -halogéno-époxy esters avec des acides de Lewis pour introduire directement un motif  $\beta$ -halogéno- $\alpha$ -cétoester sur un composé carboné [15]. Dans notre cas, l'application de cette stratégie sur les esters  $\alpha$ -chloroglycidiques protégés **5a/5b** devrait aboutir au précurseur  $\beta$ -iodo- $\alpha$ -cétoester attendu **6**. **5a/5b** sont alors traités avec un équivalent d'iodure de magnésium dans l'éther. Cela conduit au réarrangement du cycle chloroépoxy en un mélange diastéréoisomérique de  $\beta$ -iodo- $\alpha$ -cétoesters **6a/6b** avec un excellent rendement (Schéma 2).

La réduction de **6a/6b** donne accès à la molécule cible protégée **7**. Deux approches ont alors été étudiées. La première fut la réduction de la liaison C-I par une solution aqueuse de NaHSO<sub>3</sub> pour donner la forme énol de **7**. Une stratégie efficace d'isomérisation-réduction one-pot a également été développée. Elle est basée sur la préparation de l'énolate dérivé d'un  $\alpha$ -cétoester formé lors de la réaction du précurseur  $\beta$ -iodo- $\alpha$ -cétoester **6** avec du magnésium activé (également utilisé pour préparer le réactif de Grignard correspondant) (Schéma 1) [18].

Le magnésium a été volontairement utilisé avec un ratio  $Mg/I_2 = 2/1$  lors de la préparation de  $MgI_2$  pour transformer complètement *in situ* les esters  $\alpha$ -chloroglycidiques en énolates de iodomagnésium **6'** (Schéma 2). Ces énolates ont alors été hydrolysés pour donner l'énol **7**.

La présence d' $\alpha$ -énolester est due à la présence de liaisons hydrogène intramoléculaires stabilisantes entre l'alcool de la fonction énole et le carbonyle de la fonction acide carboxylique. L' $\alpha$ -cétocester **7** a été obtenu après une simple filtration sur silice.

En dépit de la fragilité des dérivés érythro, nous avons prouvé que ces deux méthodologies d'isomérisation-réduction de **5** étaient très efficaces et aboutissaient directement au cétocester **7** avec de bons rendements.

Une hydrolyse acide finale par l'acide formique (50 % in water) a été effectuée pour retirer simultanément les groupements isopropylidène et *O*-silyle pour donner le composé **8**. L'ester d'isopropyle a été conservé pour permettre au KDG protégé **8** de traverser la membrane cellulaire Gram négatif [19],[20]. Le produit **8** a été persilylé en **9** pour permettre une meilleure caractérisation par RMN, IR et GCMS. La silylation s'effectue à l'aide d'une méthode verte basée sur l'utilisation d'hexaméthylsilylazane catalysée par des plantes hyperaccumulatrices de Zn, décrite précédemment [21]. Dans ces conditions, **8** a donné directement la molécule cible entièrement silylée **9** (rendement quantitatif). En RMN  $^1H$ , chaque hydrogène des groupements  $CH_2$  de **9** apparaît comme un doublet de doublet à 2.8 et 3.1 ppm. Ces données sont caractéristiques d'un motif ester pyruvique. Les données d'IR confirment cette attribution. Nous avons clairement observé la présence des bandes d'absorption à  $1711\text{ cm}^{-1}$  de la liaison  $C=O$  de la fonction cétone et à  $1739\text{ cm}^{-1}$  de la liaison  $C=O$  du groupement ester, caractéristiques de l'ester  $\alpha$ -cétocarboxylique.

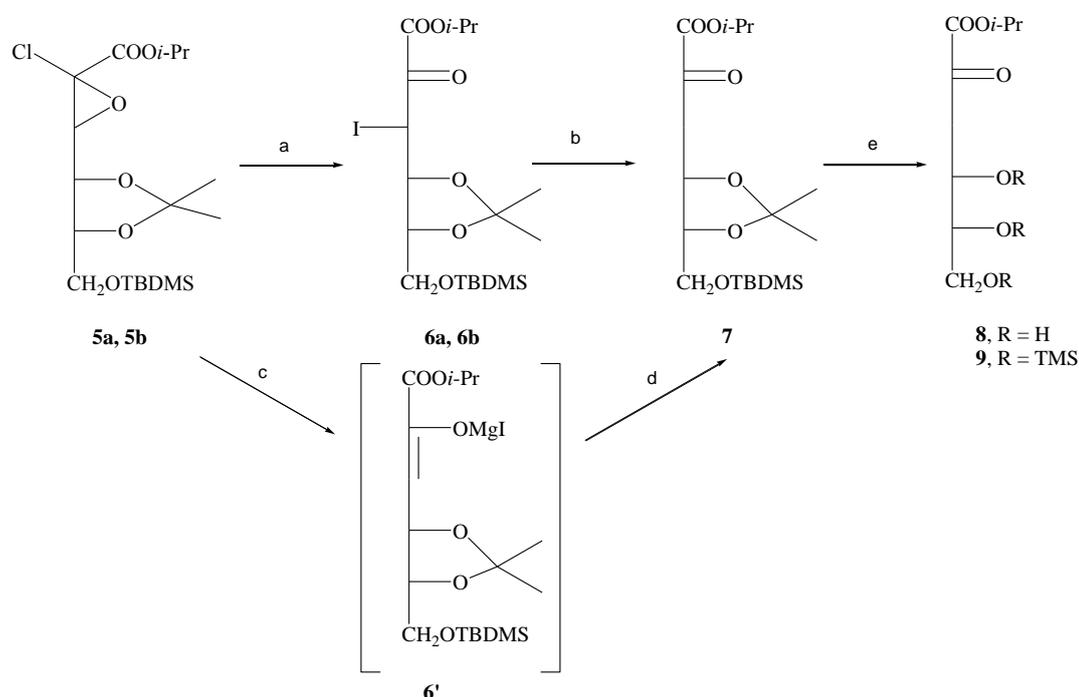


Schéma 2. Synthèse des composés 6-9. Conditions et réactifs: (a, b; étape one-pot séquentielle) 1.3 équiv  $Mg$ ,  $Et_2O$ , 1.3 équiv  $I_2$ , 3 h,  $35\text{ }^\circ C$  dans le noir puis aq.  $Na_2S_2O_5$  8 %, 30 min,  $20\text{ }^\circ C$ , 64 % (c, d; étape one-pot) 2.1 équiv  $Mg$ ,  $Et_2O$ , 1 équiv  $I_2$ , 1 h à  $35\text{ }^\circ C$  dans le noir puis 15 h à  $20\text{ }^\circ C$ , 78 %; (e) Acide formique aq. 50 %,  $20\text{ }^\circ C$ , 24 h, 87 %.

## 5. Tests microbiologiques de croissance compétitive

Le KDG est l'intermédiaire métabolique clé de la voie d'ED. Il est spécifique de cette voie métabolique et ne peut pas être métabolisé lors d'une autre voie glycolytique. Il peut être utilisé comme marqueur d'une voie d'ED fonctionnelle. De plus, il pourrait être employé pour stimuler spécifiquement la croissance de bactéries utilisant la voie d'ED et empêcher la compétition pour accéder au glucose.

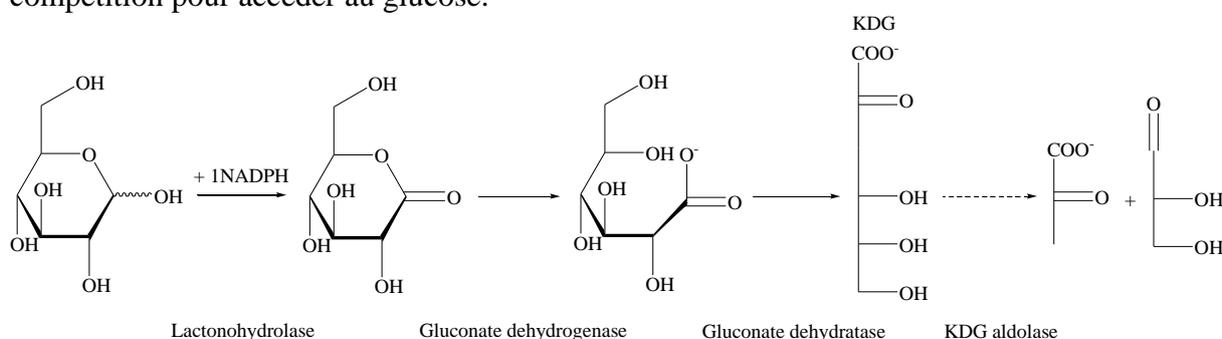


Schéma 3. Voie métabolique non phosphorylante d'Entner Doudoroff.

A Saint-Laurent-Le-Minier, les ressources en carbone disponibles sont faibles en raison de la forte pollution et de la faible abondance de la végétation. Un vaste programme de revégétalisation a démarré avec une plante hyperaccumulatrice et son hôte *Rhizobium metallidurans*, *Anthyllis vulneraria* [22]. *Rhizobium metallidurans* vit en symbiose avec la légumineuse et favorise sa croissance en produisant de l'ammonium à partir de la fixation du N<sub>2</sub> atmosphérique. Ainsi la stimulation sélective du développement de *Rhizobium metallidurans* par rapport à la population microbienne globale du sol de Saint-Laurent-Le-Minier devrait stimuler la croissance d'*Anthyllis vulneraria*.

La diversité microbienne du sol pollué de Saint-Laurent-Le-Minier a été étudiée. Une approche -culture indépendante a été choisie pour créer une librairie d'ADNr 16S de 303 clones à partir de la rhizosphère d'*Anthyllis vulneraria*. D'après des recherches de similarité sur BLASTN, 93% des clones sont des nouvelles espèces. Nous avons choisi les souches cultivées les plus proches (> 95% de similarité) pour comparer leur croissance avec *Rhizobium metallidurans* sur un milieu minimal en KDG. L'évolution de la population bactérienne n'a pas pu être mesurée en solution car la majorité des souches produit des polysaccharides extracellulaires qui forment des agrégats. La comparaison des croissances a été suivie en milieu solide avec du glucose comme seule source carbonée, pour un contrôle de croissance positif, et avec du KDG comme seule source carbonée pour prouver le fonctionnement de la voie d'ED (Table 1).

Table 1. Comparaison de croissance de bactéries contraintes proches issues de la librairie de clones en milieu minimal en glucose et en KDG.; +, croissance; -, pas de croissance; f, faible croissance; ND, non déterminé; \**Rhizobium metallidurans* a été identifié dans le sol en présence de nodules d'*Anthyllis vulneraria*; \*\**Staphylococcus aureus* n'est pas présent dans le sol, il représente un contrôle négatif.

Milieu enrichi en sucre	Nombre relatif de clones	Glucose	Ester d'isopropyle du KDG
<i>Rhizobium metallidurans</i> *	2	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> **	0	+	-
<i>Arenimonas metalli</i>	1	+	-

<i>Azotobacter beijerinckii</i>	1	+	+
<i>Bradyrhizobium canariense</i>	3	+	f
<i>Brevibacillus brevis</i>	4	+	-
<i>Burkholderia sp.</i>	2	+	+
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	1	+	-
<i>Limnobacter litoralis</i>	3	-	-
<i>Nitrospira sp.</i>	7	+	-
<i>Nitrosospora multiformis</i>	6	+	-
<i>Rubrobacteridae</i>	1	ND	ND
<i>Segetibacter koreensis</i>	3	+	-
<i>Sphingomonas elodea</i>	2	+	+
<i>Thermobaculum terrenum</i>	1	+	-
<i>Xanthomonas campestris</i>	2	+	-

75 % des souches les plus proches n'ont pas été capables de se développer sur un milieu minimal en KDG. Le KDG a permis ainsi la croissance de seulement 25 % des souches les plus proches de *Rhizobium metallidurans* en évitant la compétition pour assimiler le substrat. De plus, les souches dont la croissance est favorisée par le KDG sont toutes capables de produire de l'ammonium en fixant le N<sub>2</sub> atmosphérique, qui enrichit le sol pollué et favorise la croissance des plantes hyperaccumulatrices.

## 6. Détermination des gènes de résistance des bactéries aux métaux lourds

L'ADN environnemental des échantillons du sol a été extrait et cloné dans *E. coli* pour créer une librairie métagénomique de 273 000 clones environ. Un screening sur milieu enrichi artificiellement en Zn (8 mM de ZnSO<sub>4</sub>) a été réalisé. 36 clones de *E. coli* ont été trouvés comme étant résistants au Zn et donc contenant potentiellement des gènes de résistance aux métaux lourds. Les gènes ont été séquencés et restent à analyser.

## 7. Conclusion

Nous avons décrit ici une synthèse originale et énantiomériquement pure de l'ester d'isopropyle de l'acide 2-céto-3-désoxy-D-érythro-hexonique avec le meilleur rendement. La chiralité du produit final a été contrôlée lors de l'étape d'oxydation de Swern suivie par la condensation diastéréosélective de type Darzens donnant lieu à l'épimérisation de la position β du KDG. Les résultats présentés constituent la meilleure synthèse du KDG partiellement ou totalement protégé. L'assimilation de KDG partiellement protégé a été testé sur toute la diversité microbienne du sol de Saint-Laurent-Le-Minier au travers des essais de croissance. La croissance de 25 % de la population microbienne totale a été favorisée par l'ester d'isopropyle de l'acide 2-céto-3-désoxy-D-érythro-hexonique. Ces souches bactériennes, qui sont capables de produire de l'ammonium, peuvent apporter des bénéfices importants à l'agriculture, spécialement sur un sol si pauvre en nutriments. Cette biotechnologie microbienne favorisée par l'apport en ester d'isopropyle du KDG constitue un procédé vert prometteur pour restaurer les sols pollués en stimulant un projet de revégétalisation.

## Références

- [1] C. Grison, N. Barthes, C. Finance, R.E. Duval, Synthesis and antibacterial activity of novel enolphosphate derivatives, *Bioorganic Chemistry*, 38 (2010) 218–223.
- [2] T. Conway, The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology, *FEMS Microbiology Reviews*, (1992) 1–27.
- [3] J.-P. Pellmont, *Bactéries et environnement*, 1993.
- [4] C. Vidal, C. Chantreuil, O. Berge, L. Maure, J. Escarre, G. Bena, B. Brunel, J.-C. Cleyet-Marel, *Mesorhizobium metallidurans* sp nov, a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metalcolous soil in Languedoc, France, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59 (2009) 850–855.
- [5] C.M. Grison, S. Jackson, E. Petit, A. Dobson, C. Grison, *Rhizobium metallidurans* sp nov, a symbiotic heavy metal resistant bacterium isolated from the *Anthyllis vulneraria* Zn-hyperaccumulator, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Submitted (2013).
- [6] G. Losfeld, P.V. de La Blache, V. Escande, C. Grison, Zinc hyperaccumulating plants as renewable resources for the chlorination process of alcohols, *Green Chemistry Letters and Reviews*, 5 (2012) 451–456.
- [7] M. Chavarría, P.I. Nickel, D. Pérez-Pantoja, V. de Lorenzo, The Entner–Doudoroff pathway empowers *Pseudomonas putida* KT2440 with a high tolerance to oxidative stress, *Environmental Microbiology*, 15 (2013) 1772–1785.
- [8] R. Plantier-Royon, D. Anker, J. Robert-Baudouy, Nouvelle synthèse de l'acide 3-deoxy-D-erythro-2-hexulosonique (KDG) à partir du D-glucose, *Journal of Carbohydrate Chemistry*, (1991) 239–249.
- [9] R. Ramage, A.M. MacLeod, G.W. Rose, Dioxalanones as synthetic intermediates Part 6 Synthesis of 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (KDO), 3-deoxy-D-arabino-2-heptulosonic acid (DAH) and 2-keto-3-deoxy-D-gluconic acid (KDG), *Tetrahedron*, 47 (1991) 5625–5636.
- [10] P. Coutrot, C. Grison, M. Tabyaoui, A new synthesis of 3-Deoxy-D-Manno-2-Octulosonic Acid (KDO), *Tetrahedron Letters*, 34 (1993) 589–592.
- [11] P. Coutrot, S. Dumarcay, C. Finance, M. Tabyaoui, B. Tabyaoui, C. Grison, Investigation of new potent KDO-8-phosphate synthetase inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 9 (1999) 949–952.
- [12] P. Kampfer, Towards a standardized format for the description of a novel species (of an established genus): *Ochrobactrum gallinifaecis* sp nov, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53 (2003) 893–896.
- [13] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, *Journal of Molecular Biology*, 215 (1990) 403–410.
- [14] D.A. Evans, V.J. Cee, S.J. Siska, Asymmetric induction in methyl ketone aldol additions to alpha-alkoxy and alpha,beta-bisalkoxy aldehydes: a model for acyclic stereocontrol, *Journal of the American Chemical Society*, 128 (2006) 9433–9441.
- [15] P. Coutrot, C. Grison, M. Tabyaoui, S. Czemecki, J.M. Valery, *Journal of Chemical Society, Chemical Communication*, (1988) 1515–1516.
- [16] P.G. McDougal, J.G. Rico, Y.I. Oh, B.D. Condon, A convenient procedure for the monosilylation of symmetric 1,n-diols, *Journal of Organic Chemistry*, 51 (1986) 3388–3390.
- [17] J. Taunton, J.L. Collins, S.L. Schreiber, Synthesis of natural and modified trapoxins, useful reagents for exploring histone deacetylase function, *Journal of the American Chemical Society*, 118 (1996) 10412–10422.
- [18] C. Grison, S. Petek, P. Coutrot, Investigation into the regioselective C-deuteration of  $\alpha$ -keto esters, *Tetrahedron*, 61 (2005) 7193–7200.
- [19] P.-H. Liang, J. Lewis, K.S. Anderson, A. Kohen, F.W. D'Souza, Y. Benenson, T. Baasov, Catalytic Mechanism of Kdo8P Synthase: Transient Kinetic Studies and Evaluation of a Putative Reaction Intermediate†, *Biochemistry*, 37 (1998) 16390–16399.

- [20] Po-Huang Liang, A. Kohen, T. Baasov, K.S. Anderson, Catalytic mechanism of KDO8P synthase Pre-steady-state kinetic analysis using rapid chemical quench flow methods, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 7 (1997) 2463–2468.
- [21] V. Escande, L. Garoux, C. Grison, Y. Thillier, F. Debart, J.-J. Vasseur, C. Boulanger, C. Grison, Ecological catalysis and phytoextraction: Symbiosis for future, *Applied Catalysis B: Environmental*, (2013) in press.
- [22] G. Losfeld, V. Escande, T. Mathieu, C. Grison, Phytoextraction et biodégradation dynamisée : une approche interdisciplinaire inventive au service de l'environnement, *Techniques de L'ingénieur Innovations En Environnement*, base documentaire : TIB517DUO. (2013).

## V- Recherche des conditions optimales de phytoextraction

### 1. Essais d'inoculations microbiennes

#### Résumé :



Valorhiz  
Laboratoire d'Adaptation des Bactéries

CENTRE D'ÉCOLOGIE  
FONCTIONNELLE  
& ÉVOLUTIVE

#### Une étude des microorganismes associés optimisant les cultures en phytoextraction



Des travaux ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration entre la société Valorhiz et le CEFE sur l'étude et l'effet d'inoculations microbiennes (bactéries et champignons symbiotiques), au stade semis ou jeunes pousses, sur la croissance des plants et sur leur capacités à accumuler le Zinc, une fois transférés sur substrats enrichis en sol contaminé, puis directement sur sites.

Les objectifs principaux sont l'optimisation des conditions de culture, croissance et hyperaccumulation en exploitant les résultats nouveaux de l'équipe sur les microorganismes associés aux espèces végétales ciblées.

Les essais sont regroupés dans le tableau D.2 :

- Essais Avril 2012 : Inoculation de *Noccaea caerulea* au stade plantule avec 2 souches mycorhiziennes R ou H. Inoculation par irrigation et culture dans un mélange contenant 15% de sol contaminé.
- Essais Juin-Juillet 2012 : Inoculation de *Noccaea caerulea* au stade plantule ou graine avec 3 souches mycorhiziennes A, R ou RT ; Simple ou double inoculation d'*Anthyllis vulneraria* avec les mêmes souches de mycorhizes et la nouvelle souche bactérienne. Inoculation par irrigation ou enrobage et culture dans un mélange contenant 15% de sol contaminé.

Tableau D.2 : Liste de tous les essais effectués en pots.

Nom Essai	Espèce végétale	Stade d'inoculation	Souche utilisée	Type d'inoculation	Stade d'exposition	% sol contaminé
Avril	<i>Noccaea caerulescens</i>	Plantule	Aucune (Témoin)	---	Plantule	15%
			VAM R	Irrigation	Plantule	15%
			VAM H	Irrigation	Plantule	15%
Juin Juillet	<i>Noccaea caerulescens</i>	Plantule	Aucune (Témoin)	---	Plantule	15-30%
			VAM R	Irrigation	Plantule	15-30%
			VAM AZ	Irrigation	Plantule	15-30%
			VAM RT	Irrigation	Plantule	15-30%
		Graine	aucune	---	Plantule	15-30%
			VAM R	Irrigation	Plantule	15-30%
			VAM AZ	Irrigation	Plantule	15-30%
			VAM RT	Irrigation	Plantule	15-30%
			VAM R	Enrobage	Plantule	15-30%
			VAM AZ	Enrobage	Plantule	15-30%
			VAM RT	Enrobage	Plantule	15-30%
		Plantule	Aucune (Témoin)	---	Plantule	15-30%
			VAM R	Irrigation	Plantule	15-30%
			VAM AZ	Irrigation	Plantule	15-30%
			VAM RT	Irrigation	Plantule	15-30%
RHI			Plantule	15-30%		
VAM R + RHI	Irrigation		Plantule	15-30%		
VAM AZ + RHI	Irrigation		Plantule	15-30%		
VAM RT + RHI	Irrigation		Plantule	15-30%		
Graine	Aucune (Témoin)		---	Plantule	15-30%	
	VAM R		Irrigation	Plantule	15-30%	
	VAM AZ		Irrigation	Plantule	15-30%	
	VAM RT	Irrigation	Plantule	15-30%		
	RHI		Plantule	15-30%		
	VAM R + RHI	Irrigation (les 2)	Plantule	15-30%		
	VAM AZ + RHI	Irrigation (les 2)	Plantule	15-30%		
	VAM RT + RHI	Irrigation (les 2)	Plantule	15-30%		
	VAM R	Enrobage	Plantule	15-30%		
	VAM AZ	Enrobage	Plantule	15-30%		
	VAM RT	Enrobage	Plantule	15-30%		
RHI	Enrobage	Plantule	15-30%			
VAM R + RHI	Enrobage (les 2)	Plantule	15-30%			
VAM AZ + RHI	Enrobage (les 2)	Plantule	15-30%			
VAM RT + RHI	Enrobage (les 2)	Plantule	15-30%			

a) Essai Avril

Les individus ont été semés en barquettes début Avril 2012 dans un mélange tourbe/perlite 85:15 %. Après 2 semaines de croissance, les jeunes plantules ont été inoculées par irrigation et transplantées dans des godets contenant un mélange sol contaminé/terreau/perlite 15:70:15%. Puis après 2 semaines de croissance supplémentaires, elles ont été transférées dans des pots contenant le même mélange. Pendant toute la durée de l'expérimentation les pots étaient placés en extérieur et protégés de la chaleur estivale grâce à une ombrière. Après 5 mois de croissance, 6 individus ont été récoltés par traitement. Pour chacun les masses fraîches et sèches de la rosette ont été pesées. Puis les rosettes ont été broyées à l'aide d'un mortier puis placées dans des tubes eppendorf contenant de l'acide sulfosalicylique. Cet acide est responsable de l'éclatement des cellules et de la libération dans le milieu du contenu cellulaire. La concentration en Zn a ensuite été estimée dans cette solution par dosage colorimétrique après réaction avec un agent chélatant, le zincon. En parallèle, les taux de mycorhization des racines ont été mesurés.

Tableau D.3 : Résultats du test Avril avec *Noccea caerulescens*

Inoculation	Biomasse sèche feuilles mg/plant	Concentration Zn µg/g	Mycorhization % fragments racines
Souche H Date 1	77.4 ± 0.7	4609 ± 359	4.39 ± 1.71
Souche R Date 1	78.6 ± 0.9	3321 ± 291	10 ± 4.5
Souche R2 Date 2	76.4 ± 0.5	5563 ± 278	18.2 ± 6
Témoin Date 2	75.9 ± 0.5	6219 ± 509	13.3 ± 6.5

Les résultats montrent qu'il y a une différence significative pour la biomasse (Tableau D.3) entre les traitements, avec des valeurs supérieures pour H1 et R1 en comparaison avec R2 et T2. Cependant cet effet semble plus dû à la date de transplantation qu'aux différents traitements. Les concentrations en Zn mesurées dans les feuilles de la rosette sont significativement supérieures pour R2 et T2 puis pour H1 et enfin pour R1. Cependant aucun individu ne présente des concentrations supérieures à 8000 ppm. Cette concentration est trop faible pour les activités de catalyse chimique. Un plant inoculé avec la souche H permet d'extraire en moyenne 10954 µg. Si on plante 100 individus au m<sup>2</sup> sur un hectare, il est possible d'extraire environ 11 kg de Zn. Cependant cette concentration est obtenue pour des cultures en pot avec 15% de sol contaminé et on peut s'attendre à des concentrations supérieures pour des cultures *in situ* avec 50% de sol contaminé. Le nombre de fragments de racines présentant du mycélium ou des spores sont faibles, du mycélium est observé sur moins de 20% des fragments racinaires et des spores sur moins de 5%. Ces fréquences sont trop faibles pour pouvoir confirmer une mycorhization des racines.

b) Essai Juin-Juillet *Noccea caerulescens*

*Inoculation stade plantule*

Les individus ont été semés en barquettes début Juillet 2012 dans un mélange tourbe/perlite 80:20 %. Après 1 mois de croissance, les jeunes plantules ont été inoculées par irrigation et transplantées dans des godets contenant un mélange avec 15 à 30% de sol contaminé et 85 à 70% d'un substrat de culture. Puis après 2 semaines de croissance supplémentaires ils ont été transférés dans des pots contenant le même substrat. Pendant toute la durée de l'expérimentation les pots étaient placés en extérieur et protégés de la chaleur estivale grâce à une ombrière occultante. Après 2,5 et 6,5 mois de croissance, 6 individus ont été récoltés par

traitement. Pour chacun les masses fraîches et sèches de la rosette ont été pesées. La concentration en Zn a ensuite été estimée dans cette solution par dosage au zincon. En parallèle, les taux de mycorhization des racines ont été mesurés.

#### *Inoculation stade graine*

Les individus ont été semés et inoculés (par irrigation ou enrobage) directement en godet fin Juin 2012 dans un mélange tourbe/perlite 80:20 %. Après 1 mois de croissance, les jeunes plantules ont été transplantées dans des pots contenant un mélange avec 15 à 30% de sol contaminé et 85 à 70% d'un substrat de culture. Pendant toute la durée de l'expérimentation les pots étaient placés en extérieur et protégés de la chaleur estivale grâce à une ombrière. Après 7 mois de croissance, 6 individus ont été récoltés par traitement. Pour chacun les masses fraîches et sèches de la rosette ont été pesées. Puis les rosettes ont été dosées par la méthode au zincon. En parallèle, les taux de mycorhization des racines ont été mesurés. Compte-tenu de l'âge des plants lors de la récolte un seul suivi a été effectué.

*Tableau D.4 : Résultats du test Juin-Juillet avec *Noccaea caerulescens*, inoculation au stade plantule*

Inoculation	Biomasse sèche des feuilles mg/plant	Biomasse fraîche des racines mg/plant	Concentration Zn µg/g	Mycorhization % fragments racines
Souche AZ	96.7 ± 17.6	76.3 ± 13	15165 ± 1355	21.9 ± 11.5
Souche R	58.3 ± 15.9	71.7 ± 17.3	15995 ± 1087	26.9 ± 13.1
Souche RT	102 ± 16	76.8 ± 14.4	16193 ± 1763	28.8 ± 13.1
Témoin	161 ± 37	109 ± 27	13427 ± 2402	21.6 ± 9.9

Seuls sont présentés les résultats de l'inoculation au stade plantule, les autres résultats sont en cours d'analyse. Les masses sèches des parties aériennes (Tableau D.4) de tous les individus inoculés sont inférieures à celles des individus non inoculés. Pour la masse fraîche des racines il n'y a pas de différences significatives entre le témoin et les individus inoculés. Cependant, comme pour les parties aériennes, des masses plus faibles pour les individus inoculés ont été observées. Il n'y a pas de différences significatives entre les traitements pour les concentrations et les accumulations en Zn. Cependant les concentrations sont plus élevées. Les concentrations (plus de 1% et plus de 2% pour certains individus), dépassent toutes le seuil de 8000 ppm, mais la production de biomasse est faible. En effet en prenant la quantité la plus grande, sont extraits 1887 µg par individus. Une plantation d'un hectare avec une densité de 100 individus au m<sup>2</sup> permet d'extraire seulement 1.9 kg de Zn ce qui est bien inférieur au 10 kg estimé pour les individus du test d'Avril inoculés avec la souche H. La fréquence de présence de mycélium sur les fragments de racines des individus est similaire pour tous les traitements et aux alentours de 25%. Cela confirme que la mycorhization des racines avec ses souches est difficile.

#### a) Essai Juin-Juillet *Anthyllis vulneraria*

##### *Inoculation stade plantule*

Les individus ont été semés en barquettes fin Mai 2012 dans un mélange tourbe/perlite 80:20 %. Après 1 mois de croissance, les jeunes plantules ont été inoculées par irrigation et transplantées dans des pots contenant un mélange avec 15 à 30% de sol contaminé et 85 à 70% d'un substrat de culture. Pendant toute la durée de l'expérimentation, les pots ont été placés en extérieur et protégés de la chaleur estivale grâce à une ombrière. Après 3,5 et 7,5 mois de croissance 6 individus ont été récoltés par traitement. Pour chacun les masses fraîches

et sèches de la rosette ont été pesées. Puis les rosettes ont été broyées à l'aide d'un mortier puis placées dans des tubes eppendorf contenant de l'acide sulfosalicylique. La concentration en Zn a ensuite été par dosage au zincon. En parallèle, les taux de mycorhization des racines ont été mesurés.

#### *Inoculation stade graine*

Les individus ont été semés et inoculés (par irrigation ou enrobage) directement en godet fin Juin 2012 dans un mélange tourbe/perlite 80:20 %. Après 1 mois de croissance, les jeunes plantules ont été transplantées dans des pots contenant un mélange avec 15 à 30% de sol contaminé et 85 à 70% d'un substrat de culture. Pendant toute la durée de l'expérimentation les pots ont été placés en extérieur et protégés de la chaleur estivale grâce à une ombrière. Après 4 et 7,5 mois de croissance 6 individus ont été récoltés par traitement. Pour chacun les masses fraîches et sèches de la rosette ont été pesées. Puis les rosettes ont été broyées à l'aide d'un mortier puis placées dans des tubes eppendorf contenant de l'acide sulfosalicylique. La concentration en Zn a été estimée par la méthode au zincon. En parallèle, les taux de mycorhization des racines ont été mesurés. Les résultats sont en cours d'acquisition et de traitement.

*Tableau D.5 : Résultats du test Juin-Juillet avec Anthyllis vulneraria, inoculation au stade plantule*

Inoculation	Biomasse sèche des feuilles mg/plant	Biomasse fraîche des racines mg/plant	Concentration Zn µg/g	Mycorhization % fragments racines	Nombre de nodules /plant
Souche AZ	421 ± 102	1.51 ± 0.47	6603 ± 669	41.8 ± 17.5	1.75 ± 1.28
Souche AZ + rhizobium	890 ± 193	2.36 ± 0.53	7662 ± 400	25.6 ± 12.7	84.3 ± 65
Souche R	202 ± 16	0.53 ± 0.03	6929 ± 1219	26.5 ± 9.3	25 ± 7.6
Souche R + rhizobium	554 ± 92	1.17 ± 0.31	5295 ± 272	53.9 ± 15.2	2.33 ± 1.54
Souche RT	826 ± 175	2.08 ± 0.56	6223 ± 775	46.7 ± 7.0	5.67 ± 3.9
Souche RT + rhizobium	101 ± 23	0.35 ± 0.05	5631 ± 1077	17.8 ± 8.1	7.67 ± 4.95
Témoin	206 ± 38	0.66 ± 0.09	6670 ± 330	4.44 ± 1.81	13.5 ± 7.8
Rhizobium	198 ± 36	0.58 ± 0.12	5385 ± 904	1.67 ± 1.25	9.33 ± 4.3

Seuls sont présentés les résultats de l'inoculation au stade plantule, les autres résultats sont en cours d'analyse. Sur la masse sèche des parties aériennes, il n'y a pas d'effet significatif de l'inoculation par les rhizobia. En revanche, il y a un effet de la mycorhization et celui-ci est variable en fonction de l'inoculation ou non par les rhizobia (Tableau D.5). En moyenne, la biomasse est plus importante chez les individus inoculés et cet effet est d'autant plus important en double inoculation. Les concentrations en Zn mesurées dans les feuilles d'Anthyllis ne sont pas significativement différentes entre les traitements et le témoin. Toutes les concentrations sont inférieures au seuil de 8000 ppm qui doit être atteint pour la préparation de catalyseurs efficaces. Le meilleur traitement AZ/R+ permet de récolter en moyenne 5,6mg par individu. Une plantation d'un hectare avec une densité de 100 individus au m<sup>2</sup> permet donc de récolter 5,6 kg de Zn. Ces valeurs sont valables pour des individus ayant poussé en pot dont la proportion de sol contaminé ne dépasse pas 30%. Or, *in situ*, la surface exploitable par les racines n'est pas limitante et la proportion de sol contaminé est plus importante. On attend donc des concentrations plus élevées. Comme pour les parties aériennes, il y a des différences significatives entre traitements pour la biomasse des racines.

Il y a un effet de la souche de mycorhize, mais pas de l'inoculation par les rhizobia. Paradoxalement le nombre de nodules n'est pas significativement différent en fonction de l'inoculation par les mycorhizes et/ou les rhizobia. Des nodules sont observés sur tous les individus inoculés ou non, ce qui laisse supposer la présence d'une ou plusieurs souches dans le sol et des souches de rhizobia spécifiques du site et d'*Anthyllis* ont pu être isolées et identifiées précédemment. Cela suggère que l'étape de l'inoculation par les rhizobia peut être évitée. Au niveau de la mycorhization des racines, il y a des différences significatives en fonction de la souche inoculée, mais pas en fonction de l'inoculation par les rhizobia. Les plus fréquences de présence de mycélium sont faibles et du mycélium est observé chez des individus non inoculés. Globalement, les fréquences sont plus fortes chez les individus inoculés (17-54%) et supérieures à celles observées pour *Noccaea*. Il semble donc qu'*Anthyllis* soit capable de mycorhizer plus facilement que *Noccaea*. Des corrélations significatives sont observées entre le nombre de nodules et la masse des parties aériennes et des racines indiquant un possible effet positif de la nodulation sur la production de biomasse de la plante.

#### a. Connaissances acquises

- L'inoculation n'a pas eu d'effets négatifs sur la croissance ou l'accumulation des 2 espèces. Dans certains cas, il y a un léger effet positif sur la croissance et l'accumulation, notamment dans le cas de l'inoculation, d'*Anthyllis vulneraria* avec l'espèce de rhizobium issue du site. Dans les autres cas, les effets de l'inoculation ne sont pas observés. Cependant, ils peuvent être visibles après un temps plus long et une culture dans un sol plus contaminé. C'est pourquoi des essais à plus grande échelle ont été menés *in situ* et sont suivis sur le long terme.
- Essai Avril, les *Noccaea* inoculés avec les souches R et H présentent de bonnes croissances et leur accumulation est d'environ 5000 ppm de Zn, ce qui est faible pour cette espèce. Cette valeur est cependant beaucoup plus élevée dans un sol contaminé.
- Essai Juin-Juillet, la croissance des *Noccaea* inoculés est plus réduite, mais leur accumulation est d'environ 15000 ppm de Zn, ce qui est un résultat très prometteur pour des expérimentations en sol contaminé.
- Essai Juin-Juillet, la croissance d'*Anthyllis* est fortement améliorée en double inoculation mycorhize/bactérie avec les souches R et AZ et la souche de rhizobium découverte par l'équipe. L'accumulation pour cette espèce est plus faible et est de l'ordre de 6500 ppm de Zn, ce qui est aussi prometteur en vue d'une installation dans le sol contaminé *in situ*.

En conclusion, en fonction de ces résultats, il a été décidé :

1/ de transplanter tous les individus inoculés des précédents tests pour étudier les effets de la transplantation, et les effets de l'inoculation sur la survie, la croissance et l'accumulation *in situ*.

2/ de lancer des essais de semis direct *in situ* avec les 2 espèces en sol contaminé.

Les résultats détaillés sont présentés au paragraphe VI (Phytoextraction sur le site des Avinières). Les objectifs sont les suivants :

- tester l'effet de l'inoculation sur *Noccaea* avec les souches AZ, H et R ;
- tester l'effet de l'inoculation sur *Anthyllis vulneraria* avec les mêmes souches de mycorhize et la souche rhizobium découverte par l'équipe ;

- étudier l'effet de la culture des 2 espèces en mélange, *Noccaea* pouvant bénéficier de la fertilisation azotée d'*Anthyllis*.
- étudier la phytoextraction sur des zones de moins forte contamination mais plus propice à la croissance des plantes, afin d'optimiser la production de biomasse avec des accumulations plus faibles mais suffisante.
- expérimenter de solutions permettant le contrôle de l'envol des poussières métalliques par des techniques type géotextile et topsoil.

## 2- Utilisation d'un géotextile



Cette étude a été réalisée à la demande de l'ADEME. Le géotextile est une protection contre l'envol des poussières métalliques, mais il s'est révélé inadapté au bon développement des espèces végétales. Le travail déjà très fastidieux nécessaire pour les transplantations a été augmenté de façon considérable par son installation. Son délitement et son épaisseur ont gêné la croissance des plantes, la plupart des individus transplantés en 2012 sur le géotextile étaient morts après 5 mois. Enfin il gêne le réensemencement naturel de la zone.



Le géotextile n'est donc pas recommandé pour les cultures. En revanche, il a été installé dans tous les espaces entre les zones de plantations.

## 3. Installation d'une ombrière occultante

L'installation d'une ombrière pour pépinière constitue la protection idéale des plantes en croissance vis-à-vis des grosses chaleurs de l'été. Elle se révèle plus efficace qu'un tunnel (en bas à droite).

La structure est métallique et la toile d'ombrage présente un taux d'occultation de 60%, soit une densité de 100g/m<sup>2</sup>.

Testée pendant 2 ans sur le terrain d'expérience du laboratoire, elle a été installée sur le bassin 2 du site des Avinières (zone allouée au CNRS).



L'installation de l'ombrière a nécessité une dizaine de jours de travail, mobilisé toute l'équipe et le terrain d'expérience du laboratoire. Elle recouvre toutes les cultures du bassin 2 soit une surface de **195 m<sup>2</sup>**. Elle permet d'assurer un ombrage permanent aux cultures, diminuant ainsi le stress hydrique et favorisant leur survie, croissance. D'autre part, la toile étant occultée à 60% on peut attendre une légère diminution de la force du vent et donc de l'envol de poussières sur de grandes distances.

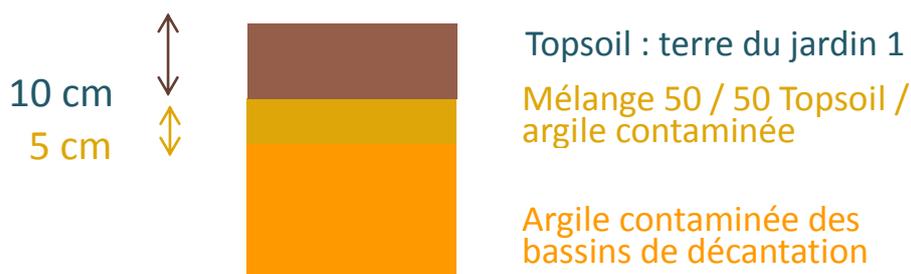


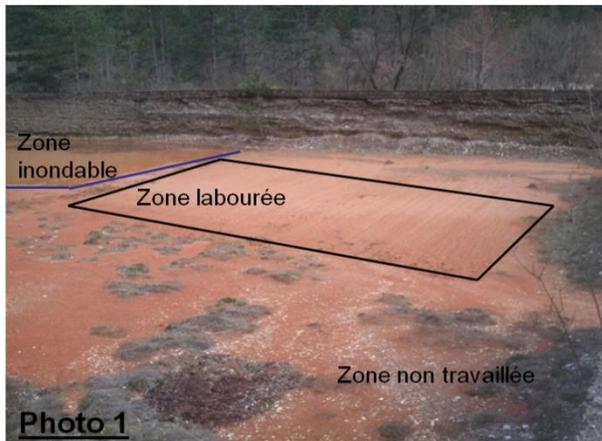
Ombrière installée aux Avinières

tunnel

#### 4. Installation du topsoil

Cette technique consiste à créer un nouvel horizon plus favorable ou « topsoil » sur le sol argileux très contaminé. Une première couche de 5 cm de sol issu du jardin 1, moins pollué, a été épandue puis mélangée avec le sol existant pour créer une zone de transition. Une deuxième couche de 10 cm de sol non contaminée a ensuite été épandue par-dessus et a servi de milieu de culture. Cette solution est idéale, car elle permet de couvrir le sol contaminé et donc d'éviter l'envol de poussières métalliques tout en favorisant la survie et la croissance des plantes. De plus, les racines des plantes ont été suffisamment longues pour coloniser l'horizon de transition et le sol contaminé, garantissant ainsi une accumulation maximale. Plusieurs jours de travail ont été nécessaires pour déplacer **9m<sup>3</sup>** de terre, l'épandre et la mélanger. Une zone de test de **60m<sup>2</sup>** a été installée dans un premier temps.





**Photo 1**

La zone a été préalablement labourée (Photo 1) afin de faciliter le travail du sol



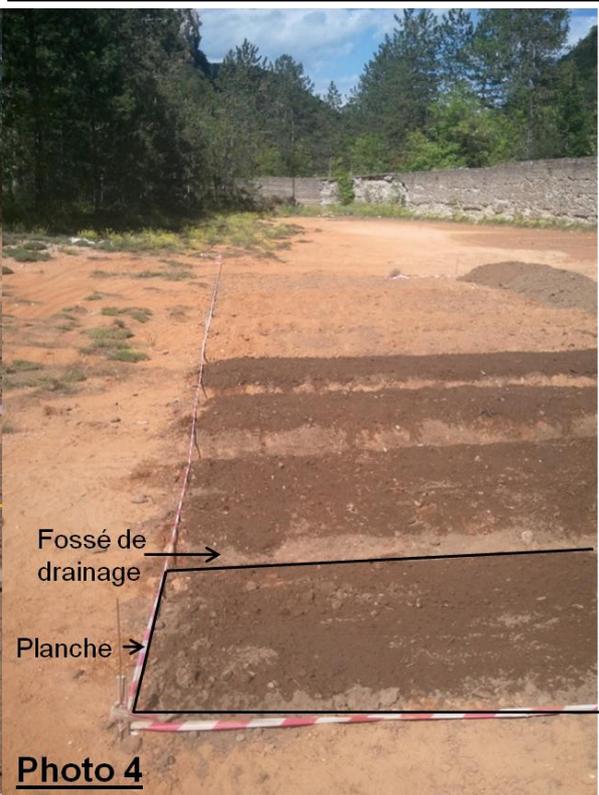
**Photo 2**

Une première couche de 5 cm de sol provenant du jardin, une zone moins contaminée du site limitant ainsi le transport de sol sur de grandes distances) a été épanchée (Photos 2 et 3). Cela représente  $3\text{m}^3$  de terre à raison de 50 L par  $\text{m}^2$ .



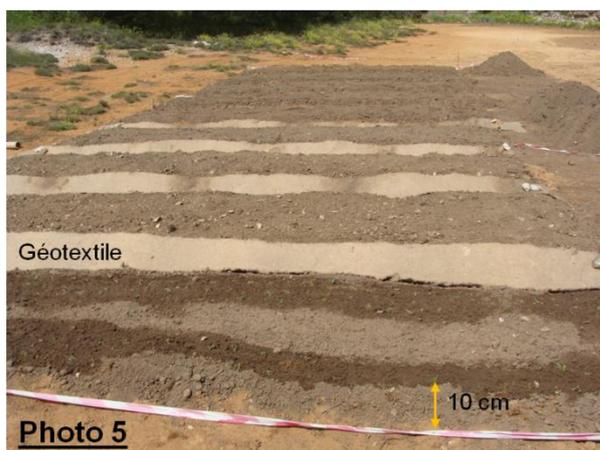
**Photo 3**

Cette première couche a été mélangée avec le sol contaminé grâce à un motoculteur et sert de couche de transition entre le sol non contaminé et l'argile contaminée pour faciliter la pénétration des racines. (Photo 3).



**Photo 4**

Après le mélange de la première couche des « planches » (buttes) de semis ont été constituées ainsi que des fossés de drainage pour permettre l'évacuation de l'eau lors d'événements pluvieux (Photo 4).



**Photo 5**



**Photo 6**

Une deuxième couche supérieure de 10 cm d'épaisseur a ensuite été déposée. Cela représente  $6\text{m}^3$  de terre à raison de 100 L par  $\text{m}^2$ . Au total la réalisation du « topsoil » sur une surface de  $60\text{m}^2$  aura nécessité l'excavation, le transport et l'épandage de  $9\text{m}^3$  de sol (Photo 5).

Sur l'ensemble de la surface 9 planches de semis avec leurs fossés de drainage ont été constituées. Des graines de l'espèce d'intérêt (*Noccaea caerulescens*) ont été semées sur chaque butte et leur croissance et accumulation en métaux sont suivis régulièrement (Photo 6).

Après quelques mois de culture, la mortalité est de **0%**. Tous les individus transplantés ont survécu et présentent une très bonne croissance (Tableau D.6). Les racines mesurent en moyenne plus de 10 cm 2 mois après la transplantation. Elles ont donc colonisé les horizons inférieurs plus contaminés. En effet, la concentration en Zn dans les feuilles des individus transplantés dans le topsoil est supérieure à 1% en moyenne. La concentration dans l'horizon de surface est diminuée d'environ 18%. Les individus transplantés dans le « topsoil » du bassin 3 ont eu une croissance identique à celle d'individus semés dans le sol d'origine du « topsoil » dans les planches de semis de la zone jardin mais avec des concentrations en Zn dans les feuilles supérieures (Tableau D.6). Le « topsoil » a donc bien rempli son rôle en permettant une croissance des plantes identique à celle de la zone contaminée tout en permettant une maximisation de la concentration en Zn dans les feuilles. Au vu de l'avancée des études, le « topsoil » se présente comme la solution idéale et pourrait être envisagé sur l'ensemble du site. D'autre part, l'installation de géotextile entre les zones de plantation permet de limiter

l'érosion éolienne et hydrique et renforce la stabilité tout en diminuant encore plus les risques de dispersion de la contamination.

Tableau D.6 : Résultats du test « topsoil »

Zone	pH	Concentration Zn sol µg/g	Concentration Zn feuilles µg/g	Biomasse sèche feuilles mg/plant	Longueur racines cm/plant
Bassin 3 hors topsoil	7.23 ± 0.19	138038 ± 20344	Pas de plants	Pas de plants	Pas de plants
Topsoil	7.56 ± 0.02	112622 ± 9986	11058 ± 3950	616 ± 393	11.2 ± 2.4
Jardin	7.56 ± 0.02	112622 ± 9986	5851 ± 1182	666 ± 160	10.75 ± 0.49

### Conclusions :

L'application superficielle d'un sol issu du jardin 1 (ou topsoil) est une solution idéale :

- Le topsoil constitue un **couvert protecteur naturel** de l'argile contaminée
- Plus fertile, il permet un **semis** et une **germination directs** sans travail du sol et assure une très **bonne dynamique de la végétation**

Il s'agit d'un très bon équilibre entre maîtrise des risques environnementaux (érosion éolienne) et développement optimal des cultures en phytoextraction.

**Tous les bassins pourraient bénéficier de cette expérience très positive.**

## VI- Phytoextraction sur le site des Avinières



Une excellente maîtrise des cultures de *Noccaea caerulescens* et *Anthyllis vulneraria* sur sites, à grande échelle et à tous les degrés de contamination



► Une maîtrise résultant de travaux de recherche conséquents

Les expériences *in situ* peuvent être réparties en 3 types :

- les transplantations d'individus des 2 espèces inoculées ou non (bassin 2),
- les transplantations des 2 espèces en mélange (bassin 2 et jardin),
- les essais de semis *in situ* (bassin 2 et jardin).

Les objectifs étaient :

- a- d'améliorer la connaissance des espèces hyperaccumulatrices et leur comportement *in situ*,
- b- d'identifier les meilleures stratégies de culture,
- c- de produire de la biomasse à haute valeur ajoutée.

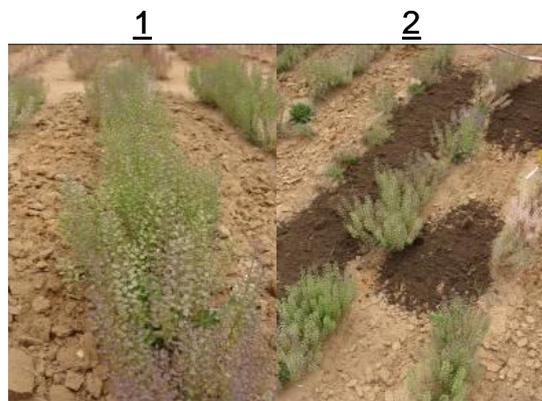
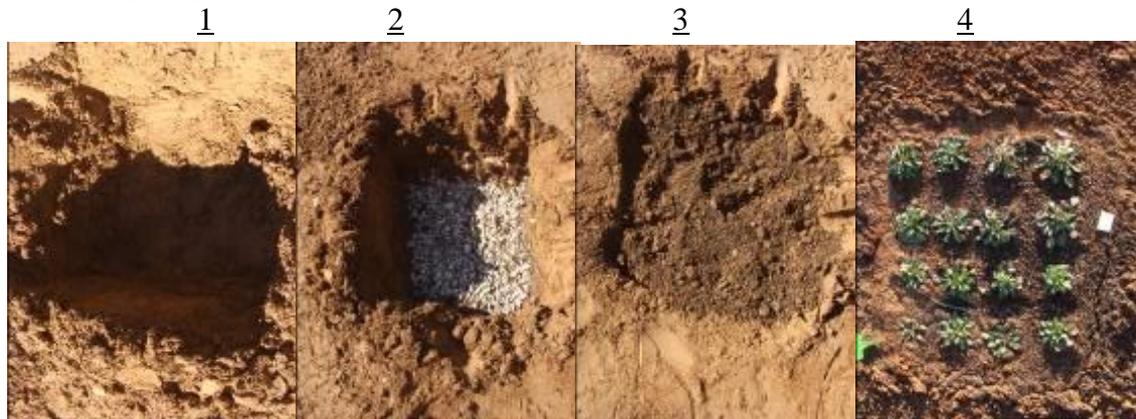
### 1. Transplantations d'individus inoculés

Des individus des 2 espèces (*N. caerulescens* et *A. vulneraria*) ont été transplantés dans le bassin 2, tous les individus ont été mis en culture dans un mélange sol contaminé-tourbe 30-70 avant transplantation, *Noccaea* a été inoculé ou non avec les souches mycorhiziennes R, AZ, RT et H, tandis que les *Anthyllis* a été inoculé avec les souches mycorhiziennes R, AZ et RT avec ou sans inoculation par la souche de rhizobium.

Tous les individus ont été transplantés en lignes ou en carrés. Des tranchées de 10cm de large et de 15cm de profondeur ont été creusées. Le sol provenant des tranchées a été mélangé avec du biofumur (compost de matière organique d'origine végétale) en proportion 50-50. Le fond des tranchées a été rempli avec ce mélange. Les plantes ont été dépotées puis placées dans les tranchées. Les mottes ont été entourées de mélange puis les tranchées ont été complétées avec le reste du sol excavé, le mode opératoire est le même pour les lignes et les carrés. En 2012, **468 *Noccaea*** et **253 *Anthyllis*** ont été

transplantés. En 2013, l'espace entre toutes les lignes de transplantation a été recouvert avec du sol non contaminé pour faciliter les travaux.

La mortalité, le diamètre, la phénologie, les contenus en C et N et l'accumulation en zinc ont été suivis tous les 2 mois. Après 8 mois, des échantillons de sol ont été prélevés dans chaque ligne.



En moyenne la mortalité ne dépasse pas 30%, excepté pour les carrés de *Noccaea* inoculés avec la souche R ou RT. La mortalité est similaire pour les deux espèces. **La transplantation *in situ* d'individus est donc possible malgré des concentrations en Zn dans le sol très élevées.** Le pH du sol est neutre. Les premières mesures de concentration en Zn dans les feuilles montrent une meilleure efficacité de *Noccaea* avec des valeurs supérieures à 1% par rapport à *Anthyllis*.

Tableau D.7 : Résultats des essais de transplantations d'individus inoculés

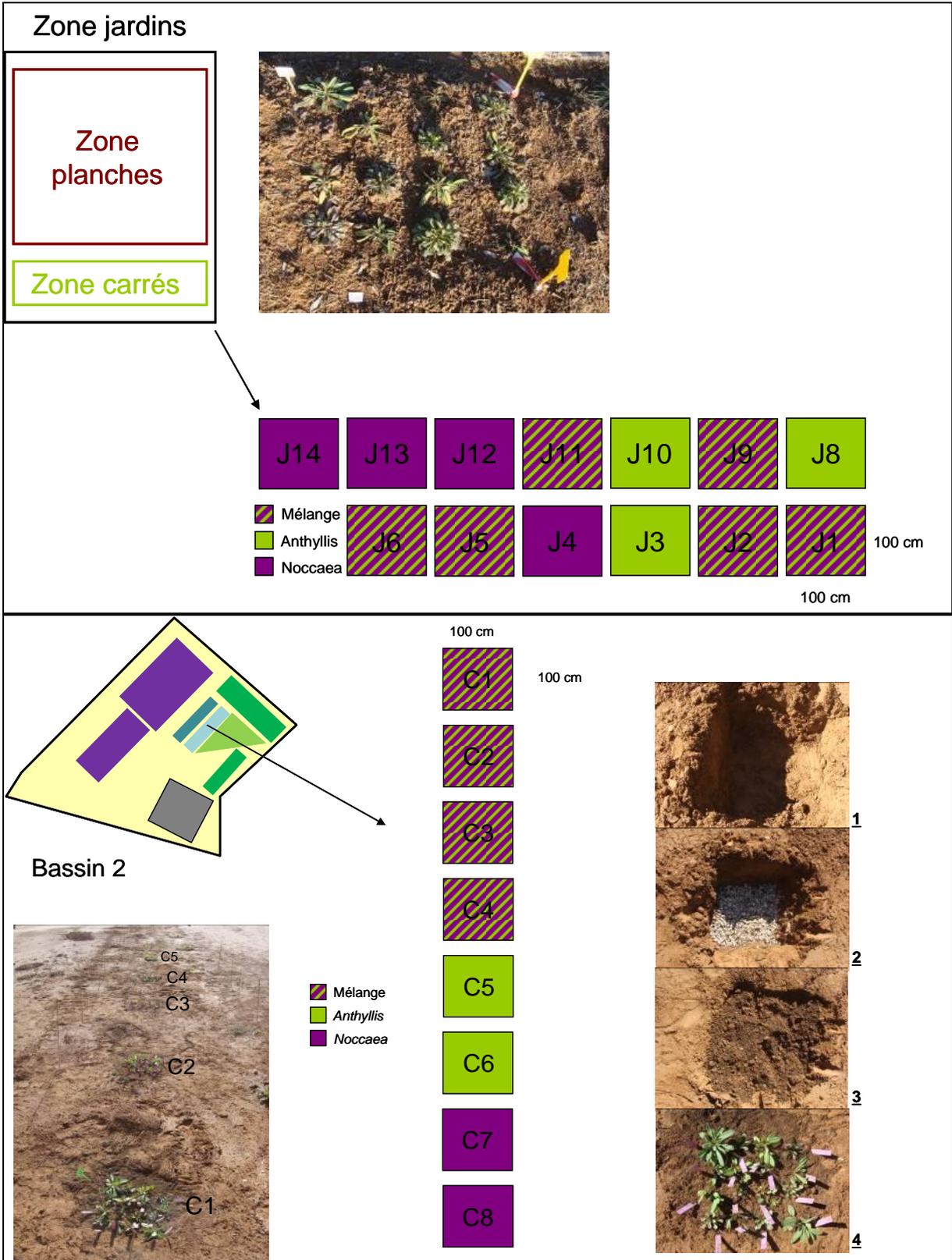
Zone	pH	Concentration Zn sol $\mu\text{g/g}$	Concentration Zn feuilles $\mu\text{g/g}$	Mortalité %
Bassin 2 hors essais	7.41 $\pm$ 0.05	150300 $\pm$ 884	Non mesurée	Non mesurée
Carrés Noccaea	Début essai 7.26 $\pm$ 0.05 Fin essai 7.69 $\pm$ 0.21	En cours d'analyse	Témoin 11160 $\pm$ 889 Souche AZ 10569 $\pm$ 939 Souche R 10970 $\pm$ 455 Souche RT 11157 $\pm$ 549	Témoin 21.9 $\pm$ 4.4 Souche AZ 6.25 $\pm$ 8.84 Souche R 40.6 $\pm$ 48.6 Souche RT 46.9 $\pm$ 30.9
Lignes Noccaea	Fin essai 8.12 $\pm$ 0.12	En cours d'analyse	En cours d'analyse	26.4 $\pm$ 28.4
Lignes Anthyllis	Fin essai 7.91 $\pm$ 0.01	En cours d'analyse	7720 $\pm$ 582	32.7 $\pm$ 23.6

## 2. Transplantations en mélange

Au total 8 carrés ont été créés, 4 de 16 plants avec en mélange les 2 espèces (8 Noccaea et 8 Anthyllis) et 2 de 8 plants de chaque espèce, au final **96 plants** ont été transplantés dans le bassin 2. En parallèle, 13 carrés ont été installés, 6 de 16 plants avec en mélange les 2 espèces (8 Noccaea et 8 Anthyllis), 4 de 8 plants de Noccaea et 3 de 8 plants d'anthyllis, au total **208 plants** ont été transplantés dans les jardins.

Les carrés pour le bassin 2, de 40\*40cm et de 15cm de profondeur ont été creusés début Octobre 2012. Une couche de gravier a été déposée au fond. Le sol provenant des carrés a été mélangé avec du biofumur (compost de matière organique d'origine végétale) en proportion 50-50. Le fond des carrés a été rempli avec ce mélange. Les plantes ont été dépotées puis placées dans les carrés. Les mottes ont été entourées de mélange, puis les carrés complétés avec le reste du sol excavé. Les plants utilisés n'ont pas été inoculés et ont poussé dans un mélange sol contaminé-tourbe 30-70 avant transplantation *in situ* dans le mélange 50-50.

Le mode opératoire est le même dans la zone jardin à l'exception de la taille des carrés, 100\*100cm et 15cm de profondeur et l'absence d'apport de matière organique avant transplantation.



La mortalité, le diamètre, la phénologie et les contenus en C et N et l'accumulation en zinc ont été suivis tous les 2 mois. Des échantillons de sol ont été prélevés au début et 8

mois après. Le pH, les contenus en C et N et les concentrations en métaux ont été mesurés.

Le pH du sol du bassin 2 et du jardin est neutre ; il n'a pas évolué entre les plantations et les derniers suivis. La concentration en Zn dans le sol est très élevée dans les 2 zones et supérieure à 15%. La mortalité est beaucoup plus faible dans la zone jardin que dans le bassin 2, mais les conditions de plantation ne sont identiques. Les individus transplantés dans le bassin 2 ont pu souffrir d'un pourrissement des racines dû à la nature argileuse du sol. Il faut noter la très bonne survie des transplants dans le jardin malgré une concentration en Zn dans le sol supérieure à 160000 ppm et une plantation directement dans le sol sans préparation. Le type de culture (mélange ou non mélange) n'a pas d'effet clair sur la mortalité.

Contrairement aux précédents essais, les concentrations en Zn dans les feuilles sont du même ordre de grandeur pour *Noccaea* et *Anthyllis* mais supérieures dans la zone jardin avec des valeurs de l'ordre de 15000 ppm. Ici aussi les conditions de plantation peuvent expliquer la différence. Dans le jardin, les individus ont été transplantés directement dans le sol sans apport de matière organique, tandis que dans le bassin les mottes ont été entourées de matière organique. Il est possible que les racines n'aient pas colonisées l'extérieur. **Cela prouve donc que des transplantations réalisées directement *in situ* et sans apport de matière organique sont possible.**

Tableau D.8 : Résultats des essais de transplantations d'individus non inoculés en mélange

Zone	pH	Concentration Zn sol µg/g	Concentration Zn feuilles µg/g	Mortalité %
Bassin 2 hors essais	7.41 ± 0.05	150300 ± 884	Non mesurée	Non mesurée
Jardin hors essais	7.64 ± 0.02	162701 ± 8022	Non mesurée	Non mesurée
Carrés Bassin 2	Début essai 7.55 ± 0.08 Fin essai 7.54 ± 0.08	En cours d'analyse	Anthyllis Mélange Pas de plants Non mélange 9432 ± 2556 Noccaea Mélange 9642 ± 1031 Non mélange 8144 ± 1204	Anthyllis Mélange 100 Non mélange 68.75 ± 26.52 Noccaea Mélange 100 Non mélange 100
Carrés Jardin	Début essai 7.64 ± 0.02 Fin essai 7.14 ± 0.05	En cours d'analyse	Anthyllis Mélange 17299 ± 2196 Non mélange 14166 ± 3644 Noccaea Mélange 16140 ± 1202 Non mélange 15853 ± 1179	Anthyllis Mélange 0 Non mélange 6.25 ± 4.42 Noccaea Mélange 27.1 ± 10.8 Non mélange 9.4 ± 13.2

### 3. Essais de semis *in situ*

Deux tests ont été effectués, à l'automne (essai Novembre) et au printemps (essai Mars). L'objectif de ces tests était de démontrer que des cultures à partir d'un semis direct *in situ* étaient possibles. La technique permet de s'affranchir des étapes de culture en pots et de transplantations. Elles ont aussi été conduites dans le cadre d'une industrialisation de la culture des 2 espèces pour la production de biomasse riche en ETM.

Des essais de semis direct des 2 espèces ont ainsi été mis en place à l'automne et au printemps. A l'automne, des placettes de 1m<sup>2</sup> ont été définies. Dans chacune, le sol a été labouré en surface (10cm) puis mélangé avec de la tourbe ou du biofumur à raison de 10l/m<sup>2</sup>. Les graines pré-inoculées ont été semées, le sol tassé puis irrigué. 18 placettes ont été faites pour *Noccaea* et 30 pour *Anthyllis*, ce qui représente une surface de **48m<sup>2</sup>**. Les modalités suivantes ont été testées pour *Noccaea* : témoins non inoculés, inoculés avec la souche AZ ou inoculés avec la souche H. Pour *Anthyllis*, les modalités étaient témoins non inoculés, double inoculation avec la souche AZ et les rhizobia, double inoculation avec la souche R et les rhizobia et double inoculation avec la souche R et les rhizobia. Les souches ont été choisies en fonction des résultats d'essais en pots. Pour chaque modalité, il y avait 4 placettes dont 2 amendées avec du biofumur et 2 amendées avec de la tourbe. La germination a été suivie pendant 3 mois après la levée des premières graines, puis les individus les plus grands ont été récoltés. Les biomasses et le diamètre ont été mesurés puis les métaux. Les contenus en C et N ont été dosés dans les feuilles et les racines. Des échantillons de sols ont aussi été prélevés au moment de la première récolte d'individus et à la fin de l'essai. Sur ces échantillons ont été analysés le pH, les contenus en C, N et ETM.

#### RIVIERE

Ant H Rh B	Ant AZ Rh B	Ant témoin B	Ant H Rh B	Thl AZ B	Ant R Rh B	Thl H T	Bassin 2					
Ant témoin T	Thl témoin T	Thl H B	Thl H T	Thl AZ T	Ant R Rh B	Ant R Rh B	Ant AZ Rh B					
Ant Rh B	Thl AZ T	Ant H Rh T	Ant Rh T	Thl AZ B	Ant AZ Rh B	Thl AZ B	Thl témoin B	Ant R Rh T				
Ant AZ Rh T	Ant témoin T	Ant Rh B	Thl témoin T	Thl témoin B	Thl témoin B	Thl H B	Ant témoin T	Ant H Rh T	Ant Rh T	Ant H Rh T		
Ant AZ Rh T	Thl H B	Ant R Rh T	Ant Rh B	Ant AZ Rh T	Ant témoin B	Ant R Rh T	Ant Rh T	Thl témoin B	Thl H T	Ant témoin T	Ant R Rh B	Thl AZ T

Ant : *Anthyllis vulneraria*, Thl : *Noccaea caerulescens*, B : biofumur et T : tourbe. AZ, H et R : inoculation des graines avec les souches mycorhiziennes AZ, H et R. Rh : inoculation avec la souche de rhizobium. Témoin : pas d'inoculation.



A l'automne, un autre essai de semis a été mis en place. L'objectif était le même que pour l'essai de l'automne, mais d'autres modalités ont été testées. Les deux périodes différentes de semis ont permis de décider du meilleur moment de semis.

L'essai est constitué de 3 « planches de semis », buttes de terre séparées par des fossés de drainage qui couvrent une surface de **55m<sup>2</sup>**. Chaque planche mesure 1.5m\*10m et comporte 5 lignes de semis. Une planche a été semée avec *Noccaea*, une autre avec *Anthyllis* et la dernière avec un mélange des 2 espèces. Sur chaque planche, ont été testés les effets de l'ombrage et de l'inoculation avec la souche R pour *Noccaea* (1 ou 2ml/m de planche), avec la souche R (1 ou 2ml/m de planche) et les rhizobia (0.1 ou 0.2ml/m de planche) pour *Anthyllis*. Toutes les planches ont été labourées au motoculteur, puis ont reçu un apport de tourbe à raison de 0.75l/m<sup>2</sup> et de biofumur à raison de 1l/m<sup>2</sup>. Les graines ont été semées au poquet tous les 20 cm grâce à un semoir, un tunnel a été mise en place sur une partie des planches, puis des fossés de drainage ont été creusés. Pendant les 3 premiers mois la germination a été suivie, puis des individus ont été prélevés pour évaluer leur biomasse. Des échantillons de sol ont été prélevés pour analyse du pH, des contenus en C et N et des concentrations en ETM au début et à la fin du test. Les concentrations en Zn ont aussi été mesurées dans les biomasses.

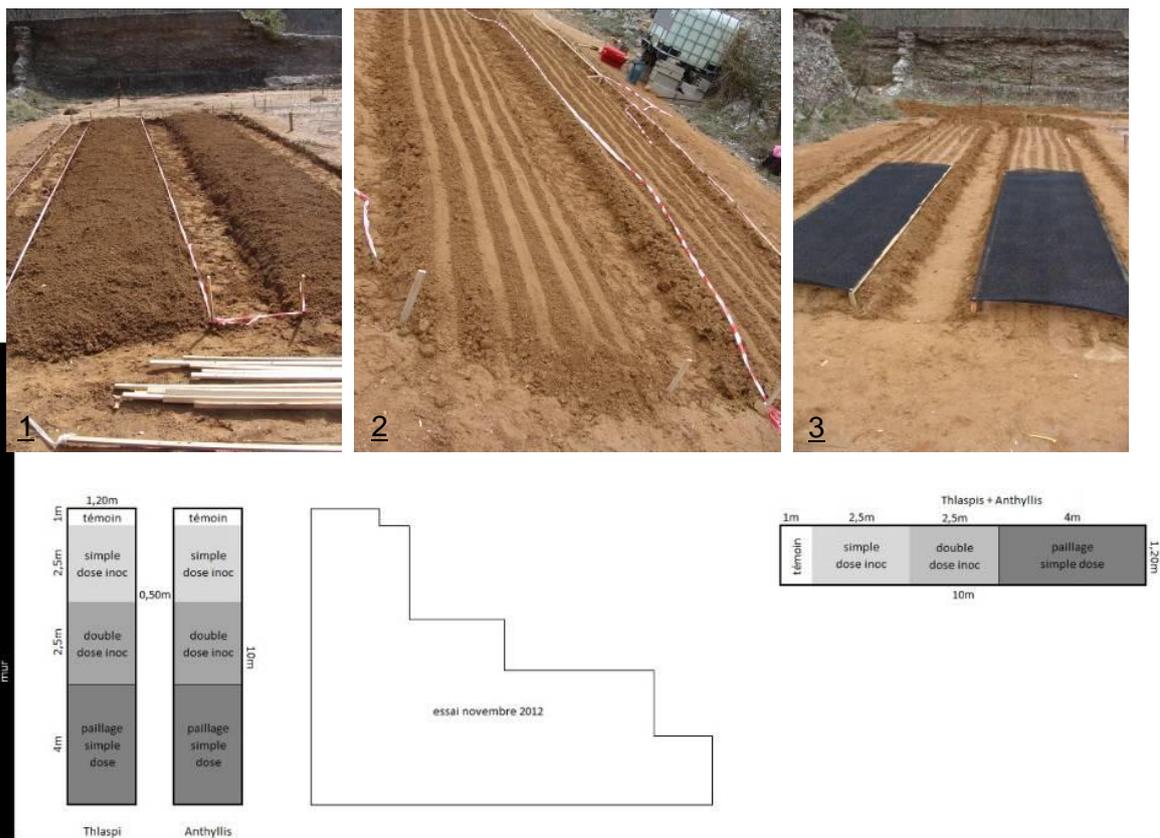


Tableau D.9 : Résultats Essai Semis Novembre

Zone	pH	Concentration Zn sol $\mu\text{g/g}$	Concentration Zn feuilles $\mu\text{g/g}$	Germination Nombre d'individus / $\text{m}^2$	Biomasse sèche feuilles mg/plant	Longueur racines cm/plant
Bassin 2 hors essais	$7.41 \pm 0.05$	$150300 \pm 884$	Non mesurée	Non mesurée	Non mesurée	Non mesurée
Essai semis	$7.49 \pm 0.14$	$144675 \pm 1522$	Anthyllis	Anthyllis	Anthyllis	Anthyllis
			$18329 \pm 1576$	$9.14 \pm 2.41$	$97.6 \pm 10.5$	$7.4 \pm 0.6$
			Noccaea	Noccaea	Noccaea	Noccaea
			$12957 \pm 1984$	$28.6 \pm 14.3$	$627 \pm 100$	$10.6 \pm 0.8$

Le pH et la concentration en Zn de la zone choisie pour les semis Novembre et du bassin 2 sont identiques, le pH est neutre et la concentration en Zn dans le sol supérieure à 140000 ppm. La germination de Noccaea est très bonne, Anthyllis est également capable de germer, mais son taux de germination est inférieur. La biomasse de Noccaea est du même ordre que celle des individus du « topsoil » ou du jardin, ce qui est très encourageant. La biomasse d'Anthyllis est plus faible, mais sa croissance est plus lente. Les concentrations en Zn dans les feuilles sont élevées et supérieures à 1% pour les 2 espèces. Anthyllis montre des concentrations supérieures à 1.8% et à celles de Noccaea. **Ce test a confirmé qu'un semis *in situ* était possible pour Noccaea après apport de matière organique. Pour Anthyllis, le semis direct est possible, mais les résultats sont moins prometteurs et la transplantation est une solution plus efficace.**

Tableau D.10 : Résultats Essai Semis Mars

Zone	pH	Concentration Zn sol $\mu\text{g/g}$	Concentration Zn feuilles $\mu\text{g/g}$	Germination Nombre d'individus / $\text{m}^2$	Biomasse sèche feuilles mg/plant	Longueur racines cm/plant
Bassin 2 hors essais	7.41 $\pm$ 0.05	150300 $\pm$ 884	Non mesurée	Non mesurée	Non mesurée	Non mesurée
Planche Anthyllis	7.16 $\pm$ 0.01	En cours d'analyse	Plants trop petits	4.6 $\pm$ 3.3	Plants trop petits	Plants trop petits
Planche Noccaea	7.08 $\pm$ 0.09	148619	18604 $\pm$ 927	25 $\pm$ 15	125 $\pm$ 54	7.65 $\pm$ 2.47
Planche mélange	7.13 $\pm$ 0.22	157021 $\pm$ 8206	Noccaea 27695 $\pm$ 4817 Anthyllis Trop petits	Noccaea 18.6 $\pm$ 10.2 Anthyllis 5.5 $\pm$ 2.8	Noccaea 101 $\pm$ 24 Anthyllis Trop petits	Noccaea 6.7 $\pm$ 0.1 Anthyllis Trop petits

Le pH et la concentration en Zn de la zone choisie pour les semis Mars et du bassin 2 sont identiques, le pH est neutre et la concentration en Zn dans le sol supérieure à 145000 ppm. Les résultats pour la germination des 2 espèces confirment ceux obtenus pour l'essai semis Novembre. Cependant la biomasse de Noccaea est inférieure et les individus d'Anthyllis sont vraiment peu développés. Les concentrations en Zn dans les feuilles de Noccaea sont très élevées et de l'ordre de 27000 ppm. Les résultats sont moins encourageants que pour l'essai Novembre et **cela confirme que les graines ont besoin d'une vernalisation *in situ* pour bien germer.**

RIVIERE

Bassin 2

Ant H Rh B	Ant AZ Rh B	Ant témoin B	Ant H Rh B	Thl AZ B	Ant R Rh B	Thl H T							
Ant témoin T	Thl témoin T	Thl H B	Thl H T	Thl AZ T	Ant R Rh B	Ant R Rh B	Ant AZ Rh B						
Ant Rh B	Thl AZ T	Ant H Rh T	Ant Rh T	Thl AZ B	Ant AZ Rh B	Thl AZ B	Thl témoin B	Ant R Rh T					
Ant AZ Rh T	Ant témoin T	Ant Rh B	Thl témoin T	Thl témoin B	Thl témoin B	Thl H B	Ant témoin T	Ant H Rh T	Ant Rh T	Ant H Rh T			
Ant AZ Rh T	Thl H B	Ant R Rh T	Ant Rh B	Ant AZ Rh T	Ant témoin B	Ant R Rh T	Ant Rh T	Thl témoin B	Thl H T	Ant témoin T	Ant R Rh B	Thl AZ T	

Ant : *Anthyllis vulneraria*, Thl : *Noccaea caerulescens*, B : biofumur et T : tourbe. AZ, H et R : inoculation des graines avec les souches mycorhiziennes AZ, H et R. Rh : inoculation avec la souche de rhizobium. Témoin : pas d'inoculation.



A l'automne, un autre essai de semis a été mis en place. L'objectif était le même que pour l'essai de l'automne, mais d'autres modalités ont été testées. Les deux périodes

différentes de semis ont permis de décider du meilleur moment de semis. Il est constitué de 3 « planches de semis », buttes de terre séparées par des fossés de drainage qui couvrent une surface de **55m<sup>2</sup>**. Chaque planche mesure 1.5m\*10m et comporte 5 lignes de semis. Une planche a été semée avec *Noccaea*, une autre avec *Anthyllis* et la dernière avec un mélange des 2 espèces.

Sur chaque planche ont été testés les effets de l'ombrage et de l'inoculation avec la souche R pour *Noccaea* (1 ou 2ml/m de planche) et avec la souche R (1 ou 2ml/m de planche) et les rhizobia (0.1 ou 0.2ml/m de planche) pour *Anthyllis*.

Toutes les planches ont été labourées au motoculteur puis ont reçu un apport de tourbe à raison de 0.75l/m<sup>2</sup> et de biofumur à raison de 1l/m<sup>2</sup>. Les graines ont été semées au poquet tous les 20 cm grâce à un semoir. Un tunnel a été mise en place sur une partie des planches, puis des fossés de drainage ont été creusés. Pendant les 3 premiers mois la germination a été suivie, puis des individus ont été prélevés pour évaluer leur biomasse. Des échantillons de sol ont été prélevés pour analyse du pH, des contenus en C et N et des concentrations en ETM au début et à la fin du test. Les concentrations en ETM ont aussi été mesurées dans les biomasses.

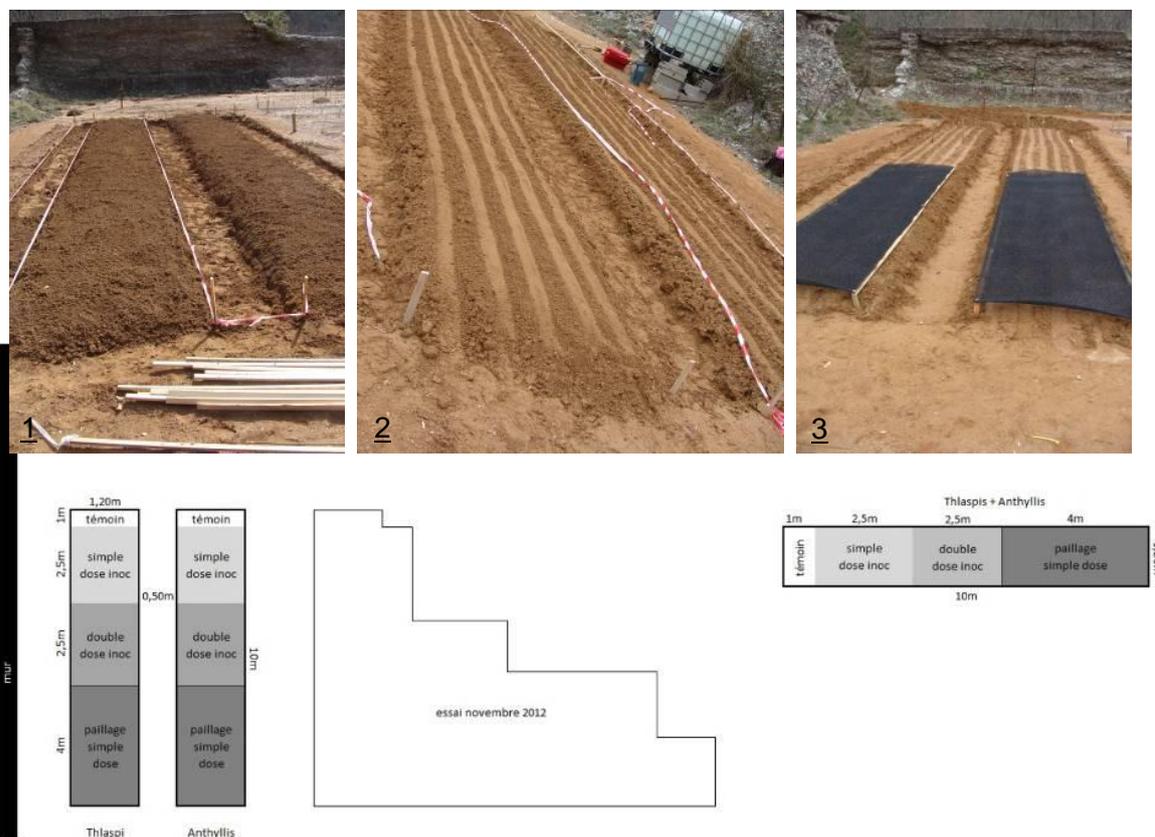


Tableau D.9 : Résultats Essai Semis Novembre

Zone	pH	Concentration Zn sol µg/g	Concentration Zn feuilles µg/g	Biomasse sèche feuilles mg/plant	Longueur racines cm/plant
Bassin 2 hors essais	7.41 ± 0.05	150300 ± 884	Non mesurée	Non mesurée	Non mesurée
Essai semis	7.49 ±	144675 ± 1522	Anthyllis	Anthyllis	Anthyllis

	014		18329 ± 1576 Noccaea 12957 ± 1984	97.6 ± 10.5 Noccaea 627 ± 100	7.4 ± 0.6 Noccaea 10.6 ± 0.8
--	-----	--	-----------------------------------------	-------------------------------------	------------------------------------

Tableau D.10 : Résultats Essai Semis Mars

Zone	pH	Concentration Zn sol µg/g	Concentration Zn feuilles µg/g	Biomasse sèche feuilles mg/plant	Longueur racines cm/plant
Bassin 2 hors essais	7.41 ± 0.05	150300 ± 884	Non mesurée	Non mesurée	Non mesurée
Planche Anthyllis	7.16 ± 0.01	En cours d'analyse	Plants trop petits	Plants trop petits	Plants trop petits
Planche Noccaea	7.08 ± 0.09	148619	18604 ± 927	125 ± 54	7.65 ± 2.47
Planche mélange	7.13 ± 0.22	157021 ± 8206	Noccaea 27695 ± 4817 Anthyllis Trop petits	Noccaea 101 ± 24 Anthyllis Trop petits	Noccaea 6.7 ± 0.1 Anthyllis Trop petits

#### 4. Bilan des connaissances acquises

**A- Transplantations :** la mortalité inférieure à 30% est très encourageante. Tous les individus ont effectué un cycle de vie complet jusqu'à la production de graines. Le réensemencement naturel du site est ainsi assuré.

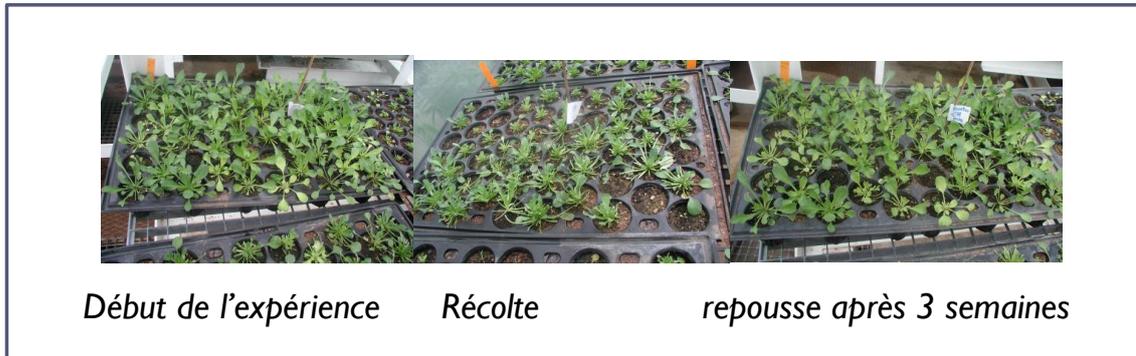
Le réensemencement naturel est très important, car l'augmentation de la surface colonisée par les plantes qui en découle permet de diminuer les phénomènes d'érosion et de dispersion de la contamination, les interventions humaines nécessaires et les coûts engendrés.

**B- Semis in situ :** la germination est très bonne pour Noccaea dans les 2 zones (bassin 2 et jardin) et pour Anthyllis dans la zone jardin. Le développement des individus est aussi satisfaisant ; il démontre qu'un semis direct *in situ* est possible. La germination et la croissance sont meilleures dans la zone jardin. Ce type de terre est donc très intéressant pour créer un « topsoil » sur l'ensemble des bassins et faire de la phytoextraction efficace.

#### 5. Techniques de récolte non destructrices

Un des gros atouts du programme est d'avoir démontré que les feuilles issues des espèces hyperaccumulatrices d'ETM n'étaient pas de nouveaux déchets contaminés, mais des réservoirs de métaux de transition devenus précieux pour l'industrie chimique. Nous nous sommes attachés à démontrer qu'il était possible de récolter ces feuilles sans mettre en péril la croissance des plants. Le procédé est simple. La récolte de la biomasse végétale nécessaire aux actions de valorisation repose sur un faucardage superficiel. Les plants ne sont pas endommagés et repoussent rapidement (3 à 4 semaines).

Des essais de mécanisation de faucardage et de récoltes de semences sont en cours d'étude.



## VIII - Suivi environnemental des éléments traces métalliques sur le site minier des Avinières



*Résumé* : L'objectif de cette étude est d'examiner le contenu en éléments traces métalliques (ETM) d'un certain nombre de bioindicateurs potentiels rencontrés sur un ancien site minier où le zinc et le plomb étaient exploités. Il s'agit du site des Avinières. Des produits apicoles (miel, gelée-royale et cire d'abeilles) ainsi que des lichens et mousses ont été collectés et analysés. Bien que les concentrations en ETM dans les déchets miniers soient élevées, les produits apicoles ne présentent pas de contamination par les ETM.

Les lichens et mousses montrent quant à eux des teneurs en ETM élevées, qui résultent de dépôts de poussières atmosphériques. L'analyse des isotopes du plomb a montré que les déchets miniers sont à l'origine des ETM trouvés dans les lichens et les mousses.

### 1. Introduction

#### 1.1. Utilisation des produits apicoles

Les abeilles sont des insectes sociaux domestiques qui peuvent facilement être capturés pour des études : les ouvrières échantillonnent activement leur environnement, sur une surface d'environ 7km<sup>2</sup> autour de la ruche. Ainsi, les abeilles peuvent être exposées aux contaminations en provenance du sol, de l'air et de l'eau (Conti and Botre 2001). De fait elles sont souvent été considérées comme des bioindicateurs potentiels de contamination par les ETM, les radionucléides (Tonelli et al. 1990) et les pesticides (Lambert et al. 2012). Les teneurs en ETM du miel peuvent être utilisées pour certifier sa provenance (Hernandez et al. 2005, Terrab et al. 2005) ou pour évaluer ses qualités alimentaires (Devilleers et al. 2002, Pisani et al. 2008).

Les suivis environnementaux des ETM par les produits apicoles ont aussi été largement étudiés (Bogdanov et al. 2007, Tuzen et al. 2007, Pohl et al. 2009) avec des conclusions contradictoires. Tuzen et al. (2007) considèrent qu'il est possible d'utiliser le miel pour un suivi des ETM, tandis que selon Bogdanov et al. (2007), de faibles concentrations associées à de grandes variations naturelles font qu'il est difficile de suivre les ETM grâce au miel. Une meilleure compréhension pourrait résulter de l'étude des abeilles, pollens, propolis et de la cire d'après Conti et Botre (2001). De nouvelles données devraient pouvoir clarifier ces différents résultats, et l'étude d'un contexte minier pourrait apporter davantage d'information sur les voies de contamination par les ETM.

### **1.2. Utilisation des lichens et des mousses**

L'utilisation de lichens ou des mousses pour le suivi des pollutions atmosphériques a été largement étudiée (Markert et al. 1996, Harmens et al. 2004, Colin et al. 2005), et ceux-ci se sont avérés efficaces pour évaluer les contaminations par les ETM dans des contextes d'activités minières passées (Sondergaard et al. 2010). Certains chercheurs utilisent les lichens ou les mousses pour le suivi de changements de composition rapides en réponse à des contaminations atmosphériques (Spiro et al. 2004). D'autres considèrent que l'accumulation est un phénomène continu, et que l'on peut donc accéder à des valeurs moyennes au cours du temps (Colin et al. 2005). Les lichens en particuliers sont très résistants au stress métallique (Chettri et al. 1998, Sarret et al. 1998) et les espèces locales peuvent être directement analysées afin de calculer des retombées atmosphériques moyennes au cours du temps. Cette approche a déjà été utilisée à différentes échelles (Doucet and Carignan 2001) et particulièrement dans un contexte d'activités minières passées dans le sud de la France (Baron 2005). L'approche de Baron (2005) a été transposée ici dans le cas du secteur minier des Malines.

### **1.3. Détermination des sources de contamination**

La comparaison des résultats obtenus par analyse des lichens ou des mousses et des produits apicoles devrait apporter une vision approfondie du devenir des ETM dans l'environnement minier. En plus de cela, des mesures sur les rapports isotopiques du plomb ont été réalisées grâce à l'ICP-MS (plasma à couplage inductif – spectrométrie de masse) afin d'identifier les différentes sources de plomb. Parmi les quatre isotopes du plomb,  $^{208}\text{Pb}$ ,  $^{206}\text{Pb}$  and  $^{207}\text{Pb}$  résultent de la décomposition radioactive de  $^{238}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$  and  $^{232}\text{Th}$  respectivement, tandis que  $^{204}\text{Pb}$  est un isotope non radiogénique qui représente seulement 1% du plomb total. La galène, qui est le minerai de plomb principalement exploité, ne contient ni U ni Th et de fait, la signature isotopique des minerais est déterminé lors de leur formation. Par la suite, les isotopes du plomb ne sont pas fractionnés dans les procédés industriels, ce qui rend l'identification des sources possible. La technique a montré son efficacité sur des lichens et des mousses en provenance de sites miniers passés (Sondergaard et al. 2010, Baron 2005).

## **2. Méthodes et matériel**

### **2.1. Zone d'étude et échantillonnage**

La zone d'étude située dans le sud de la France (Figure 1) est une zone de forts contrastes : elle présente une faible densité de population (<50 habitants par km<sup>2</sup>) et se

situé entre un parc national (Parc National des Cévennes, établi en 1970) et une zone spéciale de conservation du réseau Natura 2000. Ainsi on pourrait s'attendre à ce que les bioindicateurs potentiels de la zone présentent des concentrations en ETM proches du bruit de fond. Cependant, la région a aussi un important passif en terme d'activités minières : les Malines, où environ 1 millions de tonnes de minerai ont été extraites entre 1885 et 1991, reste la plus grande exploitation de zinc plombifère que la France ait connue (Leguen et al. 1991). Les anciennes mines indiquées en figure 2 ont été répertoriées d'après des enquêtes nationales (BRGM 2012). Des études précédentes dans le secteur minier des Malines ont montré des concentrations en ETM élevées dans certains sols ainsi que la présence d'espèces hyperaccumulatrices de métaux (Grison et al. 2010). Des concentrations élevées en ETM dans du poisson ont aussi été signalées dans la région (Monna et al. 2011). Cependant, à ce jour, aucune étude n'a été réalisée sur les produits apicoles, ni sur les lichens et mousses.

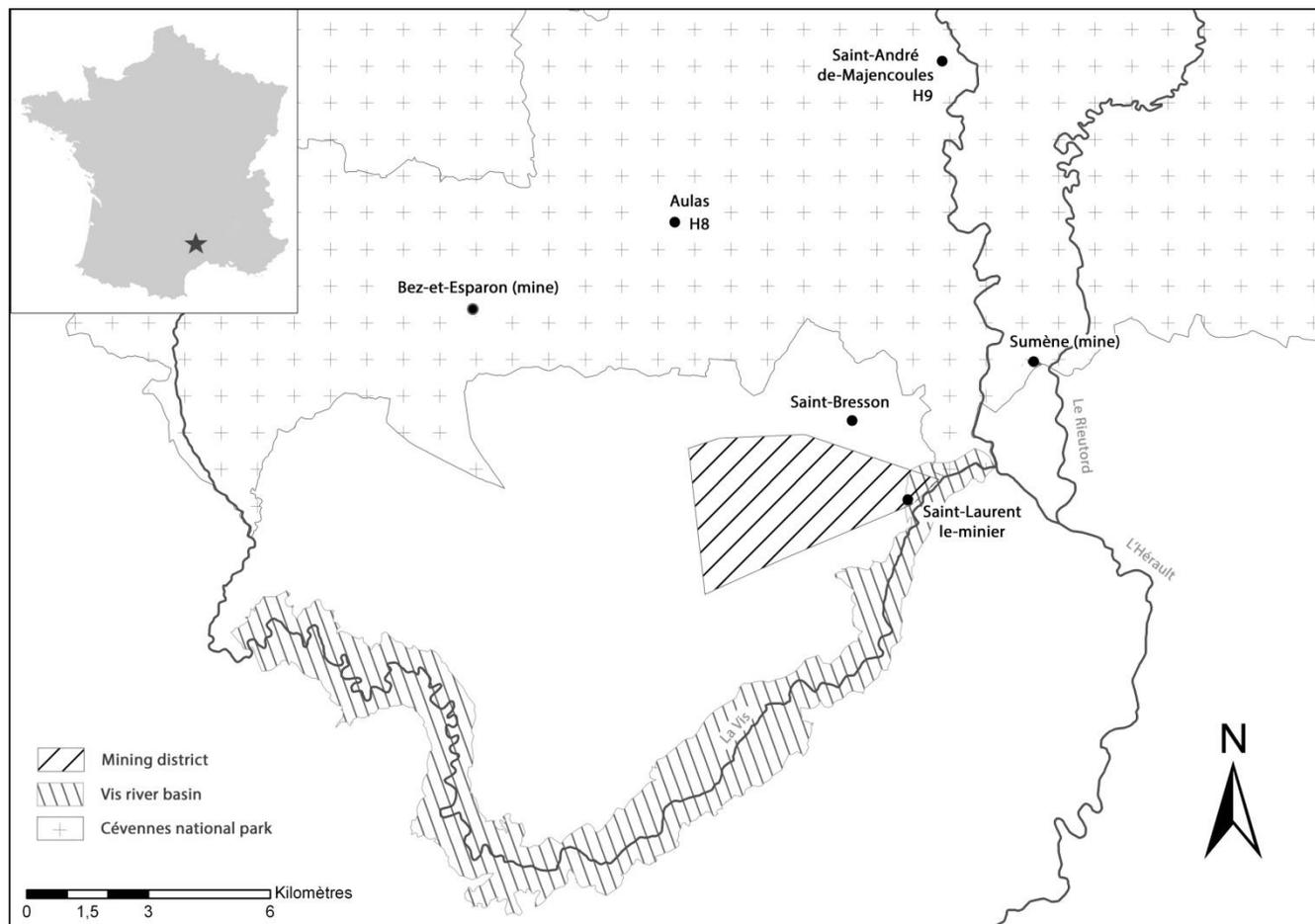


Figure 4 – Plan de situation de la zone d'étude

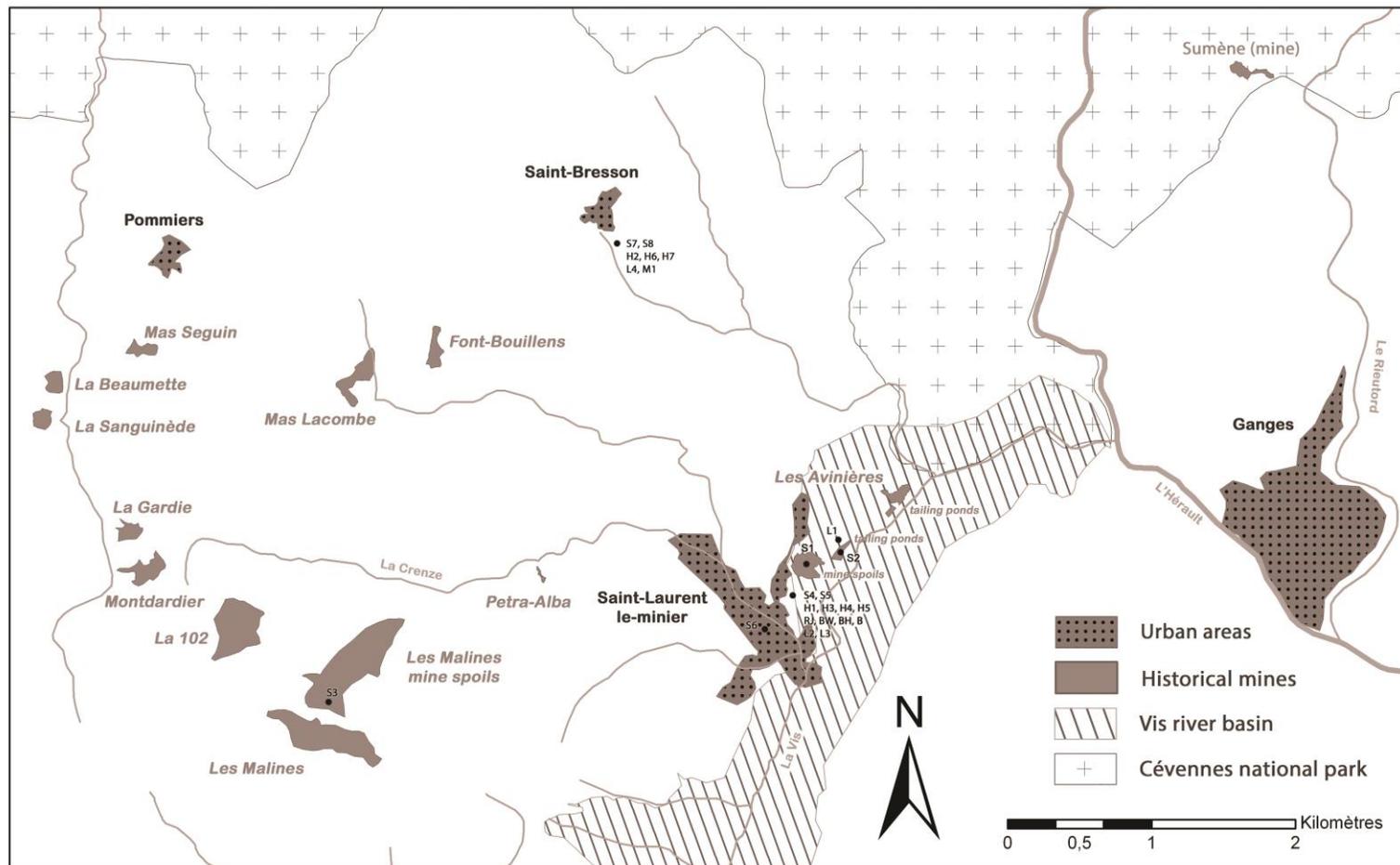


Figure 5 – Plan d'échantillonnage des miels, lichens, mousses et sols

## 2.2. *Traitement et analyses des échantillons*

### 2.2.1. *Généralités*

Tous les réactifs utilisés dans cette étude étaient de haute pureté. Toutes les solutions ont été préparées en utilisant de l'eau doublement déionisée (Milli-Q Millipore 18.2M $\Omega$ .cm at 21°C). Pour chaque procédure de minéralisation, des blancs et des standards ont été préparés dans les mêmes conditions pour fin de contrôles. Toutes les analyses ICP-MS ont été réalisées sur un appareil Thermo Scientific - X Series II (Plateforme AETE – HydroSciences/OSU OREME, Montpellier – France) avec In et Bi comme standards internes. Les rapports isotopiques du plomb ont été analysés sur le même appareillage :  $^{206}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}$  et  $^{208}\text{Pb}$  ont été mesurés avec des temps de résidence de 20ms, 20ms et 15ms respectivement. 10 passages de 100 balayages ont été réalisés pour chaque analyse. Les biais externes relatifs au spectromètre de masse ont été corrigés par l'utilisation du standard NBS 981 (Aries et al. 2001). Le temps mort a été mesuré pour les isotopes du plomb à 35ns : cette valeur a été utilisée avec le logiciel Plasma Lab (Thermo Scientific) pour une correction automatique de l'intensité des signaux. La concentration en plomb du standard NBS 981 a été ajustée à 20ppb, tandis qu'elle allait de 4 à 15ppb dans les échantillons expérimentaux. Le signal maximal obtenu pour  $^{208}\text{Pb}$  était de  $10^6$  dans le cas du standard NBS 981.

### 2.2.2. *Produits apicoles*

Des prélèvements ont été effectués sur deux ruchers contenant 5 et 6 ruches respectivement situés à Saint-Laurent-le-Minier (sites des Avinières) et Saint-Bresson (Figure 2). Les dates des récoltes sont indiquées dans le tableau 4. Le miel a été extrait en utilisant des collecteurs en acier inoxydable, puis a été stocké dans des pots de verre couramment utilisés par les apiculteurs. Les procédés ont été évalués pour s'assurer qu'ils n'étaient pas la cause de la présence des ETM. La gelée-royale et la cire d'abeille qui ne sont pas exploitées ont été collectées directement à partir des ruches et stockées dans des récipients en polyéthylène. En ce qui concerne les abeilles, des individus morts ont été collectés dans et aux abords d'une ruche dont la population avait brutalement décliné.

Une méthode de digestion en solution en vase ouvert a été mise en œuvre d'après Tuzen et al. (2007) : les échantillons de miels ont été chauffés à 30°C, homogénéisés et 3g ont ensuite été prélevés pour analyses. 12mL d'un mélange acide et oxydant (2:1 HNO<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ont été ajoutés par gramme d'échantillon et la solution obtenue a été chauffée à 100°C jusqu'à évaporation. Les résidus secs ont été mis en solution dans l'acide nitrique avant analyses. WEPAL IPE 110 (Mélilot officinal) acheté chez LGC Standards a été utilisé comme référence (Tableau 1) puisqu'il n'existe pas de standard de miel certifié pour ses concentrations en ETM. Des ajouts dosés ont aussi confirmé la méthode employée pour les produits apicoles.

### 2.2.3. Lichens et mousses

Les lichens et mousses ont été collectés autour des ruches à l'aide de spatules en Téflon et stockés dans des flacons de polyéthylène. L'objectif est de mesurer une concentration moyenne dans la zone autour des ruches. Les différentes espèces de lichens (*Cladonia rangiformis* ou *Parmelia acetabulum*) et de mousses (*Scleropodium purum* ou *Dicranum scoparium*) ont été stockées séparément (Tableau 6). Les échantillons ont été traités selon les directives de la commission européenne des standards, mesures et programmes de tests (Quevauviller et al. 1996) : les échantillons ont été séchés à l'air et toutes les particules adhérentes ont été enlevées à la main avant un broyage dans un mortier d'agate. La poudre ainsi obtenue a ensuite été traitée selon le même procédé de digestion que les produits apicoles. WEPAL IPE 110 a dans ce cas aussi été utilisé pour le contrôle qualité (Tableau 1).

### 2.2.4. Sols

Les échantillons de sols ont été collectés sur l'horizon A à l'aide de spatules en téflon et ont été stockés dans des récipients en polyéthylène. S1, S2 et S3 ne sont pas des sols au sens strict, mais des déchets miniers. S4, S6 et S7 des sols enrichis en humus collectés au voisinage des ruches (S4-S7) ou dans des zones pastorales (S6). S5 et S8 enfin sont un mélange de sol et de déchets sortis de la ruche par les ouvrières. Les échantillons de sols ont été traités selon une procédure habituelle au laboratoire : ils sont séchés à 60°C jusqu'à stabilisation du poids, tamisés à 2mm et homogénéisés. Environ 120mg de sols ont été attaqués par : i) 4mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ii) 4mL HNO<sub>3</sub> iii) 4mL HNO<sub>3</sub>:HCl (1:3). A chaque étape la solution obtenue était chauffée à 100°C jusqu'à évaporation. Les résidus à sec obtenus après l'étape iii) ont été dissouts dans l'acide nitrique à 2,5% en volume pour analyses. Cette procédure a été certifiée en utilisant l'échantillon de certification inter-laboratoires BIPEA 402.

Tableau 2 – Certification d'analyses sur WEPAL IPE 110 (mg.kg<sup>-1</sup>)

	<b>Mg</b>	<b>P</b>	<b>Ca</b>	<b>Cr</b>	<b>Mn</b>	<b>Co</b>	<b>Ni</b>
<b>Mean (n=5)</b>	1372	3311	4752	0.477	17.8	0.072	0.557
<b>Standard-Deviation</b>	50	131	66	0.06	0.18	0.003	0.071
<b>Certified Values (WEPAL IPE 110)</b>	1440	3250	4920	0.493	17.9	0.074	0.554
<b>% Recovery</b>	95	102	97	97	99	97	101

Tableau 1 - Suite

	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>As</b>	<b>Cd</b>	<b>Sb</b>	<b>Ba</b>	<b>Pb</b>
<b>Mean (n=5)</b>	7.191	32.165	0.083	0.124	0.037	4.910	1.158
<b>Standard-Deviation</b>	0.1	0.7	0.002	0.001	0.002	0.03	0.05
<b>Certified Values (WEPAL IPE 110)</b>	7.35	32.7	0.0911	0.126	0.0354	5.48	1.15
<b>% Recovery</b>	98	98	91	98	104	90	101

Tableau 3 – VCI pour un usage sensible (mg.kg<sup>-1</sup> matière sèche)

<b>Element</b>	<b>Zn</b>	<b>As</b>	<b>Cd</b>	<b>TI</b>	<b>Pb</b>
<b>VCI</b>	9000	37	20	10	400

### 3. Résultats et discussions

#### 3.1. Teneurs en ETM des sols

Dans une approche basée sur l'évaluation des risques, les autorités françaises ont publié des valeurs guides en vue de la gestion des sites pollués : des valeurs de constats d'impacts (VCI) basées sur des études de toxicité permettent de relier l'usage des sols aux risques pour la santé publique. Des valeurs d'usage sensible ont été sélectionnées ici en raison de la proximité de zone d'habitation. Ces valeurs ont été mises au point pour une utilisation dans un système de scores, qui permet de définir des zones d'action prioritaire. Toutefois, elles peuvent aussi donner une indication sur les risques liés à un site (Carlon 2007).

Tableau 4 – Analyse élémentaire des sols ( $\text{mg.kg}^{-1}$  matière sèche)

Réf.	Type	Lieu	Distance à la mine <sup>a</sup> (m)	Zn	As	Cd	Tl	Pb
S1	Déchets miniers	Les Avinières	0	86 706*	4 247*	408*	317*	66 388*
S2	Déchets miniers	Les Avinières	0	125 456*	734*	1 605*	37.1*	88 472*
S3	Déchets miniers	Les Malines	0	56 999*	103*	386*	6.45	3 686*
S4	Abord des ruches	Les Avinières	250	3 684	147*	8.79	16.1*	1 234*
S5	Sous la ruche	Les Avinières	250	2 513	125*	7.47	9.5	858*
S6	Abords des ruches	St-Laurent	500	2 879	75*	8.26	3.6	1 787*
S7	Abords des ruches	St-Bresson	1500	50.8	159*	<dl	4.8	379
S8	Sous la ruche	St-Bresson	1500	202	127*	<dl	2.6	369

<sup>a</sup>Distance à la mine la plus proche qui est les Avinières pour les échantillons en provenance de Saint-Laurent-le-Minier et Font-Bouillens pour ceux de Saint-Bresson; \*Valeurs supérieures aux VCI; na = non réalisé; <dl = valeur sous la limite de détection

Les sols S1 et S2 prélevés au voisinage du crassier des Avinières et des bassins de décantation ont les concentrations en ETM les plus importantes (Tableau 3) avec des teneurs en Zn, As, Cd, Tl et Pb qui sont largement au-dessus des VCI. S3 qui provient des bassins de décantation des Malines a une composition proche, excepté en ce qui concerne sa teneur en Tl, plus faible. Tous ces sols représentent des sources de contamination potentielle. En ce qui concerne les autres échantillons, les concentrations en Zn et Cd sont toutes en dessous des VCI correspondantes. Pour As en revanche, les teneurs sont toutes supérieures aux VCI avec des teneurs en moyenne 3,4 fois supérieures à la VCI correspondante : dans ce cas, la toxicité potentielle et les concentrations élevées présentent un risque. Tl et Pb sont plus contrastés avec des valeurs parfois supérieures aux VCI correspondantes. Quoi qu'il en soit, une nette tendance à la baisse des concentrations en Tl et Pb peut être observée lorsque l'on

s'éloigne des anciens sites miniers : ce phénomène est très probablement lié au transport éolien de poussières chargées (Sondergaard et al. 2010).

Des cas de saturnisme à un stade précoce ont été décelés chez des enfants qui avaient consommé des végétaux produits localement et utilisé les stériles miniers comme terrain de jeu. Ceci met en évidence la nécessité de bien comprendre la mobilisation des contaminants puisque l'érosion des sols peut entraîner une contamination diffuse. Des teneurs en plomb supérieures à 1 000 mg.kg<sup>-1</sup> ont été mesurées jusqu'à 4,5km en aval de Saint-Laurent-le-Minier sur la Vis (Escarre et al. 2011). Les impacts potentiels sur la santé publique pourraient être sérieux, et des mesures de précautions telles que des restrictions d'usage des puits et sources locaux, ainsi que l'interdiction de vendre des légumes produits localement ont été mises en place. A ce jour, les impacts potentiels d'un tel contexte sur les activités apicoles n'ont jamais été étudiés.

### **3.2. Teneurs en ETM de bioindicateurs potentiels**

#### **3.2.1. Cas du miel (Tableau 4)**

Ca, Mg et P présents à de concentrations moyennes ( $\pm$ erreur standard) de 175 $\pm$ 74,1 mg.kg<sup>-1</sup>, 97,7 $\pm$ 44,9 mg.kg<sup>-1</sup> and 72,4 $\pm$ 20,6 mg.kg<sup>-1</sup> sont les éléments les plus abondants dans le miel. Mn et Zn suivent avec des concentrations à 7,57 $\pm$ 3,69 mg.kg<sup>-1</sup>, and 0,571 $\pm$ 0,440 mg.kg<sup>-1</sup>. Ceci est en accord avec les tendances mises en évidence par Devillers et al. (2002) : Ca, Mg, P et Mn sont connus pour leur rôle physiologique et leur présence dans le miel à ces concentrations n'est pas préoccupante.

Des concentrations en Zn significativement plus élevées (test de Wilcoxon,  $z=-2.460$ ,  $P=0.0139$ ) peuvent être mises en évidence sur H1 et H3-5 par rapport à H2, H6-9. H1, H3-5 ont été récoltés à proximités de décharges minières (<250m) tandis que H2, H6-9 ont été collectés à des distances plus élevées (>1 500m). Cependant les concentrations en Zn dans les miels de la région sont faibles comparées à l'ensemble des données disponibles dans la littérature : les

Tableau 5 – Analyses élémentaires du miel (H), de la gelée-royale (RJ) de la cire d'abeilles (W) (masse fraîche) et des abeilles (BH, B) (masse sèche) (mg.kg<sup>-1</sup>)

Référence	Lieu	Distance à la mine* (m)	Date	Mg	P	Ca	Mn	Zn	As	Cd	Sb	Tl	Pb
H1	les Avinières	250	04.2011	80.5	40.7	187	5.81	0.806	0.001	0.009	0.002	0.006	0.003
H2	St-Bresson	1500	05.2011	122	78.4	204	9.17	0.556	0.001	0.004	0.001	0.001	0.035
H3	les Avinières	250	05.2011	125	115	219	6.77	1.4	0.003	0.022	0.003	0.037	0.101
H4	les Avinières	250	06.2011	44.8	65.6	76.7	3.22	0.905	0.001	0.003	0.001	0.006	0.011
H5	les Avinières	250	07.2011	163	66.6	277	10.5	0.613	0.001	0.001	0.001	0.012	0.009
H6	St-Bresson	1500	06.2011	101	80.1	200	7.86	0.429	0.008	0.006	0.002	0.013	0.005
H7	St-Bresson	1500	07.2011	66	82.3	168	10.6	0.429	0.002	0.003	0.001	0.019	0.025
H8	Aulas	4000 <sup>a</sup>	2011	32.8	59.4	36.4	1.38	<dl	<dl	0.001	<dl	0.012	0.006
H9	Majencoule	7500 <sup>b</sup>	2011	145	62.8	206	12.8	<dl	0.001	0.001	0.002	0.003	0.014
RJ	les Avinières	250	05.2011	33.8	61.7	123	0.304	0.906	0.005	0.007	0.002	<dl	0.168
W	les Avinières	250	05.2011	167	78.8	305	16.1	1.520	0.012	0.006	0.001	0.013	<dl

Référence	Lieu	Distance à la mine (m)	Date	Mg	P	Ca	Mn	Zn	As	Cd	Sb	Tl	Pb
BH	les Avinières	250	05.2011	2 047	13 050	1 857	93.1	167	0.056	2.9	0.026	0.133	1.44
B	les Avinières	250	05.2011	2 286	14 290	1 783	80.7	172	0.059	2.5	0.025	0.149	0.832

<dl>=valeur sous la limite de détection; \* Distance à la mine la plus proche qui est les Avinières pour les échantillons en provenance de Saint-Laurent-le-Minier et Font-Bouillens pour ceux de Saint-Bresson ; <sup>a</sup> Distance à la mine de Bez-et-Esparron; <sup>b</sup> Distance à la mine des Jumeaux à Sumène

plus fortes concentrations en Zn mesurées étaient de  $113\text{mg.kg}^{-1}$  dans un échantillon unique (Pohl et al. 2009) et une moyenne à  $29,4\text{mg.kg}^{-1}$  dans un contexte de contamination par des gaz d'échappement en Italie (Leita et al. 1996). Quoi qu'il en soit, les concentrations en Zn dans le miel varient habituellement entre  $1,3\text{mg.kg}^{-1}$  (Devillers et al. 2002) et  $7,76\text{ mg.kg}^{-1}$  (Przybylowski and Wilczynska 2001). Les concentrations dans les échantillons témoins (H8 et H9) sont particulièrement faibles : ceci est certainement lié à la composition florale et aux pratiques apicoles. D'après Bogdanov et al. (2007) la composition florale est un paramètre majeur dans la composition élémentaire du miel, et l'utilisation de récipients en acier galvanisé est aussi une source potentiellement importante de Zn (Gonzalez-Paramas et al. 2000). Dans ce cas, seuls des récipients en acier inoxydable ont été utilisés, et la conclusion que l'on peut tirer de ces mesures est que le contexte minier n'entraîne pas des teneurs en Zn problématiques dans les miels.

La présence d'autres ETM pourrait être liée au contexte minier : c'est le cas de Pb ( $26\pm 20\text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$ ), Tl ( $13\pm 10\text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$ ), Cd ( $7\pm 6\text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) et As ( $3\pm 4\text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Le miel H3 récolté au voisinage de la mine des Avinières présente les plus fortes concentrations en Pb ( $101\text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$ ), Tl ( $37\text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) et Cd ( $22\text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$ ), ce qui corrèle avec les analyses de sols réalisées. Néanmoins, en ce qui concerne Pb, Tl, Cd et As, aucune différence statistiquement significative entre les concentrations n'a pu être liée à la proximité des anciens sites miniers (test de Wilcoxon,  $P>0.05$ ), ce qui signifie que d'autres sources de variabilité sont à rechercher. De plus, les concentrations en Pb, Cd et As mesurées ici sont situées à des niveaux qui ne sont pas supérieurs à ceux décrits auparavant dans d'autres contextes (Pohl et al. 2009). S'il n'existe pas de normes spécifiques au miel, les recommandations du *codex alimentarius* qui donnent des apports maximums tolérables en Pb et Cd permettent par ailleurs d'affirmer que la consommation des miels étudiés ici ne devrait pas poser de problème sanitaire.

L'absence d'effets des anciens sites miniers sur la composition minérale du miel avait déjà été mise en avant dans d'autres contextes (Iskander 1996) et les résultats obtenus ici confirment les conclusions de Conti and Botre (2001) : l'utilisation du miel pour des suivis de contamination environnementale par les ETM n'est pas fiable.

### 3.2.2. Cas de la gelée royale et de la cire d'abeille (Tableau 4)

Ca, P, Mg, Zn et Mn sont les éléments les plus abondants dans la gelée-royale et ce sont aussi ceux qui sont nécessaires au développement des larves. Cette observation est en accord avec la littérature et les concentrations en ETM sont du même ordre de grandeur que celles qui ont été mesurées en dehors du contexte minier (Stocker et al. 2005). Pour Zn, Cd et Pb, Leita et al. (1996) ont aussi montré des concentrations supérieures dans la gelée-royale par rapport au miel correspondant. Ceci va à l'encontre de l'homéostasie observée par Stocker et al. (2005). Dans le cas de nos observations, la gelée-royale (RJ) ainsi que le miel correspondant (H3) affichent des concentrations en ETM comparables, et comme dans le cas du miel, il n'est pas possible de conclure à une contamination liée à la proximité des anciens sites miniers. Le même constat est aussi à faire dans le cas de la cire d'abeille qui présente des concentrations en Pb, Cd et Tl particulièrement faibles : dans le cas de la cire, les très faibles concentrations devraient amener à éviter son utilisation à des fins de suivi environnemental des ETM.

### 3.2.3. Cas des abeilles (Tableau 4 et 5)

Tableau 6 – Concentrations maximales et minimales en ETM observées dans les tissus d'abeilles (mg.kg<sup>-1</sup> dry weight)

Element	Min	Source	Max	Source
<b>Cr</b>	0.000052	(Conti and Botre 2001)	6.1	(Kump and others 1996)
<b>Mn</b>	n.a		59	(Kump and others 1996)
<b>Ni</b>	0.3	(Balestra and others 1992)	2.1	(Kump and others 1996)
<b>Cu</b>	n.a		32.1	(Kump and others 1996)
<b>Zn</b>	200	(Kump and others 1996)	1100	(Leita and others 1996)
<b>Cd</b>	0.00287	(Conti and Botre 2001)	7	(Leita and others 1996)
<b>Pb</b>	0.00052	(Conti and Botre 2001)	27	(Leita and others 1996)

Les ETM les plus abondants dans les tissus des abeilles sont de nouveau P, Mg, Ca, Zn et Mn compte-tenu de leurs rôles physiologiques. Le tableau 5 détaille les données issues de la littérature sur ce type de tissus. Il en ressort que seules les concentrations en Cd sont élevées dans nos échantillons. En ce qui concerne Tl, c'est la première fois qu'il est mesuré et la présence de cet élément même à de faibles concentrations pourrait avoir un impact sur la santé des abeilles. Les apiculteurs de la région semblaient d'ailleurs s'inquiéter d'impacts possibles des ETM sur la santé des colonies : le fait que les abeilles mortes collectées dans la ruche et en dehors présentent des concentrations en ETM proches reflète plutôt l'impact d'évènements climatiques sur la disponibilité des ressources, un problème malheureusement bien connu sur le pourtour méditerranéen (Dixon 2009). Selon nos observations, il semble que les abeilles ne peuvent pas non plus être utilisées pour réaliser un suivi environnemental des ETM.

### 3.2.4. Lichens et mousses (Tableau 6)

Les échantillons collectés ne présentaient pas de signes visuels d'intoxication par les ETM présents et les éléments essentiels tels que Mg, P, Ca et Mn sont présents à des concentrations normales (Szczepaniak and Biziuk 2003). Toutefois une baisse notable des concentrations en Mg, Ca et Mn peut être observée pour les échantillons qui sont collectés au voisinage des sources de contamination : ceci est un signe d'intoxication. Dans le cas de *Cladonia rangiformis*, les ETM qui pourraient être toxiques présentent des réponses différentes : Cr, As et Tl ont des concentrations qui augmentent lorsque l'on s'éloigne des sites miniers tandis que Cu, Zn, Cd, Sb et Pb ont des concentrations qui diminuent de 1 à 2 ordres de grandeur de 0 à 250m des sites. Des comportements semblables ont déjà été relatés en Turquie (Cayir et al. 2007) mais avec des concentrations notoirement plus basses : 30,5±9,15 mg.kg<sup>-1</sup> pour Zn, 6,95±9,63 mg.kg<sup>-1</sup> pour Pb et 0,31±0,14 mg.kg<sup>-1</sup> pour Cd. Dans le cas d'As et Tl, ces mesures sont les premières de ce type et il n'existe pas de point de comparaison.

En règle générale, pour les échantillons en provenance des Avinières, les lichens terricoles (L1, L2) présentent des concentrations en ETM supérieures aux lichens corticoles (L3) : ceci est clairement causé par l'influence du sol. Dans le cas de L3, pour lequel l'influence directe du sol est faible, les concentrations en ETM restent élevées, ce

qui reflète l'importance des dépositions atmosphériques. En ce qui concerne les échantillons en provenance de St-Bresson, les concentrations en ETM sont plus faibles, ce qui est en accord avec la présence de moindres sources de pollution. Des corrélations négatives entre les concentrations en ETM et les distances aux sources de contamination peuvent être observées pour Zn, Cd, Tl et Pb avec des corrélations similaires à celles observées pour les sols. Ceci montre une réponse très différentes des lichens et mousses par rapport aux produits apicoles : ceux-ci sont contaminés par la mobilisation aérienne de poussières chargées en ETM en provenance des sources de contamination. Nous allons aussi voir que les données obtenues sur l'isotopie du Pb permettent de préciser ces observations par identification des sources.

Tableau 7 – Analyse élémentaire des lichens et mousses (mg.kg<sup>-1</sup> matière sèche)

Référence	Espèce	Lieu	Distance à la mine* (m)	Mg	P	Ca	Cr	Mn	Cu	Zn	As	Cd	Sb	Tl	Pb
L1	<i>Cladonia rangiformis</i>	les Avinières	0	1178	698	3855	1.18	22.7	8.01	1041	5	15.1	3.51	0.317	614
L2	<i>Cladonia rangiformis</i>	les Avinières	250	3321	548	10032	3.15	97.9	5.34	286	9.28	0.628	1.16	0.902	72.6
L3	<i>Parmelia acetabulum</i>	les Avinières	250	2015	1419	25342	2.47	60.9	17.9	107	1.36	0.42	0.308	1.46	33.5
L4	<i>Parmelia acetabulum</i>	St-Bresson	1500	4238	1910	36349	4.29	382	14.8	70.6	11.4	0.201	1.23	1.08	36.3
M1	<i>Scleropodium purum + Dicranum scoparium</i>	St-Bresson	1500	3946	2847	12127	1.11	265	11.8	37.2	1.85	0.002	0.557	2.07	13.1

\* Distance à la mine la plus proche qui est les Avinières pour les échantillons en provenance de Saint-Laurent-le-Minier et Font-Bouillens pour ceux de Saint-Bresson

Tableau 8 – Rapports isotopiques pour Pb

Référence	<sup>208</sup> Pb / <sup>206</sup> Pb	<sup>206</sup> Pb / <sup>207</sup> Pb
S1	2.0892	1.1723
S2	2.0902	1.1751
S3	2.0921	1.1751
S4	2.1065	1.1548
S5	2.0862	1.1710
S6	2.0872	1.1696
L1	2.0947	1.1696
L2	2.0971	1.1696
L3	2.1011	1.1615
L4	2.1010	1.1588
M1	2.1035	1.1522

### 3.3. Isotopie du plomb (Tableau 7 et Figure 3)

Les minerais du secteur des Malines présentent une composition isotopique très homogène pour Pb, ce qui facilite leur caractérisation (Leguen et al. 1991). Le tableau 7 ainsi que la figure 3 résumant les données obtenues dans notre étude. Des données en provenance de la littérature ont aussi été incluses afin de caractériser les granits locaux ainsi que les émissions d'origines anthropiques (Monna et al. 1997). Les ratios isotopiques sont  $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$  1,1008-1,1342  $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$  2,1236-2,1603 pour les émissions urbaines, et  $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$  1,1674-1,1857  $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$  2,0741-2,0978 pour les minerais en provenance des Malines. Bien que des graphes tels que ceux obtenus en figure 3 puissent résulter du mélange de plus de deux sources de Pb, ils permettent néanmoins de caractériser des signatures isotopiques distinctes en relation avec les sources.

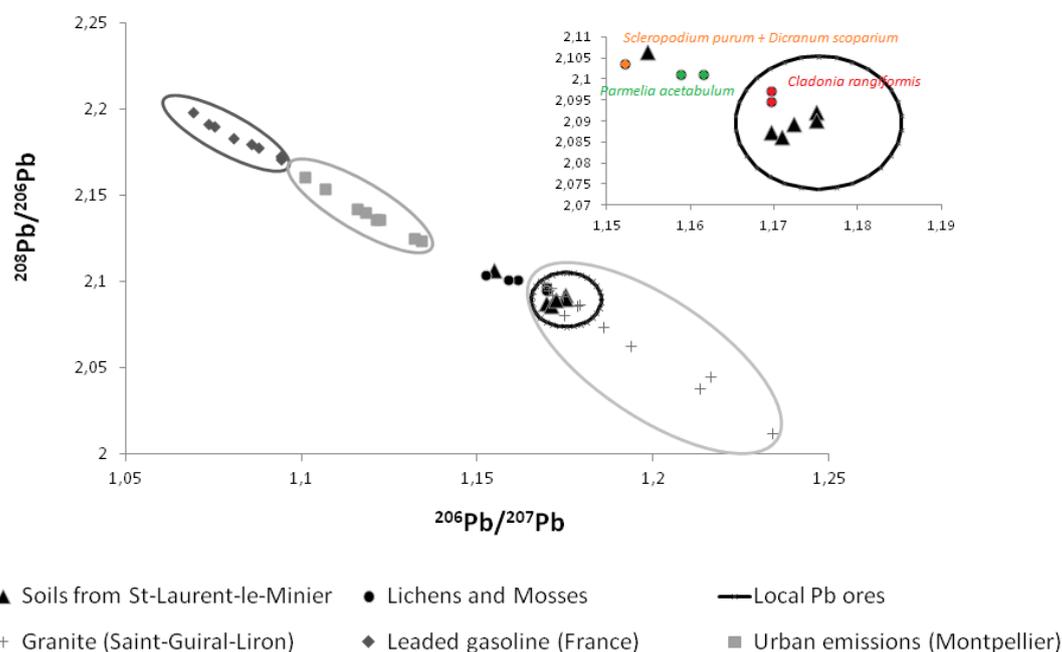


Figure 6 – Représentation graphique des données d'isotopie du Pb

Tous les sols traités dans cette étude hormis S6 présentent une signature isotopique caractéristique des minerais de Pb des Malines. Cette observation associée aux données d'analyse élémentaire des sols laisse supposer que le Pb provient bien d'une contamination due aux anciennes activités minières et n'est pas le résultat d'une curiosité géologique locale. Le cas du sol S6 est le résultat d'une contamination issue du mélange de plusieurs sources, vraisemblablement liées aux activités minières d'une part et aux autres émissions anthropiques d'autre part. Pour les lichens et les mousses, les échantillons L1 et L2 présentent la signature isotopique du Pb des minerais des Malines, ce qui confirme l'influence des déchets minières sur ceux-ci. Les autres échantillons (L3, L4 et M1) présentent eux des contaminations par des sources multiples avec une influence dominante des activités minières passées associées à d'autres émissions anthropiques. Même près de 20 ans après la fermeture des mines, les impacts environnementaux restent évidents.

## 4. Conclusions

Dans le cas des produits apicoles, les résultats présentés ici montrent qu'ils ne sont pas adaptés à des suivis environnementaux des ETM : le secteur minier des Malines présente un problème évident de contamination par les ETM en provenance des zones de stockage des déchets miniers, mais sans que cela n'affecte le miel, la gelée-royale, la cire ou bien encore les abeilles. Le miel en particulier n'est pas contaminé par les ETM présents au voisinage des déchets miniers et la consommation du miel produit dans un tel contexte ne semble pas présenter de risque particulier.

Les lichens ainsi que les mousses en revanche confirment leur fort potentiel pour des mesures de retombées atmosphériques : aucun phénomène de bioaccumulation sélective n'a pu être mis en évidence par nos mesures et les échantillons prélevés présentaient des concentrations en ETM corrélées à celles des sols correspondants. L'analyse des signatures isotopiques du Pb a montré que les activités minières passées étaient une source majeure de Pb avec toutefois l'impact d'autres types d'émissions anthropiques. Le transport éolien de poussières contaminées est le mécanisme principal de mobilisation des ETM.

## Références

- Aries, S., Motelica-Heino, M., Freydier, R., Grezes, T. and Polve, M. (2001) 'Direct determination of lead isotope ratios by laser ablation-inductively coupled plasma-quadrupole mass spectrometry in lake sediment samples', *Geostandards Newsletter-the Journal of Geostandards and Geoanalysis*, 25(2-3), 387-398.
- Baron, S. (2005) *Traçabilité et évolution d'une pollution métallurgique médiévale de plomb argentifère sur le Mont-Lozère*, unpublished thesis Université de Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc.
- Bogdanov, S., Haldimann, M., Luginbuhl, W. and Gallmann, P. (2007) 'Minerals in honey: environmental geographical and botanical aspects', *Journal of Apicultural Research*, 46(4), 269-275.
- BRGM (2012) 'Inventaire historique de sites industriels et activités de service', [online], available: [accessed
- Carlon, C. (2007) *Derivation of soil screening values in Europe. A review and evaluation of national procedures towards harmonisation.*, European Commission, Joint Research Centre, Ispra.
- Cayir, A., Coskun, M. and Coskun, M. (2007) 'Determination of atmospheric heavy metal pollution in Canakkale and Balikesir provinces using lichen (*Cladonia rangiformis*) as a bioindicator', *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 79(4), 367-370.
- Chettri, M. K., Cook, C. M., Vardaka, E., Sawidis, T. and Lanaras, T. (1998) 'The effect of Cu, Zn and Pb on the chlorophyll content of the lichens *Cladonia convoluta* and *Cladonia rangiformis*', *Environmental and Experimental Botany*, 39(1), 1-10.
- Colin, J. L., Galsomiers, L., Gombert, S., Leblond, S., Losno, R. and Raush de Trautenberg, C. (2005) *Pollution atmosphérique par les métaux*, EDP Sciences.
- Conti, M. E. and Botre, F. (2001) 'Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metals contamination', *Environmental Monitoring and Assessment*, 69(3), 267-282.
- Devillers, J., Dore, J. C., Marengo, M., Poirier-Duchene, F., Galand, N. and Viel, C. (2002) 'Chemometrical analysis of 18 metallic and nonmetallic elements found in honeys sold in France', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5998-6007.
- Dixon, K. W. (2009) 'Pollination and Restoration', *Science*, 325(5940), 571-572.
- Doucet, F. J. and Carignan, J. (2001) 'Atmospheric Pb isotopic composition and trace metal concentration as revealed by epiphytic lichens: an investigation related to two altitudinal sections in Eastern France', *Atmospheric Environment*, 35(21), 3681-3690.
- Escarre, J., Lefebvre, C., Raboyeau, S., Dossantos, A., Gruber, W., Marel, J. C. C., Frerot, H., Noret, N., Mahieu, S., Collin, C. and van Oort, F. (2011) 'Heavy Metal Concentration Survey in Soils and Plants of the Les Malines Mining District (Southern France): Implications for Soil Restoration', *Water Air and Soil Pollution*, 216(1-4), 485-504.
- Gonzalez-Paramas, A. M., Gomez-Barez, J. A., Garcia-Villanova, R. J., Rivas-Pala, T., Ardanuy-Albajar, R. and Sanchez-Sanchez, J. (2000) 'Geographical discrimination of honeys by using mineral composition and common chemical quality parameters', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(1), 157-165.

- Grison, C., Escarre, J., Berthomme, M.-L., Couhet-Guichot, J., Grison, C. and Hosity, F. (2010) '*Thlaspi caerulescens*, an indicator of soil pollution?', *Actualite Chimique*, (340), 27-31.
- Harmens, H., Buse, A., Buker, P., Norris, D., Mills, G., Williams, B., Reynolds, B., Ashenden, T. W., Ruhling, A. and Steinnes, E. (2004) 'Heavy metal concentrations in European mosses: 2000/2001 survey', *Journal of Atmospheric Chemistry*, 49(1-3), 425-436.
- Hernandez, O. M., Fraga, J. M. G., Jimenez, A. I., Jimenez, F. and Arias, J. J. (2005) 'Characterization of honey from the Canary Islands: determination of the mineral content by atomic absorption spectrophotometry', *Food Chemistry*, 93(3), 449-458.
- Iskander, F. Y. (1996) 'Assessment of trace elements in honey produced on uranium mining reclaimed land', *Science of the Total Environment*, 192(1), 119-122.
- Lambert, O., Veyrand, B., Durand, S., Marchand, P., Le Bizec, B., Piroux, M., Puyo, S., Thorin, C., Delbac, F. and Poulliquen, H. (2012) 'Polycyclic aromatic hydrocarbons: bees, honey and pollen as sentinels for environmental chemical contaminants', *Chemosphere*, 86(1), 98-104.
- Leguen, M., Orgeval, J. J. and Lancelot, J. (1991) 'Lead Isotope Behavior in a Polyphased Pb-Zn ore deposit - Les Malines (Cévennes, France)', *Mineralium Deposita*, 26(3).
- Leita, L., Muhlbachova, G., Cesco, S., Barbattini, R. and Mondini, C. (1996) 'Investigation of the use of honey bees and honey bee products to assess heavy metals contamination', *Environmental Monitoring and Assessment*, 43(1), 1-9.
- Markert, B., Herpin, U., Siewers, U., Berlekamp, J. and Lieth, H. (1996) 'The German heavy metal survey by means of mosses', *Science of the Total Environment*, 182(1-3), 159-168.
- Monna, F., Camizuli, E., Revelli, P., Biville, C., Thomas, C., Losno, R., Scheifler, R., Bruguier, O., Baron, S., Chateau, C., Ploquin, A. and Alibert, P. (2011) 'Wild Brown Trout Affected by Historical Mining in the Cevennes National Park, France', *Environmental Science & Technology*, 45(16), 6823-6830.
- Monna, F., Lancelot, J., Croudace, I. W., Cundy, A. B. and Lewis, J. T. (1997) 'Pb isotopic composition of airborne particulate material from France and the southern United Kingdom: Implications for Pb pollution sources in urban areas', *Environmental Science & Technology*, 31(8), 2277-2286.
- Pisani, A., Protano, G. and Riccobono, F. (2008) 'Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy)', *Food Chemistry*, 107(4), 1553-1560.
- Pohl, P., Sergiel, I. and Stecka, H. (2009) 'Determination and Fractionation of Metals in Honey', *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 39(4), 276-288.
- Przybylowski, P. and Wilczynska, A. (2001) 'Honey as an environmental marker', *Food Chemistry*, 74(3), 289-291.
- Quevauviller, P., Herzig, R. and Muntau, H. (1996) 'Certified reference material of lichen (CRM 482) for the quality control of trace element biomonitoring', *Science of the Total Environment*, 187(2), 143-152.
- Sarret, G., Manceau, A., Cuny, D., Van Haluwyn, C., Deruelle, S., Hazemann, J. L., Soldo, Y., Eybert-Berard, L. and Menthonnex, J. J. (1998) 'Mechanisms of lichen resistance to metallic pollution', *Environmental Science & Technology*, 32(21).
- Sondergaard, J., Asmund, G., Johansen, P. and Elberling, B. (2010) 'Pb isotopes as tracers of mining-related Pb in lichens, seaweed and mussels near a former Pb-Zn mine in West Greenland', *Environmental Pollution*, 158(5), 1319-1326.
- Spiro, B., Weiss, D. J., Purvis, O. W., Mikhailova, I., Williamson, B. J., Coles, B. J. and Udachin, V. (2004) 'Lead isotopes in lichen transplants around a Cu smelter in Russia determined by MC-ICP-MS reveal transient records of multiple sources', *Environmental Science & Technology*, 38(24), 6522-6528.
- Stocker, A., Schramel, P., Kettrup, A. and Bengsch, E. (2005) 'Trace and mineral elements in royal jelly and homeostatic effects', *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19(2-3), 183-189.
- Szczepaniak, K. and Biziuk, M. (2003) 'Aspects of the biomonitoring studies using mosses and lichens as indicators of metal pollution', *Environmental Research*, 93(3), 221-230.
- Terrab, A., Recamales, A. F., Gonzalez-Miret, M. L. and Heredia, F. J. (2005) 'Contribution to the study of avocado honeys by their mineral contents using inductively coupled plasma optical emission spectrometry', *Food Chemistry*, 92(2), 305-309.
- Tonelli, D., Gattavecchia, E., Ghini, S., Porrini, C., Celli, G. and Mercuri, A. M. (1990) 'Honey-bees and their products as indicators of environmental radioactive pollution', *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry-Articles*, 141(2), 427-436.
- Tuzen, M., Silici, S., Mendil, D. and Soylak, M. (2007) 'Trace element levels in honeys from different regions of Turkey', *Food Chemistry*, 103(2), 325-330.

## VIII - Enjeux socio-économiques

Notre équipe propose le **développement industriel de la première perspective de valorisation de cette biomasse unique**. Elle initie une nouvelle branche de la chimie verte : l'écocatalyse. Basés sur l'utilisation des cations métalliques phytoextraits (*e.g.*  $Zn^{2+}$ ), des catalyseurs écologiques présentent des performances très supérieures aux catalyseurs classiques conçus en laboratoire *et* des sélectivités uniques. Dans des conditions douces, ces catalyseurs écologiques permettent la synthèse de molécules à l'impact social important tels que des anticancéreux, des agents antiviraux, des molécules actives contre la malaria, des arômes naturels, des cosmétiques et des intermédiaires clés de l'industrie chimique (**9 brevets CNRS déposés ou publiés, 1 en cours de dépôt et 2 en rédaction**).

Vincent Escande, doctorant financé par l'ADEME et l'Université de Montpellier 2, participe activement à ces recherches.



Notre équipe a démontré que l'association phytoextraction - chimie verte correspondait pleinement aux priorités scientifiques, et environnementales actuelles de rénovation écologique, de valorisation de la biomasse et de transition des ressources du fossile vers le renouvelable.

Un large réseau constitué de partenaires industriels, d'organismes gouvernementaux et de collectivités a été constitué, afin d'initier un développement sans précédent de la phytoextraction sur sites miniers. Il **débouchera prochainement sur la création d'une entreprise dédiée à l'ensemble du programme**. Le **site des Avinières représente le site pilote de cette initiative**. Elle suscite des espoirs forts au niveau des populations locales. Enfin, elle entend être un moteur de la reconstruction environnementale et socio-économique de sites meurtris par des activités industrielles et minières.

## IX - Des travaux de recherche et développement élaborés à partir d'un dialogue permanent avec les collectivités territoriales, communales et les villageois

Au-delà de son intérêt scientifique, le développement d'un tel projet a pour objectif de dynamiser la phytorestauration de nombreux terrains pollués ou dégradés en lui donnant une dimension économique et sociétale motivante. Dans le cas du site des Avinières, il s'agit d'un programme très complexe à mettre en œuvre, car il associe des problématiques scientifiques (les résultats sont innovants) à des problèmes humains difficiles (relogement d'habitants, rachat des terrains miniers par la commune). L'obtention des autorisations par les autorités publiques (ADEME, DREAL) et les collectivités locales (Région, sous-préfecture, communauté des communes) sous-tend également la réussite du programme, et de son développement industriel.

L'objectif est triple :

- 1/ réfléchir à une réhabilitation durable des sols compatible avec l'environnement, les populations locales et les collectivités compétentes ;
- 2/ s'inscrire dans une démarche qui est en accord avec la réglementation ;
- 3/ évaluer le développement économique progressif du projet en associant administration, industriels et riverains concernés.

Les informations vis-à-vis des pouvoirs publics ont été initiées et poursuivies sur la base du bilan présenté. Elles sont schématisées ci-après :



- La remise du Prix universitaire des **Trophées Eco Actions 2010** à l'Assemblée Nationale puis à la mairie de Saint-Laurent-Le-Minier ;
- La remise du **Prix ADEME des Technologies Innovantes pour l'Environnement** au salon Pollutec (2009) ;
- La remise du **Prix de la Recherche** dans la catégorie « Environnement (2011) ;

- La présentation annuelle du projet à l'ensemble des habitants du village dans le cadre de forums d'un **Agenda 21** local (mi-janvier à la mairie de Saint-Laurent-le-Minier en 2011, 2012, 2013, à l'automne 2012 au musée cévenol du Vigan...);
- L'implication d'un **agriculteur de la commune** dans les travaux préparatoires de revégétalisation ;
- Le **recrutement** d'une technicienne agricole du village pour le suivi des cultures sur site ;
- La signature d'une convention d'occupation du site entre le CNRS, l'IRD, la Commune et l'ADEME ;
- Plusieurs rencontres de réflexions, de présentations sur site et de conférences à des colloques organisés par l'**ADEME** (direction « déchets et sols / département sites et sols pollués», Dr Cadière et Roussel) et le **MEDDEM** (Thibault Prévost);



<http://www.developpement-durable.gouv.fr/Recherche-bio-inspiree.html> :  
 « ...**Les recherches présentées ont démontré la maturité scientifique croissante de cette approche, que le ministère envisage d'encourager** ... »

**Recherche bio-inspirée**  
 13 février 2013 - DÉVELOPPEMENT DURABLE

Une opportunité pour la transition écologique

L'organisation, le 10 décembre dernier, par le CGDD en partenariat avec le MNHN, d'un colloque sur le thème « recherches bio-inspirées : une opportunité pour la transition écologique ? », visait à réfléchir sur les apports possibles de la démarche bio-inspirée pour relever les multiples défis du développement durable et contribuer à terme aux orientations fixées par la conférence environnementale.

Avec 200 participants de tous horizons, chercheurs et doctorants, industriels, représentants d'associations et élus, cette initiative, dont l'ambition n'était évidemment pas de créer un nouveau champ disciplinaire, a rencontré un franc succès. Elle a en effet permis de conforter la pertinence d'un véritable décloisonnement des disciplines, et notamment de l'instauration d'un dialogue pérenne entre spécialistes du vivant, « technologues » et ingénieurs, pour placer l'observation des phénomènes naturels au cœur même de la pratique scientifique. Les actes du colloque seront prochainement mis en ligne.

Parmi les exemples porteurs d'applications, on peut citer la mise au point, dans les laboratoires du CNRS, de procédés originaux d'extraction de métaux par l'intermédiaire de plantes cultivées sur des sols pollués et de valorisation des composés métalliques extraits en catalyseurs pour la synthèse de molécules pharmaceutiques, comme les anti-paludéens. Les recherches présentées ont démontré la maturité scientifique croissante de cette approche, que le ministère envisage d'encourager dans trois directions : relayer auprès des organismes scientifiques et techniques placés sous sa tutelle l'intérêt et le potentiel des approches bio-inspirées dans ses domaines de compétences ; créer un prix pour les thèses portant sur ces sujets ; élaborer une feuille de route fixant les objectifs à atteindre et les moyens à mobiliser en vue d'une appropriation de la démarche par l'ensemble des services concernés\*\*.

- De nombreux articles de **presse** régionaux et nationaux ; après La Recherche, Biofutur, Plantes et Santé, Sciences et Avenir, Le Monde, The Guardian, Le Parisien, Marianne, le Midi-Libre, la Gazette, l'Aigualité,... Radio France International et Radio-France-Outre-Mer.
- Après cinq reportages télévisés sur **France 2** (2 reportages), **France 3**, **France 5** et **Arte**, les efforts seront poursuivis par la création d'un **parcours botanique et pédagogique** sur le site et la réalisation d'un grand reportage sur **Arte** avec le concours de **Baraka production** et de la direction de la communication de l'**Institut National de l'Écologie et de l'Environnement du CNRS**.



## Un projet réfléchi de parcours botanique



- ▶ En mai 2012, l'équipe du CEFE / CNRS et l'association des Ecologistes de l'Euzière ont élaboré un projet commun de réalisation de parcours botanique destiné à **valoriser le patrimoine naturel floristique du site**. Il sera mis en place après la réhabilitation du site

▶ [www.euziere.org](http://www.euziere.org) : Association Languedoc-Roussillon pour la diffusion de l'écologie scientifique

### - *La formation et l'enseignement partagé, un concept de développement durable*

Une des originalités du programme est le rapprochement de la chimie et de l'écologie. La sensibilisation et la formation des chercheurs du futur à ces grandes orientations sont également essentielles si l'on veut véritablement évoluer vers un concept de développement durable. Ainsi une expérience très réussie d'implications des étudiants de **la licence de Chimie de Montpellier 2** sur sites associant **des lycéens** gardois a été réalisée. Les étudiants ont eu la charge d'expliquer les finalités du projet aux lycéens proches du site minier (Le Vigan) lors de l'Année Internationale de la Chimie.





Le résumé du programme est résumé dans la

Collection "Références" du Commissariat général au développement durable  
Mai 2013

## Chimie éco-inspirée : la nature, des hommes, des solutions vertes

Claude GRISON, Université de Montpellier 2- CEFE CNRS

Le concept de chimie verte émerge à travers le Réseau international ECRA, une vision plus globale et élargie à la chimie durable, la réglementation chimique européenne REACH, le rapport du MEEDDM pour le 23 mars 2010 et place la chimie verte comme l'une des filières vertes d'avenir, l'élaboration d'un grand scénario de chimie écologique et durable par le Ministère de l'Industrie japonaise (le METI), sont les tenants d'une doctrine en pleine mutation. Au cours de France 2011 doctrine venue internationalisée de la chimie, la communauté scientifique a démontré qu'elle possédait les outils et la volonté de contribuer efficacement aux grands problèmes vus sur l'environnement, l'énergie, l'épuisement des ressources et la qualité de vie. Elle se propose notamment de contribuer efficacement à la réduction des déchets ou développement des technologies vertes innovantes de combustion durable, d'allongement de durée de vie, de réduction des quantités de remplissage et de désactivation des métaux précieux de la discipline. Un des piliers du concept de chimie verte est l'utilisation de systèmes catalytiques en remplacement de réactifs stoichiométriques. Un catalyseur de type non aqueux est fréquemment un métal de transition noble ou précieux, une terre rare. En février 2010, le rôle international de prospective et d'adaptation des Métaux Économiques a publié un rapport inspirant sur la criticité des ressources non renouvelables au titre des réserves ou de la consommation de la production sur quelques pays. L'accès aux métaux stratégiques et précieux est devenu crucial pour que les États disposent d'éléments critiques et sans pays qui sont détenus par un petit nombre de pays, souvent politiquement instables. Grâce au savoir des valeurs industrielles les métaux de transition tels que (Al, Pd, Ni, Zn, Cu, Co, Mn, Co, etc.) sont essentiels à de nombreuses transformations chimiques. Les domaines de la chimie organique industrielle, de la polymérisation, de l'hydrogénation, des polymères, des plastiques, des teintures, des colorants, des peintures, des cosmétiques et parfums, des dérivés pharmaceutiques et des médicaments sont tous concernés. Face à l'avancée chimique et politique de contrôle et de manipulation des prix des métaux précieux industriels l'Union européenne, et la France en particulier, doivent relever un défi majeur basé sur le développement de la compétence et l'innovation.

Le programme de recherche exposé ci-dessous totalement

dans ce cadre en proposant le développement venant d'une nouvelle filière verte durable basée sur le recyclage de ressources minérales. L'objectif principal est de développer à l'échelle internationale un procédé innovant de valorisation chimique des technologies de phytoextraction destinées à remédier à l'accumulation des espèces métalliques dans les sols contaminés aux exploitations minières intensives et aux activités industrielles métallurgiques.

Cette forte pollution des sols par les espèces métalliques est un problème très préoccupant car le sol est une des fonctions essentielles qui déterminent en grande partie la production des produits alimentaires et la qualité de l'eau. De plus les éléments traces métalliques (ou ETM) font partie des composés les plus toxiques et ne sont pas vraiment biodegradables.

Mis à part des conséquences environnementales, les risques sur la santé sont réels : les atteintes des systèmes nerveux, rénal, pulmonaire ou des tissus osseux ont déjà été constatés. Des complexes de problèmes préoccupants et de premier ordre de toxicologie ont été mis en évidence chez des enfants habitant à proximité d'anciennes sites minières français.

Les impacts spécifiques aux pollutions métalliques ne sont pas seulement d'ordre environnemental et médical ; ils affectent directement le développement économique et touristique des zones concernées. L'accumulation et l'enrichissement de zones contaminées ont été mis en place sur certains sites, mais ces techniques ne peuvent pas constituer des solutions satisfaisantes. Peu inspirées, mal adaptées elles sont coûteuses et ne résolvent rien.

Il y a quelques années, il a été découvert l'existence de plantes très capables de se développer sur des sols désertiques ou devenus phytotoxiques. Ces plantes ont développé progressivement des stratégies d'adaptation leur permettant de tolérer la pollution, voire d'extraire les éléments métalliques et de les stocker dans leurs parties aériennes comme pour mieux les protéger. Les quelques éléments métalliques trouvés dans les systèmes miniers peuvent atteindre des niveaux impressionnants (jusqu'à 70% en masse sèche). On parle alors de phytoextraction. Il s'agit d'une technique de dépollution naturelle et possible des sols et des solutions par accumulation des ETM dans les

parties aériennes des végétaux hyperaccumulants. Des études récentes d'évaluation des performances adaptatives de ces végétaux ont mis en évidence la présence d'espèces hyperaccumulantes de type légumineuses renforçant l'intérêt de la phytoextraction dans les programmes de restauration écologique. Des bactéries symbiotiques, éléments structuraux et spécifiques de ces sites pollués, sont devenues capables de supporter des conditions extrêmes. Elles se comportent comme de véritables usines chimiques en réduisant l'ajout présent dans l'air pour le transformer en engrais naturel afin d'aider les plantes à se développer. En échange, les plantes produisent par photosynthèse des nutriments organiques aux bactéries, dans un sol aseptique. Malgré l'étude et la compréhension de ces systèmes naturels ingénieux, le développement de la phytoextraction est resté limité par absence de valorisation de la biomasse accumulée. Elle a été considérée comme un déchet dangereux et sans intérêt.

Récemment, notre équipe a mis au point un procédé innovant de valorisation de ces plantes extrêmes. Elles sont à la base d'un nouveau domaine de la chimie verte, appelée catalyse écologique. Tirant parti de la capacité adaptative remarquable de ces végétaux à hyperaccumuler les cations  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  et/ou  $Cu^{2+}$ , la conception du programme repose sur l'utilisation directe des espèces métalliques d'origine végétale comme catalyseurs modèles de l'enton de réactions chimiques organiques. Le principe repose sur une approche mimant des catalyseurs naturels : les enzymes. Ils permettent d'accélérer des réactions chimiquement lentes et sont régénérés après transformation des molécules organiques. Les catalyseurs produits à partir des plantes hyperaccumulantes sont capables d'accélérer les réactions organiques et nous, que le mélange n'a jamais pu produire. Ces catalyseurs innovants montrent une efficacité tout à fait inhabituelle. Souvent supérieures aux catalyseurs classiques de la chimie, ils permettent la synthèse de molécules d'intérêt pharmaceutique, agents anticancéreux, molécules actives contre le métabolisme, armes

naturelles, cosmétiques, intermédiaires des de l'industrie chimique) dans des conditions douces et efficaces supérieures. Bon nombre de ces molécules préexistaient présentes dans la nature. Le chimiste n'est pas à l'origine de leur activité biologique ; il se contente de la révéler, d'essayer de la comprendre, de l'expliquer et de s'en inspirer. La synthèse de ces molécules permet en revanche de préserver les ressources naturelles.

La nature a donc trouvé des solutions pour s'adapter aux pollutions locales engendrées par les activités anthropiques : la phytoextraction. La découverte, la compréhension de ce système naturel est aujourd'hui à l'origine de vastes programmes de restauration écologique que nous développons sur de nombreux sites miniers (France, Nouvelle-Calédonie, Chine, ...). Elle permet également de développer des solutions innovantes pour le recyclage des ressources minérales et constitue une solution novatrice à la criticité des métaux précieux non renouvelables. Enfin, ces plantes permettent aujourd'hui de développer des catalyseurs chimiques aux performances égales.

L'ensemble du programme scientifique est réalisé en association étroite avec les acteurs locaux, issus des collectivités et des structures académiques. Il est également l'objet d'échanges de valorisation soutenues auprès de groupes industriels aux domaines d'applications complémentaires (écologie de la restauration, industries minière et chimique). Ce travail de recherche interdisciplinaire est totalement bio-inspiré. A finalité appliquée et industrielle, il entend être un moteur de la restauration environnementale et socio-économique de sites marqués par des activités industrielles et minières. Les performances de la nature sont uniques : adaptables aux conditions extrêmes et génératrices de systèmes chimiques précieux. Elle est une source d'inspiration multidisciplinaire, que le chimiste se doit de comprendre pour la restaurer et la révéler durablement. La nature est donc au cœur du point de départ d'une nouvelle filière verte à économie circulaire qui réconcilie l'écologie et la chimie.



Restoration verte des sols contaminés par phytoextraction, avec utilisation de catalyseurs innovants issus de la phytoextraction.

## 5- Publications et articles généraux

1. G. Losfeld, J.B. Saunier, C. Grison (2013) Minor and trace-elements in apiary products from a historical mining district (Les Malines, France), Food Chemistry, accepté le 27 août 2013.
2. J.B. Saunier, G. Losfeld, R. Freydier, C. Grison (2013) Trace elements biomonitoring in a historical mining district (*les Malines*, France), Chemosphere, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.024>
3. V. Escande, T. Olszewski, C. Grison (2013) Zn biosourced catalysts: an efficient way for the synthesis of under-exploited platform molecules from carbohydrates, Green Chemistry, article sur invitation
4. V. Escande, T. Olszewski, C. Grison (2013) Preparation of ecological catalysts derived from Zn hyperaccumulating plants and their catalytic activity in Diels-Alder reaction, Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences, article sur invitation
5. C. M. Grison, B.-L. Renard, C. Grison (2013) A simple synthesis of 2-keto-3-deoxy-D-erythro-hexosonic acid isopropyl ester, a key sugar for the bacterial population living under metallic stress Bioorganic Chemistry, soumis.
6. C.M. Grison, V. Escande, E. Petit, L. Garoux, C. Boulanger, C. Grison (2013) *Psychotria douarrei*, an exceptional metallophyte for a precious chemical resource, RCS Advances, accepté le 14 août 2013
7. A. Pierault, C. Grison (2013) Ces plantes qui dépolluent le sol, le magazine universitaire au coeur de la science, UM2, 6, 14-15.
7. Grison C.M., Jackson S., Petit E., Dobson A., Grison C., (2013) *Rhizobium metallidurans* sp nov, a symbiotic heavy metal resistant bacterium isolated from the *Anthyllis vulneraria* Zn-hyperaccumulator, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, en révision.
8. Escande V, Petit E., Olszewski T., Grison C., (2013), Ecological catalyst from Zn Metallophyte: Performance in catalyzed Diels-Alder reaction and attempts on an asymmetric catalysis, Comptes-rendus de l'Académie des Sciences, Prix de la meilleure communication, sous presse.
9. Grison C., Bes C. (2013) Le développement durable à découvert, Incidences des activités humaines sur les milieux, Editions CNRS, sous presse.
10. Escande V, Garoux L., Grison C. M., Thillier Y., Debart F., Vasseur J.J., Boulanger C., Grison C., (2013) Ecological catalysis and phytoextraction: symbiosis for future, Applied Catalysis B. sous presse.
11. Thillier Y., Losfeld G., Escande V, Dupouy C., Vasseur J-J., Debart F., Grison C., (2013) Solid-phase synthesis of 5'-capped RNA with polymetallic catalysts prepared from metallophytes species, RCS Advances, 3 (15), 5204-5212.
12. Grison C. Plantes et Santé, (2013) 134, 19-20.
13. Losfeld G., Vidal de la Blache P., Escande V., Jaffre T., L'Huillier L., Grison C. (2012) The chemical exploitation of nickel phytoextraction: an environmental, ecologic and economic opportunity for New Caledonia Chemosphere, 89 (7), 907-910.
14. Losfeld G., Vidal de la Blache P., Escande V., Grison C. (2012), Design and performance of supported Lewis acid catalysts derived from metal contaminated biomass for Friedel-Crafts alkylation and acylation Catalysis Today, 189 (1), 111-116.
15. Losfeld G., Vidal de la Blache P., Escande V., Grison C. (2012), Lewis acid catalysts: a potential exploitation for zinc and nickel phytoextraction WIT Transactions on Ecology and the Environment 162, 563-575.

16. Losfeld G., Vidal de la Blache P., Escande V., Grison C. (2012), Zinc hyperaccumulating plants as renewable resources for the chlorination process of alcohols *Green Chemistry Letters and Reviews*, 5 (3), 451-456.
17. Grison C. (2012), *Les Phytotechnologies appliquées aux Sites et Sols Pollués*, Ed. ADEME, 38-40.
18. Grison C., Escande V., Plantes hyperaccumulatrices de manganèse, sources de catalyseurs et réactifs de synthèse organique Brevet n° INPI 1000157898, déposé le 21 juillet 2012.
19. Grison C., Escande V., Losfeld G., Utilisation de certaines plantes accumulatrices de métaux pour la mise en œuvre de réactions chimiques Brevet n° INPI 1000142593, déposé le 6 mars 2012.
20. Grison C. Métaux lourds et chimie verte (2012), *La Recherche*, Avril ; lauréate du *Prix « la Recherche », catégorie Environnement 2011*.
21. Grison C., Petit H. (2011), *Dépolluer par les plantes, un procédé économiquement viable Biofutur*, 326, 54-55.
22. Losfeld G, Escande V., Mathieur T. Grison C. Phytoextraction et biodégradation dynamisée : une approche interdisciplinaire inventive au service de l'environnement. *Techniques de l'Ingénieur*, 2011, IN 135, 1-8.
23. Grison C., Losfeld G., Escande V. Les plantes métallicolles, tolérantes aux métaux lourds In: *Stratégies végétales : petits arrangements et grandes manœuvres* (Garrone B., Martin P., Schatz B. & Les Ecologistes de l'Euzière, Eds.), Editions Ecologistes de l'Euzière, Prades-le-Lez, 2011, 152-153.
24. Grison C., Escarré J., Berthomme M.L., Couhet-guichot J., Hosy F., Grison C., *Thlaspi caerulescens*, un indicateur de la pollution d'un sol ? Une réflexion partagée entre étudiants et chercheurs autour d'un problème environnemental. *Actualité Chimique*, 2010, 340, 27-32.
25. Grison C *Eco-dialogues du Vigan : Claude Grison et la chimie verte. Dépollution écologique du site de Saint-Laurent-Le-Minier. L'Aigoualité*, 2010, 17, 12-17 : *Prix « Ecoactions » 2010* avec la Mairie de Saint-Laurent-Le-Minier.
26. Grison C. Quand la dépollution devient productive. *InfoChimie Magazine* 2009, 496, 34-36 ; lauréate du *Prix « Technologies Innovantes pour l'Environnement »* décerné par Pollutec – ADEME 2009
27. Grison C .Valorisation à valeur ajoutée pour les métaux piégés par phytoremédiation. *Green News Techno* 2009, 38, 7

## Brevets

- 1- Use of metal-accumulating plants for the preparation of catalysts that can be used in chemical reactions - PCT Int. Appl. (2011) WO 2011064487 - C. Grison, J. Escarre
- 2- Use of metal-accumulating plants for the preparation of catalysts that can be used in chemical reactions - PCT Int. Appl. (2011), WO 2011064462 - C. Grison, J. Escarre
- 3- Utilisation de certaines plantes accumulatrices de métaux pour la mise en œuvre de réactions chimiques, Brevet n° INPI 1000142593, déposé le 6 mars 2012 - C. Grison, V. Escande
- 4- Plantes hyperaccumulatrices de manganèse, sources de catalyseurs et réactifs de synthèse organique, Brevet n° INPI 1000157898, déposé le 21 juillet 2012 - C. Grison, V. Escande
- 5- Use of particular nickel-accumulating plants for implementing chemical reactions, Brevet européen n° INPI 13 305208.4, déposé le 22 février 2013 - C. Grison, V. Escande

6- Utilisation de certaines plantes accumulatrices de métaux pour la mise en œuvre de réactions de chimie organique, PCT/FR2013/050470, déposé le 5 mars 2013 - C. Grison, V. Escande

7- Utilisation de certaines plantes accumulatrices de platinoïdes pour la mise en œuvre de réactions de chimie organique, n°INPI FR13/56964, déposé le 15 juillet 2013 - C. Grison, V. Escande, B-L. Renard, C. Bes

8- Plantes hyperaccumulatrices de manganèse, sources de catalyseurs et réactifs de synthèse organique, Brevet PCT/FR2013/051772 déposé le 23 juillet 2013 - C. Grison, V. Escande

9- Use of particular nickel accumulating plants for implementing chemical reactions, Brevet européen n° INPI 13 290 184-4, déposé le 1er août 2013 - C. Grison, V. Escande

## 6- Conclusion générale

Les résultats obtenus permettent de proposer un plan de gestion du site des Avinières basé sur la réhabilitation à grande échelle du site par une technique naturelle, la phytoextraction. Elle concerne l'ensemble des zones plates fortement et moyennement contaminées. Le développement des activités de réhabilitation écologique est soutenu par la première valorisation des déchets métalliques dérivés de plantes issues de la phytoextraction en chimie écologique. Les résultats obtenus à ce jour montrent que les catalyseurs écologiques issus de plantes hyperaccumulatrices d'ETM sont très efficaces dans de nombreuses réactions chimiques et se prêtent à de nombreuses applications industrielles recherchées.

**Les résultats obtenus sont un fort encouragement au développement de la phytoextraction, de la réhabilitation écologique des sols pollués par les ETM, et au développement d'une activité post-mine conciliant reconstruction sociale et maîtrise des risques environnementaux. Une activité industrielle doit démarrer à l'automne 2013 sur ce programme. Le CNRS doit être impliqué dans le développement de la société.**

En résumé, les objectifs ont été et resteront les suivants :

- **Restaurer de façon naturelle** le site miniers des Avinières avec la participation active de la population locale, de ses représentants, et de chercheurs appartenant à une structure CNRS pluridisciplinaire spécialisée en Ecologie qui a choisi d'accompagner le transfert des technologies étudiées vers une activité industrielle. Cette dernière est force motrice pour le programme.
- **Réhabiliter les sols pollués du site** à l'aide de plantes adaptées (réduction de l'érosion éolienne à partir des sols contaminés).
- **Dépolluer** partiellement et progressivement des sols contaminés grâce à des plantes hyperaccumulatrices de métaux lourds.
- **S'inscrire en tout point dans les objectifs de l'ADEME** en matière de maîtrise des risques et gestion du site des Avinières de la commune de Saint-Laurent-Le-Minier.
- **Protéger, développer et valoriser** un site communal renfermant une biodiversité exceptionnelle.
- **Valoriser économiquement** la biomasse issue des plantes hyperaccumulatrices, fournissant des catalyseurs chimiques utiles à l'industrie, selon des principes de « chimie verte » et donc éco-responsable.

**Le développement de ce dernier objectif conditionnera la faisabilité et la durabilité des précédents.**



