



UNIVERSITE SULTAN MOULAY SLIMANE  
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUE  
BENI MELLAL



N° d'ordre : 64/2014

**Centre d'Etudes Doctorales : Sciences et Techniques**  
**Formation Doctorale : Ressources Naturelles, Environnement et Santé**

## **THÈSE**

**Présentée par**

**Mohamed NOURI**

**pour obtenir le grade de**

**DOCTEUR**

**Spécialité : Génétique et Biotechnologie végétale**

### **Contribution à l'étude de la capacité de quelques plantes et bactéries à la remédiation des sols contaminés par les métaux lourds du site d'Ait Ammar**

---

Soutenue publiquement le 20 Décembre 2014 devant le jury composé de:

Pr. Zehor AIT YACINE	Faculté des Sciences et Techniques, Beni Mellal	<b>Président</b>
Pr. Mohamed KAMAL	Faculté des Sciences et Techniques, Beni Mellal	<b>Rapporteur</b>
Pr. Cherki GHOULAM	Faculté des Sciences et Techniques Guéliz, Marrakech	<b>Rapporteur</b>
Pr. Mustapha BARAKATE	Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech	<b>Rapporteur</b>
Pr. Ahmed AIT CHAOUI	Faculté des Sciences et Techniques, Beni Mellal	<b>Examineur</b>
Pr. Abdelmajid HADDIOUI	Faculté des Sciences et Techniques, Beni Mellal	<b>Directeur de thèse</b>

## Remerciements

En préambule à ce manuscrit, je souhaiterais adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et leur soutien durant toutes ces années.

Ce travail m'a donné l'opportunité de tisser des liens avec plusieurs chercheurs. Pour cela et en premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, le professeur HADDIOUI Abdelmajid, qui a bien su me guider dans mes travaux, tout en me laissant la liberté d'explorer les voies qui me passionnent, je te remercie de m'avoir ouvert les portes de ton équipe, de m'avoir donné une chance de pouvoir travailler dans le domaine de la génétique et la biotechnologie, ainsi que ta confiance.

Par la suite je souhaite remercier PEREIRA Ruth, GONÇALVES Fernando, MARQUES Catarina, Inès, Ana Luiza et Marcia de l'équipe de l'écotoxicologie; MENDO Sonia, LOURENÇO Joana, CRUZ Andreia, Catia et toutes les personnes de l'équipe du laboratoire de biotechnologie moléculaire et GOMES Newton et Ana Cecilia de l'équipe l'écologie marine et estuarienne, je vous remercie pour votre bonne humeur et la bonne ambiance apportée au sein de l'équipe, des qualités très appréciables au quotidien. Merci également pour ces bons moments de discussions scientifiques et autres. Cela fut un réel plaisir de travailler avec vous.

J'aimerais remercier les membres du jury, président, rapporteurs et examinateur, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de bien vouloir évaluer et examiner mon travail de thèse. Je vous remercie tous de répondre présents aujourd'hui. Je remercie également tous les partenaires qui ont travaillé autour: «*Remediation Processes in Uranium and other Mining Exploration areas*» (Ref. SfP.983311). Je remercie tous les membres de l'Organisation du Traité Atlantique Nord (OTAN) qui m'ont accordé le soutien financier nécessaire pour mes missions au Portugal.

Je ne peux également oublier de remercier toutes les personnes de notre laboratoire «de Gestion et Valorisation des Ressources Naturelles» et surtout de notre équipe «Génétique et Biotechnologie végétale»: HAMMADA Soumaya pour son aide pour l'identification des plantes, HAMAMA Latifa et EL HANSALI Mohammed, ainsi que Mahmoud, Hasna, Taoufik, Amine et tous ceux que je ne cite ici, avec qui j'ai partagé également d'excellents moments.

Je remercie également tous ceux qui ont participé de près ou d'un peu plus loin à la concrétisation de la thèse dans les cinq labos, notre laboratoire de Gestion et Valorisation des Ressources Naturelles (FST Beni Mellal), le laboratoire Eaux, Energie & Environnement de l'ENIS (Sfax, Tunisie), le Centre des Etudes Environnementales et Maritimes (CESAM) de l'Université d'Aveiro (Portugal), l'Institut de recherche marine (RAMI-CMA) de l'Université de Coimbra (Portugal) et le laboratoire d'Ecotoxicologie de l'institut ECT Oekotoxikologie GmbH (Florsheim, Allemagne), merci pour un coup de main, mais aussi pour l'ambiance chaleureuse.

Merci à ma famille, sans qui je n'aurai pas réalisé cette thèse, en particulier à Maman et à la mémoire de mon père, je vous dois tout, merci pour votre amour, votre dévouement et vos précieux conseils. Cette thèse est l'aboutissement de ce que vous m'avez toujours appris: savoir se battre et persévérer permet de réaliser nos vœux les plus chers. Merci à mes frères et ma sœur pour leur soutien, j'espère que cette thèse vous donnera la force et le courage nécessaires pour affronter vos études supérieures...

Enfin je souhaite remercier mon épouse qui m'a encouragé, soutenu et aidé pendant ces deux dernières années de doctorat.

Et c'est ainsi que s'achève ce long voyage semé de connaissances, de rencontres, parfois d'embûches mais également de découvertes diverses et de richesses intérieures...

*À ceux qui ne sont plus là aujourd'hui mais que je n'oublie jamais*

## FICHE PRESENTATIVE DE LA THESE

**Nom et prénom de l'auteur :** NOURI Mohamed

**Intitulé du travail :**

Etude de la phytoremédiation des sols contaminés par des métaux lourds par l'utilisation des plantes et micro-organismes hyperaccumulateurs.

**Encadrant :** HADDIOUI Abdelmajid, PES, Laboratoire de génétique et Biotéchnologie Végétale, Faculté des Sciences et Techniques Beni Mellal, Université Sultan Moulay Slimane, Maroc.

**Lieux de réalisation des travaux :**

- ❖ Laboratoire de Gestion et Valorisation des Ressources Naturelles, Faculté des Sciences et Techniques Beni Mellal, Université Sultan Moulay Slimane, Maroc.
- ❖ Laboratoire de l'Ecotoxicologie, Centre des Etudes Environnementales et Maritimes (CESAM), l'Université d'Aveiro, Portugal.
- ❖ Laboratoire de biotechnologie moléculaire, Centre des Etudes Environnementales et Maritimes (CESAM), l'Université d'Aveiro, Portugal.
- ❖ Laboratoire de l'écologie marine et estuarienne, Centre des Etudes Environnementales et Maritimes (CESAM), l'Université d'Aveiro, Portugal.
- ❖ L'Institut de recherche marine (RAMI-CMA), l'Université de Coimbra, Portugal.

**Rapporteurs autres que l'encadrant :**

Pr. AIT YACINE Z.	Faculté des Sciences et Techniques, Beni Mellal
Pr. KAMAL M.	Faculté des Sciences et Techniques, Beni Mellal
Pr. GHOULAM C.	Faculté des Sciences et Techniques Guéliz, Marrakech
Pr. BARAKATE M.	Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech
Pr. AIT CHAOUI A.	Faculté des Sciences et Techniques, Beni Mellal

**Période de réalisation du travail de thèse :** Janvier 2010 - Juin 2014

**Cadre de coopération-soutien financier :** Programme Scientifique pour la Paix (Réf. Sfp.983311), financée par l'Organisation du Traité de l'Atlantique Nord (OTAN).

**Ce travail a donné lieu aux résultats suivants :**

**Publications**

NOURI M., GONÇALVES F., J. SOUSA P., RÖMBKE J., KSIBI M., PEREIRA R., HADDIOUI A. Metal concentrations and metal mobility in Ait Amar Moroccan mining site. *Journal of Materials and Environmental Science*, 2014, 5 (1), pp. 271-280.

NOURI M., GONÇALVES F., J. SOUSA P., RÖMBKE J., KSIBI M., PEREIRA R., HADDIOUI A. Metal Uptake by Spontaneous Vegetation in an abandoned iron mine from a Semiarid Area in Center Morocco: Implications for Phytoextraction. *Environmental Research, Engineering and Management*, 2013, 64(2), pp. 59-71.

HADDIOUI A., ZINELABIDINE L.H., **NOURI M.**, AJAL A., EL HANSALI M. and HANINE H. Genetic Diversity of Natural Populations of *Medicago truncatula* in Morocco Using Isozyme Polymorphism. *World Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 8(1): 13-19.

**NOURI M.**, MARQUES C., NOGUEIRA V., PEREIRA C., GONÇALVES F., J. SOUSA P., RÖMBKE J., KSIBI M., PEREIRA R., HADDIOUI A. Diversity of Soil Microbial Communities from Iron Mining Area (Oued Zem, Morocco). (Soumis au *International Journal of Mining, Reclamation and Environment*).

**NOURI M.**, GONÇALVES F., J. SOUSA P., RÖMBKE J., KSIBI M., PEREIRA R., HADDIOUI A. Contribution à la réhabilitation des écosystèmes métallifères par l'utilisation de certaines plantes endémiques. (Soumis à l'institut scientifique de Rabat).

### Articles en préparation

**NOURI M.**, MARQUES C., MENDO S., GONÇALVES F., J. SOUSA P., RÖMBKE J., KSIBI M., PEREIRA R., HADDIOUI A. Analysis of culturable bacterial communities in iron mine soils (Oued Zem, Morocco).

**NOURI M.**, MARQUES C., GONÇALVES F., J. SOUSA P., RÖMBKE J., KSIBI M., PEREIRA R., HADDIOUI A. Réhabilitation des écosystèmes métallifères par: 2-Bioremediation.

### Participation aux congrès

**NOURI M.**, HADDIOUI A., GONÇALVES F., SOUSA J.P., RÖMBKE J., KSIBI M., PEREIRA R. Phytoremédiation: procédés biotechnologiques utilisant les plantes. *Journées Doctoriales FST Béni Mellal. 10-11 Juin 2014, Béni Mellal.* Poster

**NOURI M.**, HADDIOUI A., GONÇALVES F., SOUSA J.P., RÖMBKE J., KSIBI M., PEREIRA R. Tolerance and accumulation of heavy metals by spontaneous vegetation of mineral soils: towards new methods of bioremediation. *Workshop international "MEKNES PSB 2014". 5 Juin 2014, Meknès.* Poster

**NOURI M.**, HADDIOUI A., GONÇALVES F., SOUSA J.P., RÖMBKE J., KSIBI M., PEREIRA R. Vers la Phytoremédiation des explorations minières : cas de la mine d'Ait Amar (Oued Zem, Maroc). *3<sup>ème</sup> colloque International Matériaux, Pollution et Environnement. 19-20 Février 2014, Tanger.* Orale

**NOURI M.**, HADDIOUI A., GONÇALVES F., SOUSA J.P., RÖMBKE J., KSIBI M., PEREIRA R. Diversité métabolique des micro-organismes présents dans le sol de mine de fer (Oued Zem, Maroc). *3<sup>ème</sup> colloque International Matériaux, Pollution et Environnement. 19-20 Février 2014, Tanger.* Poster

**NOURI M.**, MARQUES C., GONÇALVES F., SOUSA J.P., RÖMBKE J., KSIBI M., PEREIRA R., HADDIOUI A. Application de DGGE pour la détection de changement dans la diversité des communautés microbiennes dans le site minier de fer d'Ait Amar. *4<sup>ème</sup> édition du*

*congrès international: Eau, Déchets et Environnement. 18- 20 Décembre 2013, Agadir.*

Poster

**NOURI M., MARQUES C., GONÇALVES F., SOUSA J.P., RÖMBKE J., KSIBI M., PEREIRA R., HADDIOUI A.** La diversité microbienne du sol du site minier de fer d'Ait Amar (Oued Zem). *4<sup>ème</sup> édition du congrès international: Eau, Déchets et Environnement. 18-20 Décembre 2013, Agadir.* Poster

**NOURI M., HADDIOUI A., GONÇALVES F., SOUSA J.P., RÖMBKE J., KSIBI M., PEREIRA R.** Exploring the Microorganisms Present in the iron mining soils (Oued Zem, Morocco). *5<sup>ème</sup> Rencontre Nationale Gestion et Protection de l'Environnement G-ENVIRON-5. 28 Mai 2013, Casablanca.* Poster

**NOURI M., HADDIOUI A., GONÇALVES F., SOUSA J.P., RÖMBKE J., KSIBI M., PEREIRA R.** Application of DGGE fingerprinting for detection of shift in microbial community diversity in iron mining site. *The Second Edition of the International Congress: «Microbial Biotechnology for Development. 02-04 October 2012, Marrakech.* Poster

**NOURI M., HADDIOUI A., GONÇALVES F., SOUSA J.P., RÖMBKE J., KSIBI M., and PEREIRA R.** Phytoremediation of metal-polluted soils: screening for new accumulator plants in iron mine (Morocco). *Symposium international de chimie hétérocyclique (SICH 2011). 26-29 Octobre 2011, Fès.* Poster

**NOURI M., HADDIOUI A., GONÇALVES F., SOUSA J.P., RÖMBKE J., KSIBI M., PEREIRA R.** Metal concentrations and metal mobility in Ait Amar Moroccan mining site. *3<sup>ème</sup> congrès international Eau, Déchets et Environnement (EDE 3). 21-22 Novembre 2011, Fès.* Orale

**NOURI M., PEREIRA R., GONÇALVES F., SOUSA J.P., RÖMBKE J., KSIBI M. & HADDIOUI A.** Metal uptake by spontaneous vegetation in a mine from a semiarid area in center Morocco: implication for phytoextraction. *Colloque international Journées des Géosciences de l'Environnement. 21-23 Juin 2011, Oujda.* Poster

**NOURI M., PEREIRA R., MARQUES C., GONÇALVES F., SOUSA J.P., RÖMBKE J., KSIBI M., HADDIOUI A.** Soil characteristics, metal contamination and vegetation survey at a Moroccan mining site: Implications for risk assessment. *Troisième Congrès International Amélioration de la production Agricole. 17-18 Mars 2010, Settat.* Poster

## Table des matières

Remerciements.....	I
<b>FICHE PRESENTATIVE DE LA THESE.....</b>	<b>II</b>
Table des matières.....	V
Liste des abréviations.....	IX
Résumé.....	XI
Summary .....	XII
المخلص.....	XIII
Introduction.....	1
<u>CHAPITRE I. Synthèse bibliographique</u>	
<b>I. Les polluants métalliques dans les sols et leurs mobilités.....</b>	<b>4</b>
<b>1. Origine des éléments traces métalliques dans le sol.....</b>	<b>4</b>
<b>2. Mobilité des polluants métalliques dans les sols.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Constituants des sols impliqués dans la mobilité des éléments métalliques.....</b>	<b>5</b>
2.1.1. Les minéraux primaires.....	5
2.1.2. Les minéraux secondaires.....	5
a. Les argiles.....	5
b. Les oxydes et hydroxydes.....	5
c. Les carbonates, phosphates, sulfates, sulfures et chlorures.....	6
2.1.3. La matière organique.....	6
<b>2.2. Phénomène de sorption des éléments métalliques dans les sols.....</b>	<b>7</b>
2.2.1. La physisorption: une adsorption non spécifique.....	7
2.2.2. La chimisorption: une adsorption spécifique.....	7
<b>2.3. Facteurs modifiant la mobilité des éléments métalliques.....</b>	<b>7</b>
2.3.1. Le pH.....	7
2.3.2. Le potentiel redox.....	8
2.3.3. L'activité biologique.....	8
2.3.4. La température.....	9
<b>2.4. Estimation de la mobilité des polluants métalliques.....</b>	<b>9</b>
<b>3. Le fer : un oligo-élément essentiel pour les plantes et les micro-organismes .....</b>	<b>10</b>
<b>3.1. Du sol à la plante : trajets et fonctions du fer.....</b>	<b>10</b>
3.1.1. Biodisponibilité du fer dans les sols : Rôle majeur des activités microbiennes	10
3.1.2. Prélèvement du fer dans le sol par les graminées et les non graminées.....	11
<b>3.2. Quelques propriétés du sol en relation avec le fer.....</b>	<b>12</b>
<b>3.3. Formation des gisements de fer.....</b>	<b>12</b>
<b>3.4. Gisement ferrifère d'Ait Ammar.....</b>	<b>13</b>
<b>II. Trésor minéral et biodiversité bactérienne.....</b>	<b>13</b>
<b>1. L'environnement sol : un réservoir de diversité microbienne.....</b>	<b>13</b>
<b>2. Influence des bactéries sur la transformation des éléments métalliques.....</b>	<b>13</b>
2.1. Les mécanismes entraînant la mobilisation des métaux.....	15
2.2. Les mécanismes entraînant l'immobilisation des métaux.....	16
<b>3. Les marqueurs moléculaires.....</b>	<b>17</b>
<b>4. Outils de caractérisation de la population bactérienne.....</b>	<b>18</b>
4.1. Les activités métaboliques.....	18
4.2. Diversité bactérienne : Etude de la structure génétique des bactéries.....	18
4.3. Apport des nouvelles technologies à haut débit.....	21
4.3.1. Séquençage.....	21
4.3.2. Applications et impact des différentes techniques de séquençage dans l'étude de la diversité microbienne des sols.....	22
4.3.3. Identification et taxonomie.....	23
4.3.4. Analyse phylogénétique.....	23
4.4. Méthodes culture dépendante et culture indépendante.....	24

<b>III. Trésor minéral et biodiversité végétale.....</b>	<b>24</b>
1. L'originalité botanique des sites métallifères.....	24
2. Mécanismes de transfert des éléments traces métalliques dans les plantes.....	25
2.1. Absorption foliaire.....	25
2.2. Adsorption racinaire.....	25
2.3. Absorption racinaire.....	26
2.4. Translocation des éléments traces métalliques des racines vers les parties aériennes.....	26
3. Les effets délétères des éléments en traces métalliques.....	27
4. Les mécanismes de réponse au stress métallique.....	28
5. Adaptation aux métaux lourds et espèces métallophytes.....	29
6. Une biodiversité menacée.....	31
7. Particularités de la biologie de la conservation des métallophytes.....	32
<b>IV. Les techniques de dépollution.....</b>	<b>32</b>
1. Les différentes méthodes de dépollution.....	32
1.1. Les procédés physico-chimiques.....	33
1.2. Les traitements thermiques.....	34
1.3. Les méthodes de confinement.....	34
2. Réhabilitation des écosystèmes métallifères par phytoremédiation et bioremédiation	34
2.1. Techniques de phytoremédiation.....	34
2.2. Techniques de bioremédiation.....	36
2.3. Techniques innovantes.....	37
2.3.1. couplage bioremédiation (rhizosphère) / phytoremédiation.....	37
2.3.2. Couplage bioaugmentation / phytoremédiation.....	37
2.3.3. Couplage phytoextraction / valorisation énergétique de la biomasse.....	38
2.3.4. Système de phytoremédiation multiprocess.....	38
2.4. D'autres techniques, déjà anciennes, évoluent peu.....	38
<b>V. Choix méthodologiques.....</b>	<b>39</b>
<u>Chapitre II. Matériels &amp; Méthodes</u>	
<b>I. Site étudié.....</b>	<b>41</b>
<b>II. Protocole d'échantillonnage.....</b>	<b>42</b>
<b>III. Descriptif des analyses physicochimiques.....</b>	<b>44</b>
1. Granulométrie.....	45
2. Analyse de la teneur en eau.....	45
3. Mesure du $pH_{eau}$ , $pH_{KCl}$ et de la conductivité électrique.....	45
4. Dosage du carbone organique total (COT).....	46
5. Dosage de l'azote total: Méthode Kjeldahl.....	46
6. Les concentrations métallique et du phosphore: totale et biodisponible.....	46
<b>IV. Analyses biologiques.....</b>	<b>47</b>
1. Techniques microbiologique.....	47
1.1. Diversité métabolique : <i>BIOLOG<sup>®</sup> EcoPlaque</i> .....	47
1.2. Test de toxicité du <i>Vibrio fischeri</i> : <i>Microtox<sup>®</sup></i> .....	48
2. Techniques de biologie moléculaire.....	48
2.1. <i>PCR-DGGE</i> .....	48
a. Extraction d'ADN.....	49
b. Amplification de l'ADN par PCR.....	49
c. Analyse de la diversité bactérienne par DGGE.....	50
d. Interprétation des gels DGGE.....	50
e. Traitement des données.....	51
<b>V. Les plantes.....</b>	<b>52</b>
1. Les analyses physicochimiques: Concentrations totales des métaux et du phosphore	54
2. Analyses biologiques.....	54

2.1. <b>Techniques microbiologique</b> .....	54
2.1.1. <i>Isolement des bactéries rhizosoplans</i> .....	54
2.1.2. <i>Isolement des bactéries endophytes</i> .....	54
2.1.3. <i>Purification et stockage des bactéries</i> .....	55
2.1.4. <i>Isolement de bactéries résistantes aux différents métaux</i> .....	55
a. <i>La croissance des bactéries isolées pour les tests de résistance</i> .....	55
✓ <i>Dans un bouillon nutritif (ou TSB)</i> .....	55
✓ <i>Dans des plaques de TSA</i> .....	55
b. <i>Méthodologie pour tester la résistance de bactéries au métal</i> .....	56
2.2. <b>Techniques de la biologie moléculaire</b> .....	57
2.2.1. <i>Extraction de l'ADN total à partir des isolats bactériens</i> .....	57
2.2.2. <i>ERIC PCR</i> .....	57
2.2.3. <i>BOX PCR</i> .....	58
2.2.4. <i>Le séquençage de l'ADN 16S de bactéries cultivables</i> .....	59
2.2.5. <i>Identification des bactéries par séquençage</i> .....	59
<b>VI. Traitement de données et analyse statistique</b> .....	59
1. <b>Tests paramétriques</b> .....	59
2. <b>Tests non paramétriques</b> .....	59
3. <b>Statistique Descriptive Multidimensionnelle</b> .....	59
3.1. <i>Analyse par réduction des dimensions</i> .....	59
3.2. <i>Le positionnement multidimensionnel</i> .....	60
3.3. <i>Analyse par classification hiérarchique</i> .....	60
4. <b>Les facteurs de bioconcentration et de transfert</b> .....	61
5. <b>Indices de diversité</b> .....	61
<b>Chapitre III. Résultats &amp; Discussion</b>	
<b>I. Caractérisation physicochimique et minéralogique du site étudié</b> .....	62
1. <b>Contexte et objectifs</b> .....	62
2. <b>Caractérisation des sols étudiés</b> .....	62
2.1. <b>Caractérisation physicochimique</b> .....	62
2.1.1. <i>Les caractéristiques physicochimiques, changeaient-elles en fonction de la distance ou la direction par rapport du gisement?</i> .....	63
2.2. <b>Caractérisation minéralogique</b> .....	65
2.2.1. <i>Concentrations totales de métaux dans les échantillons de sol</i> .....	65
2.2.2. <i>Les caractéristiques minéralogiques totales, changeaient-elles en fonction de la distance ou la direction par rapport du gisement</i> .....	66
2.2.3. <i>Mobilité et biodisponibilité des métaux</i> .....	68
2.2.4. <i>Les caractéristiques minéralogiques biodisponibles, changeaient-elles en fonction de la distance ou la direction par rapport du gisement</i> .....	70
2.3. <b>Analyses multivariées</b> .....	71
2.3.1. <i>Les corrélations entre les propriétés chimiques</i> .....	71
2.3.2. <i>Analyse en composantes principales des paramètres mesurés pour la description du sol étudié</i> .....	73
3. <b>Discussion</b> .....	76
3.1. <b>Caractérisation physicochimique</b> .....	76
3.2. <b>Caractérisation minéralogique</b> .....	77
4. <b>Conclusion</b> .....	78
<b>II. Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des sols miniers: vers de nouvelles méthodes de bio-dépollution</b> .....	80
1. <b>Contexte et objectifs</b> .....	80
2. <b>Interactions sol-métal-plante</b> .....	80
3. <b>Adéquation de la végétation spontanée étudiée pour la phytoremédiation</b> .....	83
3.1. <b>Effet sur la translocation</b> .....	83



3.2. Effet sur la bioaccumulation.....	84
4. Discussion.....	86
4.1. Interactions sol-métal-plante.....	86
4.2. Adéquation de la végétation spontanée étudiée pour la phytoremédiation.....	88
5. Conclusion.....	89
<b>III. Diversité structurelle et fonctionnelle des communautés bactériennes isolées de sols de mine d'Ait Ammar.....</b>	<b>90</b>
1. Contexte et objectifs.....	90
2. Interactions sol-métal-bactérie.....	90
2.1. Diversité structurelle.....	90
2.2. Diversité métabolique.....	95
2.2.1. Evolution des valeurs d'AWCD en fonction du temps d'inoculation.....	95
2.2.2. Activité totale et AWCD.....	96
2.2.3. Capacités de dégradation et les indices de diversité.....	97
2.2.4. Activités par catégories biochimiques.....	99
2.2.5. Classification des sols suivant leur AWCD.....	101
2.2.6. Analyse en composante principale des CLPP.....	101
2.3. Test de toxicité Microtox®.....	104
3. Les métaux lourds, dans notre cas le Cd, Cr, Cu, Zn et Pb en présence du fer et du phosphore, ont-ils une influence sur la bactérie bioremédiatrice?.....	105
4. Discussion.....	107
4.1. Diversité métabolique.....	107
4.2. Etude de la toxicité aigüe.....	107
4.3. Diversité structurelle.....	108
5. Conclusion.....	110
<b>IV. Isolement et identification des bactéries tolérantes (rhizoplanes et endophytes): rôle possible dans la bioremédiation.....</b>	<b>111</b>
1. Contexte et objectifs.....	111
2. Approches d'études des bactéries rhizoplanes et endophytes.....	111
2.1. Les approches phénotypiques.....	111
2.1.1. Résistance intrinsèque aux métaux lourds .....	112
2.2. Les approches moléculaires.....	112
2.2.1. La PCR des séquences répétées .....	112
2.2.2. Diversité génétique des isolats endophytes via ERIC et BOX.....	113
2.2.3. Identification des espèces bactériennes par séquençage.....	114
3. Conclusion.....	116
<b>CHAPITRE IV : Conclusions Générales &amp; Perspectives</b>	
<b>I. CONCLUSIONS GENERALES.....</b>	<b>117</b>
<b>II. PERSPECTIVES.....</b>	<b>120</b>
Références bibliographiques.....	122
Annexes	

**Liste des abréviations**

ACP: Analyse en Composante Principale  
ADN (r): Acide désoxyribonucléique (ribosomal)  
ANOSIM: Analyse de similarité  
ANOVA: Analyse de variances  
APS: Ammonium PerSulfate  
ARN(m): Acide ribonucléique (messenger)  
ARN(r): Acide ribonucléique (ribosomique)  
AWCD: l'activité métabolique moyenne des bactéries cultivables  
BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*  
BRPM: Bureau de recherches et de Participations Minières  
BSA: Albumine de sérum bovin  
BSPT: Test basique en phase solide  
CaCl<sub>2</sub>: chlorure de calcium  
Cd: Cadmium  
CEC: Capacité d'échange cationique  
CLPP: Profils physiologiques des communautés microbiennes  
COT: Carbon Organique Total  
CP1: Composante Principale 1  
CP2: Composante Principale 2  
Cr: Chrome  
Cu: Cuivre  
Da: Dalton  
DGGE: Electrophorèse sur gel en gradient dénaturant  
DMSO: Diméthyle Sulfoxyde  
dNTP: desoxyribonucléotide triphosphate  
DO: Densité Optique  
EDTA: Ethylène diamine tétra-acétate  
EMBL: Laboratoire européenne de biologie moléculaire  
ETM: Eléments traces métalliques  
Fe: Fer  
GPS: *Global Positioning System*  
HCl: Acide chlorhydrique  
HF: Acide fluorhydrique  
ICP-AES: Spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif  
KCl: chlorure de potassium  
MDS: Positionnement multidimensionnel  
MO: Matière organique  
NADH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide  
NCBI: Centre national pour les informations biotechnologiques  
OTU: unité taxonomique opérationnelle  
P: Phosphore  
Pb: Plomb  
pb: Paires de bases  
PCR: Réaction de polymérisation en chaîne  
pH: potentiel hydrogène  
TAE: Tris Acétate EDTA  
TEMED: Tétraméthyléthylènediamine  
Tpm: Tour par minute

TSA: Gélose Trypticase soja

TSB: Triptone soja broth

Tween: Polyoxyéthylène-sorbitane-monoléate

Zn: Zinc

UMT : *Universal Transverse Mercator*

UPGMA: Méthode de regroupement par paire et par estimation des liens moyens

UV: Ultra-Violet

μL: Microlitre

## RÉSUMÉ

Les objectifs de nos travaux de recherche sont l'étude, l'explication et l'exploitation de la variabilité naturelle dans la réponse des plantes et des bactéries aux métaux. La sélection des plantes présentant des caractères de tolérance aux métaux, sur la base de leurs performances à décontaminer des sols, pourra constituer une véritable alternative à la production de plantes transgéniques et contribuer à la conservation et à l'exploitation des ressources génétiques naturelles. Suite à la détermination des concentrations totales et biodisponibles des métaux et du phosphore par l'utilisation de la spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES). Les résultats obtenus montrent que le site d'Ait Ammar est fortement contaminé par le Fe, le P, le Cr et le Zn. Les teneurs des autres éléments métalliques (Pb, Cu et Cd) montrent une contamination polymétallique, ce qui peut avoir des effets néfastes sur l'environnement. Les concentrations des métaux du sol étaient très hétérogènes entre les différents échantillons du site étudié. Les métaux et le phosphore sont fortement liés au sol et sont donc très peu mobiles. De même, le Fe a été corrélé avec le Zn, le P, le Cr et le Cu, ce qui implique que certaines interactions et / ou des relations d'affinité existaient entre ces éléments. Cependant, le Zn a une part mobilisable plus importante que les autres métaux. Par conséquent, ce métal présente un risque immédiat plus grand que les autres métaux lors d'une libération suite à des modifications des conditions physico-chimiques environnantes. D'autre part, plusieurs plantes ont été sélectionnées et l'espèce végétale, *E. spinosus L.* a montré la plus grande capacité de phytoextraction du Zn. Cependant, les autres espèces absorbantes des concentrations faibles de métaux et sont donc des bons candidats pour la phytostabilisation. Les différentes techniques utilisées pour étudier l'impact des métaux lourds sur la communauté bactérienne n'ont pas montré aucun effet significatif des métaux sur la communauté microbienne. Ce résultat montre que la toxicité des métaux dans les sols fortement contaminés par le Fe et le P n'a aucune incidence sur les quantités de populations microbiennes spécifiques et aucun changement significatif dans la diversité microbienne des sols contaminés. L'utilisation de la diversité microbienne structurale et fonctionnelle pour étudier les effets des métaux lourds dans le sol peut être difficile en raison de fortes influences d'autres facteurs environnementaux.

En conclusion, l'utilisation de méthodes moléculaires combinée avec des techniques plus traditionnelles était très utile pour observer les changements induits par les métaux lourds au niveau de la structure et des fonctions de la communauté bactérienne. De plus, les techniques moléculaires ont permis d'identifier certaines populations qui pourraient s'avérer utiles pour la décontamination des sols pollués, offrant ainsi plusieurs perspectives de recherche pouvant déboucher sur le développement de nouvelles technologies.

**Mots clés:** Mine de fer, Diversité bactérienne, Phytoremédiation, Bioremédiation, Biologie Moléculaire.

## SUMMARY

The goals of our PhD studies were study, explication and exploit the diversity in the response of plants and bacteria to heavy metals. Selection of plants with characteristics of metal tolerance on the basis of their performance in decontaminating soils can be a real alternative to the production of transgenic plants and contribute to the conservation and exploitation of natural genetic resources. Results suggest that Ait Ammar mining site is highly contaminated with Fe, P, Cr and Zn. The contents of other metals (Pb, Cu and Cd) show a polymetallic contamination, which may have adverse effects on the environment. The soil metal concentrations were very heterogeneous between different site samples. The metals and phosphorus are strongly bound to the soil and are therefore very little mobile. The results showed that, Fe has been correlated with Zn, P, Cr and Cu, which means that some interactions and/or affinity relationships exist between these elements. However, Zn has a part greater mobilizable than other metal. Therefore, this metal has an immediate risk larger than other metals on liberation due to changes in physico-chemical conditions surrounding. The vegetal specie *E. spinosus* L showed the highest Zn phytoextraction capacity. However, other plant species taking up only low concentrations of metals and therefore are good candidates for phytostabilization. The different techniques used, showed that the metal did not induce a significant changes in the bacterial community. Therefore, the metals toxicity of soil highly contaminated with Fe and P has no effect on the amounts of specific microbial populations and no significant changes in the microbial diversity of contaminated soil. The use of structural and functional microbial diversity to study the effects of heavy metals in the soil can be difficult due to strong influences of other environmental factors.

To conclude, molecular methods in combination with culture-dependent techniques have proven in this study to be very useful for the detection of the changes induced by the heavy metals in the structure and the function of the microbial community. Moreover, the molecular techniques contributed to the identification of bacteria which could be potentially used for the bioremediation of contaminated soils thus offering new perspectives of investigation and technology development.

**Key words:** Iron mine, Bacterial diversity, Phytoremediation, Bioremediation, Molecular biology.

## المخلص

إن الأهداف من رسالتنا للدكتوراه هي دراسة، استكشاف و استغلال التنوع الطبيعي في استجابة النباتات والبكتيريا للمعادن الثقيلة. إن اختيار أصناف نباتية ذات خصائص المقاومة المعدنية على أساس أدائها في تطهير التربة يمكن أن تكون بديلا حقيقيا لإنتاج النباتات المعدلة وراثيا و تساهم بذلك في حفظ واستغلال الموارد الجينية الطبيعية. تشير النتائج إلى أن موقع أيت عمار ملوث بشكل كبير بالحديد والفسفور و الكروم و الزنك. كما أن تراكيز المعادن الأخرى (الرصاص، النحاس والكادميوم) تظهر تلوث متعدد المعادن، والذي قد يكون له آثار سلبية على البيئة. إن تراكيز المعادن غير متجانسة بين عينات التربة في الموقع . في هذه العينات، المعادن والفسفور مرتبطة بقوة بالتربة. وأظهرت النتائج تأثير متبادل و ارتباط بين الحديد في التربة مع الزنك، الفوسفور، الكروم والنحاس، مما يعني أن بعض التفاعلات و / أو علاقات تقارب قائمة بين هذه العناصر. و مع ذلك، الزنك هو الأكثر قابلية للحشد . و بالتالي، فلدیه خطر أكبر من المعادن الأخرى أثناء تحرره تبعا للتغيرات في الظروف الفيزيائية والكيميائية المحيطة. ثم أظهرت النتائج كذلك أن النبات الشوكي *E. spinosus* L. له قدرة عالية لامتصاص الزنك من التربة و أن الأنواع الأخرى من النباتات الماصة لتراكيز منخفضة من المعادن فهي بالتالي مرشحة لتثبيت المعادن. لقد تم فحص تأثير المعادن الثقيلة على المجتمع البكتيري في التربة الملوثة و كذلك تم استعمال مجموعة من التقنيات المختلفة. لم تظهر الدراسات أي تأثير كبير للمعادن على المجتمعات الميكروبية. وبالتالي، فإن سمية المعادن في التربة الجد الملوثة بالحديد والفسفور ليس لها أي تأثير على حجم الساكنة الميكروبية و لا أي تغيرات كبيرة في التنوع الميكروبي للتربة الملوثة. ان استخدام التنوع الميكروبي الهيكلي والوظيفي لدراسة آثار المعادن الثقيلة في التربة يمكن أن يكون صعبا نظرا للتأثيرات القوية للعوامل البيئية الأخرى.

في الختام، إن استخدام الأساليب الجزيئية جنبا إلى جنب مع التقنيات التقليدية كانت مفيدة جدا لمراقبة التغيرات الناجمة عن المعادن الثقيلة في بنية و/أو وظيفة المجتمعات البكتيرية. بالإضافة إلى ذلك، حددت التقنيات الجزيئية بعض البكتيريات التي قد يكون من المفيد استعمالها لإزالة التلوث من التربة الملوثة باستخدام المعالجة البيولوجية، وتوفير المزيد من الفرص للأبحاث التي يمكن أن تؤدي إلى تطوير تكنولوجيا جديدة.

**الكلمات الرئيسية:** منجم حديد، والتنوع البكتيري، المعالجة النباتية، المعالجة الجرثومية، علم الأحياء الجزيئي.

# INTRODUCTION

## Introduction

La thématique des sites et sols pollués est la conséquence d'un passé, et trop souvent encore d'un présent industriel, peu soucieux des rejets d'éléments toxiques dans les sols, rendant de nombreux sites potentiellement pollués et dangereux pour la santé publique. Depuis la fin du 20<sup>ème</sup> siècle, des contaminations de sol avérées sont médiatisées et ce problème a été concrètement pris en considération. Au Maroc comme à l'étranger, il existe une quantité considérable de sites aux prises avec une problématique de contamination mixte, soit à la fois par des métaux et métalloïdes (As, Cd, Cu, Se, Cr, Ni, Pb, Zn, etc.) et des composés organiques.

Les composés inorganiques sont principalement composés de métaux, également appelés «éléments traces métalliques (ETM)». Les éléments chimiques qui les constituent peuvent se retrouver à l'état naturel dans l'environnement dans la roche mère (Legrand, 2006). L'activité humaine contribue également à augmenter leur concentration par le stockage de déchets industriels et urbains, les diverses pratiques agricoles et les retombées atmosphériques provenant des usines. D'autres composés inorganiques peuvent être recensés, à savoir les cyanures (traitements des minerais), les nitrates et nitrites (engrais et autres xénobiotiques) et les fluorures (industrie métallurgique et chimique).

Ces composés ont engendré une contamination de quantités importantes des sols, pouvant même se propager aux sols environnants et contaminer les nappes phréatiques. Bien que les lagunes de décantation ne soient plus d'actualité, des quantités importantes de sols contaminés (comportant un risque potentiel à la fois toxique et pyrotechnique) doivent aujourd'hui être nettoyés.

Le problème des sols contaminés est aujourd'hui très préoccupant pour les pays émergents. Les métaux lourds tels que le plomb, le cadmium, le cuivre, le zinc et le mercure ne peuvent pas être biodégradés et donc persistent dans l'environnement pendant de longues périodes. De plus ils sont continuellement rajoutés dans les sols par diverses activités. L'accumulation des métaux lourds dans l'environnement peut se répercuter sur la santé des êtres humains et des animaux (Wang *et al.*, 2003). A l'échelle microscopique, les métaux lourds ont aussi des effets néfastes sur les populations bactériennes ce qui n'est pas sans conséquence sur le fonctionnement de l'écosystème. Ces dernières années, le développement de techniques efficaces pour décontaminer les sites pollués est devenu indispensable. L'une de ces techniques est la phytoremédiation qui exploite les propriétés de certaines plantes à accumuler de grandes quantités de métaux lourds (Mench *et al.*, 2010). La phytoremédiation présente de nombreux avantages: elle est viable économiquement car on peut exploiter les végétaux produits et récupérer les métaux à haute valeur ajoutée et elle est compatible avec les politiques de préservation de l'environnement. Néanmoins cette technique comporte des limites: la croissance lente et la production faible de biomasse demandent un investissement en temps assez important et/ou en argent avec l'adjonction de chélateurs ou autres substances «starter» car la concentration et le type de métaux lourds influencent la phytotoxicité, et dans certains cas, la croissance des plantes peut être réduite (Shah et Nongkynrih, 2007).

L'impact toxique des métaux lourds sur les communautés bactériennes telluriques a fait l'objet de nombreuses études (Giller *et al.*, 1998). En effet, les micro-organismes occupent des positions clés dans les processus biogéochimiques et influencent le développement des plantes par leur considérable contribution à la fertilité du sol (Ranjard *et al.*, 2000). Leur disparition ne permet donc plus de garantir à long terme la fertilité du sol. De plus, il est généralement admis que les micro-organismes sont plus sensibles aux métaux lourds que les plantes ou les animaux vivant dans les sols pollués (Giller *et al.*, 1998). Les bactéries sont susceptibles d'être affectées au niveau de leur activité, leur physiologie, leur diversité, autant de perturbations pouvant avoir des conséquences néfastes sévères sur l'ensemble de l'écosystème.

Cependant, la majorité de ces bactéries ne sont encore ni identifiées ni caractérisées car elles demeurent récalcitrantes à la culture *in vitro* sur des milieux de culture qui ont pu leur être proposés (Rappe et Giovannoni, 2003). Ces limites imposées par la culture *in vitro* ont permis le développement d'approches s'en affranchissant. L'arrivée de la métagénomique dans les années



1990 a restreint l'étude des bactéries à leur ADN directement extrait de l'environnement (McHardy et Rigoutsos, 2007). L'ADN alors collecté à partir d'échantillons environnementaux (le métagénome) peut être analysé par des techniques permettant de caractériser la structure d'une communauté bactérienne complexe (Ramette, 2009). Ces méthodes nécessitent souvent une étape d'amplification. Récemment les nouvelles techniques de séquençage d'ADN ont permis d'obtenir des gigabases de données de séquences venant de bactéries non cultivées, permettant une variété d'applications génétiques (Roesch et *al.*, 2007).

L'exploration de la diversité bactérienne, notamment du sol, reste toutefois imparfaite et très incomplète (Aschby et *al.*, 2007). Ces limitations sont d'ordre technique, les méthodes d'extraction de l'ADN ne permettant pas d'accéder à la totalité de l'information génétique bactérienne du fait des caractéristiques physico-chimiques d'environnements complexes comme le sol (Saano et Lindstrom, 1995). Comme nous le verrons ultérieurement, les cellules bactériennes ainsi que l'ADN libre peuvent être adsorbées irréversiblement sur des particules de sol, telles que les argiles. L'étape de la purification de l'ADN est aussi problématique, les interférences avec des substances humiques co-extraites conduisant également à une diminution du rendement d'extraction (Harry et *al.*, 1999). Les étapes d'amplification de l'ADN par la technique de la PCR rajoutent un biais dans l'analyse des communautés bactériennes. Quant au séquençage d'échantillons environnementaux qui contiennent plusieurs micro-organismes en quantité variable, les nouvelles générations de séquençage ont également leurs limites liées aux erreurs de séquençage, au traitement des masses de données générées et à l'ampleur considérable de l'effort requis pour atteindre la totalité de l'ADN des espèces. Ces limites sont aussi conceptuelles, du fait de la colonisation par certaines populations de micro-environnements très protégés (Hattori, 1988) et surtout à des différences de taille des populations. En effet, les analyses sur la distribution de l'abondance des bactéries indiquent que la diversité est divisée en 2 principales composantes. La première inclut les quelques espèces abondantes, qui représente la partie la plus étudiée des communautés, la deuxième nommée la «rare biosphère» (Sogin et *al.*, 2006) comprend un nombre élevé d'espèces rares qui représentent la majorité de la diversité (Pedros-Alio, 2006) et qui a été démontrée en premier par pyroséquençage des bactéries marines dans les profondeurs de l'atlantique (Sogin et *al.*, 2006).

Nous connaissons encore peu de choses sur le rôle écologique et fonctionnel, de ces bactéries «rares» qui jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement biologique du sol. Certaines peuvent se développer quand les conditions du sol changent, et ainsi maintenir différentes fonctions bactériennes quand les bactéries les plus abondantes et actives sont affectées par les modifications environnementales. Certaines d'entre elles sur-expriment certains de leurs gènes impliqués dans des fonctions écologiques majeures pour compenser la faible taille de leur population. Ces nombreuses bactéries à très faibles effectifs constituent aussi un réservoir d'information génétique et notamment de gènes qui peuvent être transférés entre les différents membres de la communauté bactérienne par des mécanismes de transferts horizontaux qui sont un puissant moteur de l'évolution bactérienne, permettant notamment la très rapide adaptation de ces micro-organismes aux changements biotiques ou abiotiques de leur environnement. Cette importante disparité au niveau de la taille des populations bactériennes liée à un niveau très élevé du nombre d'espèces rend leur inventaire extrêmement ardu, sans même prendre en compte la diversité des fonctions réalisées, leur redondance, les interactions existant entre les bactéries et les autres composants biotiques et abiotiques de l'environnement. Différentes études ont été basées sur l'estimation du nombre de bactéries par gramme de sol (Torsvik et *al.*, 1990; Gans et *al.*, 2005), malgré tout aucune estimation de cette diversité bactérienne n'est certaine, en grande partie du fait de l'existence de cette rare biosphère.

Ce travail de recherche a été réalisé dans le cadre d'une collaboration entre notre laboratoire de Gestion et Valorisation des Ressources Naturelles (FST Beni Mellal), le Centre des Etudes Environnementales et Maritimes (CESAM) de l'Université d'Aveiro (Portugal) et l'Institut de recherche marine (RAMI-CMA) de l'Université de Coimbra (Portugal). L'objectif de ce travail vise dans un premier temps l'étude, l'explication et l'exploitation de la variabilité naturelle dans la

réponse des plantes et des bactéries aux métaux et dans un deuxième temps, la sélection de cultivars de plantes présentant des caractères de tolérance aux métaux sur la base de leurs performances à décontaminer des sols. Ce résultat pourra constituer une véritable alternative à la production de plantes transgéniques et contribuer à la conservation et à l'exploitation des ressources génétiques naturelles. L'implantation de ces espèces végétales tolérantes dans les sites contaminés peut empêcher la dispersion des éléments métalliques par le vent ou par l'eau et leur percolation aux eaux souterraines.

La rédaction de cette thèse est organisée en trois chapitres. Le premier chapitre présente une synthèse bibliographique sur l'origine et la présence des principaux polluants métalliques dans les sols de la mine d'Ait Ammar, la mobilité de ces polluants dans les sols, les interactions entre métaux, bactéries et plantes et les techniques de dépollution des sols. Le deuxième chapitre présente, en premier lieu, la description de l'historique et les caractéristiques de la pollution du sol du gisement de fer d'Ait Ammar, puis les protocoles d'échantillonnage. Ensuite, les analyses physico-chimiques de caractérisation des sols et les analyses biologiques sont successivement décrites. Enfin, les méthodes statistiques utilisées dans le cadre de ce travail sont développées. Le Troisième chapitre est consacrée aux résultats et discussion obtenus durant ce travail.

# CHAPITRE I.

## Synthèse bibliographique

Depuis la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, le secteur industriel s'est développé de part le monde sans égard pour l'environnement. Le rôle de l'Homme est alors devenu tellement important dans la biosphère que certains auteurs distinguent maintenant une nouvelle sphère, l'anthroposphère, lieu de l'activité humaine sur la planète (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

Comme la majorité des pays, Le Maroc a hérité d'un long passé industriel durant lequel les préoccupations environnementales n'ont pas été une priorité. Si, de nos jours, le sol est caractérisé par un équilibre fragile et une vulnérabilité, il a longtemps été considéré comme une ressource renouvelable voir inépuisable à l'échelle des générations humaines. De plus, les conséquences du déversement de produits et leurs mauvais stockage, sans précaution particulière, n'étaient alors que pas ou peu connus. Ainsi, les substances qui ne se dégradant pas naturellement ou ne se volatilisant pas au contact de l'air ont pu s'accumuler dans les sols, les eaux souterraines et les sédiments de rivières.

## **I. Les polluants métalliques dans les sols et leurs mobilités**

### **1. Origine des polluants métalliques dans le sol**

Les ETM sont les 68 éléments constituant de la croûte terrestre, dont la concentration est inférieure à 0,1 % et représentant seulement 0,06 % du total des éléments. Les éléments en traces peuvent être des métaux (Fe, Pb, Zn, Cu etc...), des métalloïdes (As, B...) ou des non métaux (P, N...) (Baize, 1997). Le terme métaux lourds, du point de vue physique, regroupe les 65 éléments traces qui présentent une masse volumique supérieure à 5 g.cm<sup>-3</sup> (Adriano, 2001), Hormis le Fe et le Mn, tous sont rares dans la croûte terrestre, et sont donc des ETM. D'un point de vue purement chimique, les éléments de la classification périodique formant des cations en solution sont des métaux. D'un autre point de vue biologique, on en distingue deux types en fonction de leurs effets physiologiques et toxiques: métaux essentiels et métaux toxiques pour les organismes végétaux et animaux. Dans les études environnementales, le terme est souvent associé au qualificatif de toxique en omettant de signaler qu'en faibles concentrations certains ETM sont des nutriments indispensables pour le vivant.

Les ETM sont naturellement présents dans les sols en faibles quantités. Ils sont en partie libérés lors de l'altération de la roche mère et constituent le pool endogène appelé fond pédogéochimique. C'est la concentration naturelle d'une substance dans un horizon de sol, résultant de l'évolution géologique et pédologique à l'exclusion de tout apport d'origine anthropique (Baize, 1997). Un second pool, plus ou moins important selon la situation géographique, issu d'apports exogènes provient essentiellement de l'activité humaine: i) de façon diffuse, émis par l'activité industrielle, les moyens de transport et amené par voie atmosphérique, ou ii) localement soit de façon ponctuelle par l'apport de déchets contaminés (pollution souvent aiguë), soit de façon répétée et cumulative par l'activité agricole (Alloway *et al.*, 1995).

### **2. Mobilité des polluants métalliques dans les sols**

Dans le domaine de l'écotoxicité des métaux lourds, de nombreuses recherches s'accordent sur le fait que le risque résulte non pas des concentrations totales relevées dans les sols pollués, mais de leur fraction biodisponible (McLaughlin *et al.*, 2000; Adriano, 2001; Akkajit et Tongcumpou, 2010; Economou-Eliopoulos *et al.*, 2011). La mobilité des espèces chimiques métalliques peut être définie par leur aptitude à être transférées vers des compartiments du sol où elles sont moins énergiquement retenues. Le compartiment ultime étant la phase liquide représentée par la solution du sol. C'est cette dernière qui constitue le réservoir principal d'alimentation pour les plantes (McLaughlin *et al.*, 2000; Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Les processus de transferts entre la phase solide et la phase liquide sont multiples. Ils dépendent fortement de la nature de la liaison entre les métaux et la phase solide, appelée également phase porteuse ou phase de rétention, ainsi que des conditions physico-chimiques régnant dans le sol. Il convient alors de traiter séparément ces aspects pour expliquer la mobilité des métaux lourds.

## 2.1. Constituants des sols impliqués dans la mobilité des éléments métalliques

Les minéraux des sols sont hérités de la roche mère sous-jacente. On distingue les minéraux primaires hérités sans modification de la roche mère et les minéraux secondaires issus de la pédogénèse par des phénomènes d'altération physico-chimiques et biologiques. A ces constituants vient s'ajouter une fraction organique héritée de l'activité des organismes vivants. L'ensemble de ces éléments forme la phase de rétention des métaux en équilibre dynamique avec l'eau du sol.

### 2.1.1. Les minéraux primaires

Les minéraux primaires des sols sont hérités de la roche mère, d'une part grâce aux processus de désagrégation mécanique souvent d'origine climatique comme par exemple la succession gel/dégel, d'autre part en raison de leur résistance aux processus d'altération chimique en vigueur dans les conditions environnantes. La structure de la plupart de ces minéraux et leur taille importante ne leur confèrent que de très faibles propriétés réactives vis-à-vis des métaux lourds (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Lorsque les processus d'altération se poursuivent, ces minéraux peuvent être la source des minéraux secondaires (Duchaufour, 1995).

### 2.1.2. Les minéraux secondaires

Les minéraux secondaires créés durant la pédogénèse sont essentiellement des argiles, des (hydr)oxydes de fer (Fe), d'aluminium (Al) et de manganèse (Mn), des carbonates, des sulfates et des phosphates. Issus directement ou indirectement des minéraux primaires de la roche mère et ils sont de très petite taille et considérés comme les principaux constituants minéralogiques des sols ayant un rôle dans la rétention des éléments métalliques.

#### a. Les argiles

Les argiles présentent surtout deux caractéristiques essentielles qui en font des minéraux diversement réactifs: D'une part, les argiles ont une structure formée d'une superposition de feuillets (phyllosilicate) qui leur confère une surface spécifique interne très variée (de  $0 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  pour la kaolinite à  $800 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  pour des vermiculites ou des smectites) (Villieras *et al.*, 1997). Cette surface interne vient s'ajouter à une surface externe importante liée à leur très petite taille et à leur morphologie (de moins de  $1 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  pour les vermiculites à  $50 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  pour les smectites). D'autre part, les argiles se caractérisent par une surface électrique non neutre qui détermine leurs capacités d'échanges ioniques. Ces minéraux portent en fait deux types de charge. La première, de signe négatif est structurelle et non modifiable. Elle est liée aux substitutions  $\text{Al}^{3+}$ -  $\text{Si}^{4+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ -  $\text{Al}^{3+}$  dans les feuillets de l'argile. La seconde, liée aux réactions chimiques qui se produisent à la surface des minéraux est une charge de surface variable en fonction du pH du milieu. Pour un pH bas, les ions  $\text{H}^+$  majoritaires se lient à l'argile plus que les  $\text{OH}^-$ . Il en résulte une charge globalement positive et l'argile se caractérise par une capacité d'échange anionique. Pour un pH élevé, les ions  $\text{OH}^-$  dominants conduisent au phénomène inverse et l'argile développe une CEC. A l'équilibre, point isoélectrique, la capacité d'échange de l'argile devient nulle. La CEC mesure la capacité d'une argile à échanger des cations. Elle varie de 10 meq/100g à 200 meq/100g respectivement pour les chlorites et les vermiculites (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

#### b. Les oxydes et hydroxydes

Les (hydr)oxydes de fer et d'aluminium, sous forme amorphe ou cristalline, sont des constituants communs dans les sols naturels. Les (hydr)oxydes de fer sont les plus abondants ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ : hématite et maghémite;  $\text{FeOOH}$ : goethite et lepidocrocite et  $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ : ferrihydrite). Cependant les (hydr)oxydes d'aluminium ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ : gibbsite;  $\text{AlOOH}$ : boehmite) sont relativement moins fréquents. Enfin, les (hydr)oxydes de manganèse, relativement mal définis car de structure minérale complexe sont généralement minoritaires dans les sols naturels.

Comme les argiles, la réactivité des (hydr)oxydes de fer et d'aluminium provient de leur importante surface spécifique et de la charge de surface variable avec le pH du milieu (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). En effet, suivant les conditions physico-chimiques, ils présentent des

charges de surface variables permettant d'adsorber les anions et les cations par des liaisons de haut niveau d'énergie. Le point isoélectrique des (hydr)oxydes de fer et d'aluminium se situe entre pH 7 et pH 9 selon les espèces. Les (hydr)oxydes de manganèse possèdent des propriétés différentes des oxydes de fer et d'aluminium (Sigg et *al.*, 2000). Contrairement aux autres (hydr)oxydes, leur point isoélectrique se situe entre pH 5 et pH 7 ce qui fait d'eux des fixateurs des métaux dans les sols naturels. Ils jouent en conséquence un rôle prépondérant dans la sorption des ions métalliques (Blanchard, 2000).

*c. Les carbonates, phosphates, sulfates, sulfures et chlorures*

La forme prédominante des carbonates ( $R^{2+}CO_3^{2-}$ ; R= Ca, Mg, Fe mais aussi beaucoup de métaux divalents présents dans les sols pollués tels que Pb, Zn, Cu, etc.) dans la plupart des sols est la calcite ( $CaCO_3$ ). Assez soluble, cette espèce a une influence majeure sur le pH des sols, et par conséquent sur les phénomènes de sorption des métaux. En outre, les réactions de dissolution/précipitation des carbonates favorisent le piégeage des ions métalliques au sein des cristaux formés (Blanchard, 2000).

Les phosphates (groupement  $PO_4^{3-}$ ) sont des minéraux peu abondants dans les sols, mais susceptibles, comme les carbonates, de substitution du calcium par des éléments métalliques divalents (*e.g.* Pb, Zn, Cu), en particulier dans des sols à tendance basique (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

Les sulfates (généralement de la forme  $R^{2+}SO_4^{2-}$ ) et les arseniates (minéraux d'arsenic  $As^{5+}$  comprenant le groupement  $AsO_4^{3-}$ ), les sulfures (souvent  $R^{2+}S^{2-}$ ), les arseniures (minéraux d' $As^{3+}$ ) et les chlorures (principalement  $R^{2+}Cl^{2-}$ ) sont des espèces présentes en quantité généralement négligeable dans la plupart des sols, mais qui peuvent être abondantes en contexte industriel ou minier. Les couples sulfate-sulfure et arseniate-arseniure sont très sensibles aux conditions d'oxydoréduction du milieu et les micro-organismes peuvent jouer un rôle essentiel à cet égard. En condition anoxique, la réduction du sulfate en sulfure est fréquente, et inversement, l'oxydation de certains sulfures est rapide lorsque la saturation en oxygène est atteinte. Les solubilités des formes réduites et oxydées d'un élément chimique donné lorsqu'elles existent peuvent être très différentes rendant les cations métalliques plus ou moins disponibles. Or ceux-ci sont facilement assimilables par les plantes et ils représentent une voie privilégiée de contamination de la chaîne alimentaire.

*2.1.3. La matière organique*

La matière organique désigne différents types de composés carbonés et azotés. Elle est principalement issue de l'activité biologique des végétaux et des animaux et de leurs produits de décomposition mais peut également avoir une origine anthropique: composts, boues, pesticides, hydrocarbures. Elle se compose de deux fractions:

- La fraction vivante (micro-organismes, faune épilithique, animaux fouisseurs). Son influence sur la fixation des éléments trace est importante et elle participe largement aux modifications de certains facteurs pédologiques comme le potentiel redox ou le pH (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).
- La fraction morte (débris végétaux et animaux plus ou moins décomposés en humus et carbone rapporté) est représentée par diverses molécules plus complexes et moins bien définies de masses moléculaires très différentes. Ainsi, on retrouve les cires, les lipides, les protéines, les peptides, les acides organiques, les acides aminés ou encore les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)... (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Ces composés s'associent entre eux pour former les substances humiques (humine, acides humiques, acides fulviques) piégeant différents éléments.

La matière organique est donc un facteur clef des échanges ioniques et des cycles géochimiques des éléments métalliques. Les réactions mises en œuvre sont diverses et font appel à différents aspects physico-chimiques.

## **2.2. Phénomène de sorption des éléments métalliques dans les sols**

L'ensemble des constituants du sol forme le «complexe absorbant» (Blanchard, 2000). Ce complexe est capable de réaliser des échanges entre la phase liquide et la matrice solide du sol qui dépendent des mécanismes de sorption. Deux types principaux d'interaction matrice solide-phase liquide sont impliqués dans la rétention des métaux lourds: la physisorption et la chimisorption.

### *2.2.1. La physisorption: une adsorption non spécifique*

L'adsorption non spécifique résulte des forces électrostatiques entre atomes portant des charges de signe différent. L'énergie de liaison est alors relativement faible. Par conséquent, les éléments métalliques adsorbés sont facilement mobilisables en cas de changements physico-chimiques du milieu.

La matrice du sol, globalement chargée négativement, attire les cations en solution. Ce sont les minéraux argileux et la matière organique, souvent réunis pour former le complexe argilo-humique, qui participent le plus à la charge négative du sol (Chaignon, 2001). La présence des charges de surface peut provenir soit de substitutions isomorphiques dans le réseau cristallin (remplacement d'un cation trivalent par un divalent), soit de réactions chimiques de surface dues aux variations de pH (Delmas-Gadras, 2000).

Pour l'adsorption non spécifique, les atomes de métal ne sont pas directement en contact avec la surface des particules du sol, mais ils sont présents au sein d'une sphère de molécules d'eau enrobant les particules du sol, appelées couche d'hydratation. On nomme ce type d'interaction «complexe de sphère externe».

### *2.2.2. La chimisorption: une adsorption spécifique*

Contrairement à l'adsorption non spécifique, l'adsorption spécifique fait intervenir une liaison chimique forte, sans molécule d'eau interposée entre le groupe fonctionnel et la surface de l'ion adsorbé. Les éléments métalliques ainsi chimisorbés seront ainsi beaucoup moins susceptibles d'être mobilisés. On parle dans ce cas de «complexe de sphère interne». Trois types de liaison chimique sont à l'origine de la spécificité de la chimisorption entre l'ion et la matrice: les liaisons ionique, covalente et de coordination (Blanchard, 2000). Elles peuvent se produire entre un ion métallique et un ligand organique ou inorganique. On appelle ligand un groupe fonctionnel, un atome ou un ion lié à un groupe central d'atomes ou d'ions. On parle alors de complexation ou de chélation. Les complexes formés peuvent parfois précipiter (Blanchard, 2000). En outre, après avoir été adsorbés en surface, les éléments peuvent diffuser à l'intérieur des particules minérales; c'est le phénomène d'absorption. Tous ces processus de sorption sont réversibles. La réversibilité est due aux conditions physico-chimiques du sol, pH, potentiel redox... que nous allons maintenant aborder.

## **2.3. Facteurs modifiant la mobilité des éléments métalliques**

### *2.3.1. Le pH*

Le pH constitue un facteur dont le rôle est crucial pour la mobilité des ions métalliques car il influence le nombre de charges négatives pouvant être mises en solution (McLaughlin, et al., 2000). Les protons proviennent majoritairement de la respiration végétale et microbienne ainsi que de l'oxydation des sulfures. A l'inverse, ils sont consommés par l'hydrolyse des minéraux altérables. D'une façon générale, lorsque le pH augmente, les cations sont moins solubles et les anions sont plus solubles (Blanchard, 2000).

De plus, l'augmentation de pH induit souvent la formation d'espèces précipitées qui peuvent limiter la solubilité et la biodisponibilité de toutes les espèces ioniques (Deneux-Mustin et al., 2003). Cependant, elle entraîne également la dissolution de matières organiques et la formation consécutive de complexes organo-métalliques plus solubles (Chaignon, 2001). Les variations de pH ont donc des conséquences complexes et parfois contraires sur la mobilité des métaux lourds, en particulier en présence de ligands organiques et inorganiques.

### 2.3.2. Le potentiel redox

Le potentiel redox (Eh) permet de caractériser les échanges d'électrons entre les éléments chimiques. Ainsi, les formes oxydées prédominent pour un potentiel redox élevé, alors que les faibles valeurs favorisent l'apparition d'éléments réduites. Les valeurs les plus courantes du potentiel redox dans les sols naturels sont comprises entre -200 et 400 mV, domaine de potentiel qui recouvre des degrés d'oxydation variés de nombreuses espèces en solution, influant ainsi directement ou indirectement sur la mobilité des métaux qui constituent ces espèces minérales. Le  $\text{Cr}^{3+}$  peut ainsi subir une oxydation directe en  $\text{Cr}^{6+}$  plus mobile et plus toxique.

De plus, la modification du degré d'oxydation des ligands ou des éléments se liant avec le métal influence indirectement la solubilité des métaux lourds. En conditions réductrices, les sulfates sont réduits en sulfures qui piègent volontiers les éléments chalcophiles tels que Fe, Zn, Pb et Cd (Deneux-Mustin et al., 2003). D'autre part, la dissolution des (hydro)oxydes est favorisée ce qui entraîne de manière opposée la solubilisation des métaux associés (Chaignon, 2001).

Bien que l'influence des conditions oxydoréductrices du sol semble très importante au regard de la mobilité des éléments métalliques, il n'en demeure pas moins que ce facteur apparaît souvent comme secondaire par rapport au pH. En effet, pour un sol donné l'Eh varie en fonction inverse du pH, il augmente quand le pH diminue (Deneux-Mustin et al., 2003), en conséquence de quoi l'influence des conditions oxydoréductrices apparaît souvent comme secondaire par rapport au pH. De plus, il est relativement difficile d'interpréter les valeurs obtenues. En raison du nombre important des couples redox et de la cinétique des réactions, l'influence du potentiel redox est souvent difficile à comprendre.

### 2.3.3. L'activité biologique

La compréhension globale des phénomènes biologiques jouant sur la solubilité des métaux lourds dans les sols est rendue difficile par la multiplicité des actions et interactions à tous les niveaux. Les végétaux supérieurs étant au centre de notre étude et les micro-organismes ayant une influence sur l'ensemble du milieu aux échelles de temps et d'espace considérées, nous nous attacherons à développer principalement l'action des micro-organismes et des plantes.

Parmi les micro-organismes on retrouve de nombreuses populations bactériennes et fongiques dont les activités métaboliques influencent la mobilité des métaux lourds. Cependant, beaucoup de ces phénomènes sont également communs aux plantes. Les principaux phénomènes d'action sur la mobilité des polluants métalliques sont la solubilisation, l'insolubilisation et la volatilisation:

- La solubilisation provient de la production de composés acides tels que les acides carboxyliques, phénoliques, aliphatiques, nitrique et sulfurique. Certaines bactéries chimolithotrophes (*Thiobacillus*, *Leptospirillum*, *Galionella*) oxydent les formes réduites du fer et du soufre contenues dans les sulfures et produisent de l'acide sulfurique, susceptible de dissoudre les silicates, les phosphates, les oxydes et les sulfures, libérant ainsi les métaux lourds contenus. Cette acidification favorise aussi la mobilité des autres éléments qui ne sont pas indispensables pour le métabolisme végétal. D'autre part, plusieurs autres molécules organiques, capables de complexer spécifiquement certains éléments en solution, peuvent être également libérées en cas de carence nutritive. Parmi ces agents complexants, les sidérophores, composés organiques de faible masse moléculaire produits par les bactéries et les champignons mais aussi par les plantes. Ces molécules favorisent les déplacements d'éléments métalliques et un transfert diffusif jusqu'aux plantes dans lesquelles ils s'accumulent (Chaignon, 2001).
- L'insolubilisation constitue le phénomène opposé. Certains acides organiques de faible masse moléculaire, comme les acides oxalique, citrique ou fumarique qui interviennent dans la complexation intracellulaire d'éléments nutritifs, peuvent être sécrétés dans le milieu extérieur. Ils limiteraient ainsi les transferts par des processus de complexation.



- La volatilisation repose sur l'action directe de certains micro-organismes sur le degré d'oxydation de l'espèce métallique. C'est le cas du mercure, de l'arsenic et du sélénium. La biométhylation permet le transfert de groupements méthyl directement aux atomes, Pb, Sn, As, Sb et Se permettant leur volatilisation dans l'atmosphère (Gadd, 2004).

#### 2.3.4. La température

La température du sol dépend en premier lieu de la météorologie, et donc du climat, mais elle est également liée à l'activité biologique et influence rétroactivement la formation de complexes avec des ligands inorganiques en modifiant l'activité de l'élément en solution (Deneux- Mustin *et al.*, 2003). La température a un impact direct sur la mobilité des éléments métalliques en déplaçant les équilibres des réactions de dissolution précipitation et co-précipitation et un impact indirect, en modifiant la teneur en eau du sol, le pH ou l'Eh.

#### 2.4. Estimation de la mobilité des polluants métalliques

La quantification de la mobilité des polluants métalliques a nécessité la mise en place de modèles mathématiques simplifiés des interactions entre les métaux et les constituants du sol. Toutefois, ces modèles d'isothermes (Langmuir, Freundlich, linéaire...) et/ou cinétiques de sorption/désorption s'avèrent être basés sur des hypothèses trop simplifiées ou parfois irréelles et ne permettent pas de rendre compte de tous les phénomènes recensés. Afin de compléter cette approche, il est possible de recourir à des tests d'extractions chimiques permettant d'estimer la mobilité des polluants métalliques. Ils reposent sur l'utilisation d'agents chimiques pour isoler et extraire les métaux associés à certaines phases identifiées du sol (Beckett, 1989). Cette extraction est ensuite suivie de la mesure dans la solution de la concentration des métaux extraits. Ces tests sont particulièrement utilisés dans des approches d'analyse de risque ou de transfert vers la chaîne alimentaire (Gupta *et al.*, 1996). Il existe principalement deux types d'extraction:

- L'extraction spécifique ciblant spécifiquement une fraction du sol qui repose sur l'utilisation d'un seul extractant. Cet extractant peut être de l'eau, un solvant organique (éthanol), un sel neutre (KCl, MgCl<sub>2</sub>, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, KNO<sub>3</sub>...), un acide faible (acétate, oxalate), un agent complexant (EDTA, DTPA) ou encore un acide fort peu concentré (HCl, HNO<sub>3</sub>) (Beckett, 1989; McLaughlin *et al.*, 2000).
- L'extraction séquentielle fait appel à plusieurs agents chimiques (généralement de trois à huit) utilisés en chaînant les extractions sur un même échantillon (de façon séquentielle) pour déterminer le fractionnement, encore appelé spéciation, des éléments métalliques au sein des principaux constituants des sols. Depuis les travaux de Tessier *et al.* (1979) portant sur les sédiments de rivières, on sépare généralement les éléments en cinq fractions: échangeables, liés aux carbonates, liés aux (hydr)oxydes, liés à la matière organique et les résiduels, piégés dans les silicates. Mais, ce schéma d'extraction séquentielle s'avère souvent inapproprié et de nombreux auteurs ont repris ce protocole en modifiant parfois la liste des agents chimiques utilisés (Li et Thornton, 2001).

Tout comme les modèles mathématiques, l'utilisation d'extractants chimiques peut être remise en cause. Outre leur manque de spécificité, ils sont susceptibles de provoquer une redistribution des éléments chimiques entre les différentes phases porteuses dans le sol et ils n'évitent donc pas totalement la refixation d'une partie des éléments mis en solution (Beckett, 1989). En ce qui concerne l'évaluation de la phytodisponibilité, les corrélations effectuées entre concentrations mesurées dans les extraits et celles relevées dans les plantes sont souvent mauvaises et dépendent fortement de l'espèce végétale analysée et du métal considéré (Maiz *et al.*, 2000). L'évaluation de la phytodisponibilité à travers la seule extraction chimique apparaît donc très risquée et il serait préférable de mesurer directement les concentrations obtenues dans les plantes chaque fois qu'il est possible de le faire. Cependant cette approche s'avère elle-même complexe, car chaque espèce présente un comportement d'accumulation spécifique: non-accumulation des métaux toxiques, accumulation à des degrés divers, accumulation dans des

organes différents. Il convient donc de présenter la végétation des sites pollués, ainsi que les phénomènes d'adaptation mis en jeu.

### 3. Le fer : un oligo-élément essentiel pour les plantes et les micro-organismes

Le fer est le quatrième élément le plus abondant de la croûte terrestre (4,7 % en masse) après l'oxygène (49,5 %), le silicium (25,8 %) et l'aluminium (7,8 %) (Neilands, 1981). Dans l'environnement, il est essentiellement retrouvé sous forme d'hydroxydes de fer ou d'oxyhydroxydes peu biodisponibles.

A l'exception de quelques micro-organismes, tels certains *Lactobacillus* (Imbert et Blondeau, 1998), les agents de la syphilis, *Treponema pallidum* (Posey et al., 1999) et de la maladie de Lyme, *Borrelia burgdorferi* (Posey et Gherardini, 2000), tous les organismes vivants nécessitent du fer pour leur croissance. En effet, cet élément intervient en tant que cofacteur dans de nombreux processus métaboliques tels que la synthèse des acides nucléiques (Dougherty et Downs, 2006), la photosynthèse (Okamura et al., 1975), la phosphorylation oxydative (Schafer et al., 1996), le transport et le stockage de l'oxygène, la régulation génétique ou encore le transfert d'électrons (Wandersman et Delepelaire, 2004).

Comme il a été vu précédemment, le fer bien qu'essentiel, est paradoxalement très peu biodisponible en raison de sa très faible solubilité à pH physiologique. Il existe principalement sous deux formes, une ferreuse,  $Fe^{2+}$ , et une plus stable, la forme ferrique,  $Fe^{3+}$ . Sous cette dernière forme, le fer est oxydé et précipite en hydroxydes de fer hautement insolubles (Braun et Killmann, 1999). Ainsi, à pH 7 et dans un environnement aérobie, les concentrations en fer libre varieront de  $10^{-9}$  à  $10^{-18}$  M (Griffiths et al., 1999). Néanmoins, pour une croissance optimale, les micro-organismes nécessitent une concentration en fer de l'ordre du  $10^{-6}$  M. Ainsi, afin de surmonter cette faible biodisponibilité, les micro-organismes aérobies ont mis en place différents mécanismes d'acquisition. La stratégie la plus répandue consiste en la production et la sécrétion de molécules de faible poids moléculaire (< 2500 Da), appelées sidérophores.

#### 3.1. Du sol à la plante: trajets et fonctions du fer

##### 3.1.1. Biodisponibilité du fer dans les sols: Rôle majeur des activités microbiennes

Le fer oligoélément essentiel, est présent dans les sols essentiellement dans les minéraux primaires issus de la roche mère ou secondaires issus de l'altération (oxydes, silicates, carbonates, sulfures, phosphates), mais aussi dans des associations organominérales qui dans leur ensemble sont très peu solubles. Il est donc le plus souvent peu biodisponible. Sa mobilité et disponibilité potentielles sont déterminées par des extractions chimiques utilisant des réactifs plus ou moins spécifiques mettant en évidence divers compartiments géochimiques par dissolution de leurs constituants (Mortvedt, 2000). C'est un élément qui présente une forte réactivité grâce à sa capacité à être réduit ou oxydé ou à former des complexes organométalliques solubles. Sa mobilité est donc guidée par les conditions acido-basiques et d'oxydoréduction du milieu et par la présence de ligands organiques (McBride, 1994). Ces paramètres (pH, Eh, présence de ligands organiques) ne sont pas uniquement chimiques et physico-chimiques, mais sous la dépendance des activités microbiennes qui les modifient en permanence.

Par ailleurs les sols contiennent des communautés bactériennes ou fongiques qui disposent de stratégies énergétiques et nutritionnelles leur permettant d'intervenir directement dans les phénomènes de dissolution et/ou immobilisation du fer par oxydation, réduction, formation et dégradation de complexes organométalliques dans diverses conditions de milieu (Ehrlich, 2001).

En milieu acide ou neutre, aérobie ou microaérophile, des populations bactériennes autotrophes ou mixotrophes oxydent le Fe(II) en Fe(III) pour obtenir l'énergie nécessaire à leur croissance. Ces processus conduisent, sauf en conditions acides ou complexantes, à la formation de dépôts d'hydroxydes et oxyhydroxydes ferriques ou encore de dépôts de sulfates et phosphates (Ehrlich, 2001). D'autres communautés bactériennes aéro-anaérobies ou anaérobies utilisent le fer ferrique comme accepteur d'électrons, pour leur respiration en absence d'oxygène (respiration anaérobie) ou en parallèle ou complément de fermentation. Le fer est alors mobilisé et disponible

sous forme ferreuse et ne restera soluble qu'en conditions réductrices (Stemmler et Berthelin, 2003). Ce phénomène se produit non seulement en sol saturé mais aussi en milieu où la consommation d'oxygène entraîne l'anoxie et conduit à la mise en place de ces réductions bactériennes (Stemmler et *al.*, 2004). Ces différents processus d'oxydation et réduction modifient aussi le statut du fer dans la phase solide qui évolue, pour une part, vers des formes plus mobilisables (Quantin et *al.*, 2002).

Enfin des bactéries, rhizosphériques ou non, produisent des substances complexantes du fer (acides aliphatiques polycarboxyliques, hydroxycarboxyliques, acides phénols, acides hydroxamiques...). Ainsi, des bactéries rhizosphériques utilisant des exsudats racinaires du hêtre, produisent des acides maliques et lactiques qui contribuent à l'altération de minéraux, ici un mica la phlogopite, et à la solubilisation d'éléments minéraux dont le fer. Il sera alors transféré plus abondamment à la plante (Leyval et Berthelin, 1991). Certains de ces composés complexant du fer, les sidérophores, qui disposent soit de trois groupements fonctionnels acide hydroxamique soit de trois groupements di ortho-phénol présentent une capacité complexante spécifique du fer ferrique (Kraemer, 2004). Ils interviennent plus efficacement que les acides aliphatiques, dans la solubilisation des oxyhydroxydes ferriques comme la goéthite (Watteau et Berthelin, 1994).

En conclusion l'ensemble de ces processus impliqués plus ou moins spécifiquement dans la dissolution du fer et / ou son dépôt, conduisent à l'accroissement de sa disponibilité dans les sols rhizosphériques et non rhizosphériques. Ils peuvent avoir des effets bénéfiques ou nocifs, directs ou indirects dans le fonctionnement des systèmes sols-plantes. Ils interviennent aussi sur le comportement d'autres éléments (phosphore, éléments en trace, soufre...) (Ehrlich, 2001). La connaissance des structures et des fonctions des communautés microbiennes impliquées doit progresser pour mieux définir ces processus microbiens. Mais, il importe aussi de déterminer les paramètres du milieu (aération, disponibilité et renouvellement des donneurs et accepteurs d'électrons et des sources de fer disponibles) qui contrôlent ces activités microbiennes.

### 3.1.2. Prélèvement du fer dans le sol par les graminées et les non graminées

Les plantes occupent un espace essentiel dans la chaîne alimentaire puisqu'elles sont à la base de l'acquisition des minéraux du sol et de l'assimilation du carbone et de l'azote, fournissant ainsi des éléments essentiels à la diète animale et humaine. Dans ce contexte, le fer est concerné à deux titres. En tant qu'élément métallique indispensable, l'acquisition du fer du sol par les plantes permet son entrée dans la biosphère. D'autre part, les réactions impliquées dans l'assimilation du carbone et de l'azote minéral se déroulent dans des organites subcellulaires spécifiquement végétaux, les plastes, et impliquent un nombre important de protéines contenant du fer sous forme d'hème ou de centre Fe-S.

Les plantes peuvent être subdivisées en graminées (céréales telles que le riz, le blé, le maïs...) et en non-graminées (légumes tels que le pois, la tomate, les salades...). Ces deux groupes n'utilisent pas les mêmes moyens pour acquérir le fer du sol en réponse à des conditions de manque. Chez *Arabidopsis*, plante modèle non-graminée dont le génome a récemment été entièrement séquencé, une carence en fer induit la synthèse d'une réductase des chélats ferriques (Robinson et *al.*, 1999), conduisant à la production de Fe(II) qui est transporté à l'intérieur de la racine par un transporteur localisé sur la membrane plasmique. Chez le Maïs, qui est une graminée, une carence en fer provoque la sécrétion par les racines d'acide déoxymuginéique (DMA), synthétisé à partir de la nicotianamine (NA), un précurseur très proche structurellement du DMA et synthétisé chez toutes les plantes à partir de la méthionine (von Wiren et *al.*, 1999). Le DMA fixe fortement le Fe(III) du sol et le complexe en résultant est transporté à l'intérieur des racines par un transporteur. Le mutant *ys1* de Maïs porte une mutation récessive monogénique sur le chromosome 5, et est déficient dans le transport du complexe Fe(III)-DMA, malgré une production et une sécrétion de DMA normales.

Une fois entré dans la racine, le fer est acheminé vers les parties aériennes sous forme de Fe(III)-citrate par la sève ascendante circulant dans les tissus vasculaires du xylème. A un niveau moléculaire, les transporteurs responsables de la charge et de la décharge en fer du xylème n'ont

pas encore été identifiés. Une fois délivré dans les cellules du mésophylle foliaire où se trouvent les chloroplastes impliqués dans l'assimilation du carbone, le fer est distribué dans les organites de ces cellules. Il a toutefois été montré que l'entrée de fer dans les chloroplastes impliquait un uniport de Fe(II) (Shingles et *al.*, 2002).

### **3.2. Quelques propriétés du sol en relation avec le fer**

Le fer, par ses oxydes et hydroxydes, est responsable de la couleur du sol: couleurs vives jaunes ou rouges lorsque le métal est à la valence 3; grises et ternes lorsqu'il est réduit. Il n'a pu toutefois être établi de relation quantitative entre la couleur et la teneur en fer. La couleur est une propriété en relation avec la surface des particules.

Un certain nombre de propriétés physiques sont en relation avec les teneurs en hydroxydes du sol. La structure a été étudiée par de nombreux auteurs et une relation entre la teneur en agrégats stables dans l'eau et la teneur en fer a été proposée. Le fer, en l'absence de matière organique, est le responsable de la structure. Relativement peu d'explications ont été proposées. La seule envisagée par les chercheurs ayant étudié ce problème est une coagulation mutuelle de plusieurs composés (dont l'hydroxyde ferrique). La cimentation de l'ensemble serait assurée par l'action d'organismes vivants (et surtout celle de leurs sécrétions).

Le fer doit être considéré pour les végétaux comme un oligoélément. Lorsqu'il vient à manquer pour une raison ou une autre (excès de calcaire déterminant précipitation de  $\text{Fe}^{3+}$  dans le sol, déséquilibre entre Fe et Mn), une maladie caractéristique se développe: la chlorose. Les moyens de lutte comportent essentiellement l'emploi de produits complexants ou séquestrants permettant l'assimilation commode du fer par la plante sans qu'il y ait fixation excessive dans le sol. Le fer est responsable de l'insolubilisation de l'acide phosphorique dans les sols acides. On peut lutter contre cette insolubilisation par apport de produits complexants (humus, lignine, etc.). Un excès de fer ferreux est parfois observé dans les rizières présentant un mauvais drainage. On note alors un développement défectueux de la plante contre lequel on peut lutter efficacement par une aération du sol (Segalen, 1964).

### **3.3. Formation des gisements de fer**

Différentes tentatives ont été effectuées pour expliquer la genèse et la localisation des minerais de fer. Krumbein et Garrels (1952) ont montré les relations très étroites qui existaient entre le pH et le potentiel d'oxydoréduction du lieu de la sédimentation ferrugineuse et ont donné des exemples précis basés sur les gisements d'Amérique du Nord. Harder (1919) a insisté sur l'importance des bactéries dans le dépôt de certains minerais en particulier  $\text{FeOOH}$ ,  $\text{CO}_3\text{Fe}$ ,  $\text{FeS}_2$ .

Une théorie générale a été présentée par Goldschmit en 1945, et reprise par Lombard en 1953. Elle peut se résumer ainsi: Après une orogénèse, l'érosion de la zone soulevée provoque d'abord un entrainement et un dépôt de sables puis d'argiles. Le continent penéplané peut alors se couvrir de ferrallites (si le climat le permet); l'érosion entrainera alors les oxydes de fer. On aboutira enfin aux carbonates et dépôts salins. En 1956, Erhart propose un cycle qui se déroule en sens inverse. Lorsque sur un continent se développe une végétation forestière, celle-ci fonctionne comme un filtre et provoque l'élimination des bases alcalines et alcalino-terreuses et de la silice. La destruction de la forêt se traduit par l'enlèvement des oxydes des argiles, puis des sables.

Termier (1956) estiment que la biorhexistasie doit conserver une valeur locale et s'appliquer aux périodes de calme tectonique et non aux orogénèses. C'est précisément le cas en Afrique intertropicale, dont la stabilité est grande depuis, le début du secondaire et qui n'a pas participé à l'orogénèse alpine.

Il appartiendra aux pédologues et aux géologues, par de nombreux exemples précis, d'apporter des arguments à la solution de ce problème. Dans cet ordre d'idées, une contribution importante à l'étude des gisements oolithiques du Niger vient d'être faite par Faure (1952). Cet auteur a insisté sur le fait que le fer doit d'abord être concentré quelque part, puis transporté vers le lieu de sédimentation.

En cours de route, le fer peut être immobilisé et mis en réserve, Ceci fait que les cycles sédimentaires où intervient le fer peuvent être assez complexes.

### **3.4. Gisement ferrifère d'Ait Ammar**

Il s'agissait de mine d'extraction du fer qui a été exploitée à partir du gisement pour environ 28 ans. Les résidus d'exploitation sont à l'origine d'un sol fortement pollué par le fer et le phosphate. La colonisation lente de ces sols par les espèces métallophytes engendre un paysage à la végétation clairsemée, composée d'herbacées et de petits ligneux, au sein d'une végétation méditerranéenne dense et forestière.

Cette mine est fermée depuis 1964. Cependant, aucun dispositif efficace n'a été mis en place pour gérer l'abandon de mine et pour maîtriser leur éventuel impact négatif à long terme sur l'environnement. En effet, des quantités importantes de rejets miniers constitués de résidus et de roches stériles ont été laissées sur place sans prévoir de travaux de réhabilitation. Ces rejets pourraient avoir des impacts négatifs sur l'environnement: pollution des sols, de l'eau, destruction ou perturbation d'habitats naturels, impact visuel sur les paysages...etc. il faut ajouter l'abandon de cavités souterraines et des infrastructures mal sécurisées. Ces cavités souterraines vides sont susceptibles, dans des contextes défavorables, d'engendrer une déformation des terrains de surface qui les surplombent. Un tel accident pourrait engendrer de graves conséquences en termes de sécurité publique, de dégâts sur le bâti et les infrastructures de surface et d'impacts sur l'environnement.

D'un point de vue réglementaire, aucune obligation de réhabilitation de ces sites après fermeture n'est indiquée dans le code minier marocain et aucune sanction n'est prévue contre les concessionnaires ou concessionnaires. Il est à signaler également qu'à l'échelle nationale, peu d'études se sont intéressées aux impacts environnementaux et sociaux des rejets des mines abandonnées (Bennisse et *al.*, 2004; Boularbah et *al.*, 2006; Abouddrar et *al.*, 2007; El Hamiani et *al.*, 2010 ).

## **II. Trésor minéral et biodiversité bactérienne**

### **1. L'environnement sol: un réservoir de diversité microbienne**

Le sol est probablement le plus intéressant de tous les environnements naturels pour les microbiologistes en ce qui concerne la taille de la communauté microbienne et la diversité d'espèces présentes. Il est un remarquable réservoir de micro-organismes. Whitman et *al.* (1998) ont estimé à  $2,6 \times 10^{29}$  le nombre total de cellules procaryotes vivant dans les sols. Différents types de micro-organismes sont représentés dans le sol où ils jouent un rôle crucial dans les cycles biogéochimiques des éléments. En moyenne, on compte  $10^7$  bactéries,  $10^5$  champignons,  $10^5$  protozoaires et  $10^4$  algues par gramme de sol sec (Robert et Chenu, 1992).

En se basant sur la cinétique de réassociation de l'ADN, le nombre de génomes bactériens distincts a été estimé entre 2000 et 18000 génomes par gramme de sol (Torsvik et *al.*, 1998; Torsvik et Ovreas, 2002). Ce nombre est une sous-estimation. En effet, il se peut que des génomes ne soient pas récupérés, notamment les génomes représentant des espèces rares, et soient exclus de ces analyses. L'extrême hétérogénéité spatiale, la nature polyphasique (incluant les gaz, l'eau et le matériel solide) et les propriétés chimiques et biologiques complexes de l'environnement sol contribuent à la diversité microbienne présente dans un échantillon de sol.

### **2. Influence des bactéries sur la transformation des éléments métalliques**

La dynamique des éléments traces dans les sols ne dépend pas seulement des interactions physico-chimiques avec les composés organiques et inorganiques mais aussi des processus associés aux interactions avec le compartiment biologique et les activités microbiennes.

Les interactions bactéries/métaux sont souvent étudiées selon deux approches:

- l'influence des éléments traces sur la population microbienne et leur fonction: les ETM sont réputés pour leur toxicité sur la plupart des micro-organismes telluriques. Leurs effets de dénaturation des protéines ou de destruction de l'intégrité de la membrane cellulaire

affectent la croissance, la morphologie et le métabolisme de ces micro-organismes telluriques (Leita et *al.*, 1995). Ces altérations conduisent à des réductions de biomasse microbienne. De nombreuses études montrent que la biomasse bactérienne d'un sol a tendance à diminuer suite à une contamination par un métal (Bååth et *al.*, 1998; Konopka et *al.*, 1999). D'ailleurs, Giller et *al.* (1998) estiment que, même à long terme et pour des faibles teneurs en métaux lourds, les micro-organismes ne sont pas capables de maintenir une biomasse équivalente à celle d'un sol non pollué.

- l'influence des micro-organismes sur la transformation et/ou la mobilisation des éléments.

Nous nous intéressons à développer la deuxième approche dans ce qui suit. Les micro-organismes ont mis en place des systèmes de résistance et de détoxification envers les métaux. Ces différents mécanismes mis en place sont (Van Elsas et *al.*, 1997):

- \* l'inactivation ou la compléxation des métaux, par exemple par la production de sulfure d'hydrogène qui va réagir avec l'ion métallique et former ainsi un composé insoluble;
- \* l'altération du site cellulaire inhibé par le métal;
- \* l'imperméabilisation des cellules aux métaux, par la formation d'une capsule extracellulaire qui retient le métal;
- \* la mise en place de pompe à efflux où le métal entre dans la cellule en général par des transporteurs de composés essentiels et la pompe à efflux va faire ressortir le métal de la cellule;
- \* la volatilisation des métaux par des réactions enzymatiques.

En plus de ces mécanismes de résistance ou de détoxification, il existe d'autres mécanismes d'interactions des bactéries avec les métaux détaillés ici (Van Elsas et *al.*, 1997; Adriano et *al.*, 2004; Huang, 2004) et présentées dans la figure 1:

- l'accumulation intracellulaire par des transports actifs ou passifs des métaux vers l'intérieur des cellules où ils sont immobilisés;
- l'association métal-cellule: les métaux sont associés aux parois microbiennes. En effet, tous les micro-organismes contiennent des biopolymères tels que les protéines, les acides nucléiques et les polysaccharides qui présentent des sites potentiels de liaison pour les métaux. Ces sites de liaisons sont des groupes chargés négativement tel que les carboxylates, thiolates, phosphates et amines. A cause de ces nombreux sites de liaisons, de grandes concentrations en métaux sont associées aux bactéries (Huang, 2004);
- l'interaction métal-sidérophore: les sidérophores (protéines possédant un site de fixation du fer) sont produits par les micro-organismes pour aider à l'utilisation du fer;
- l'immobilisation extracellulaire des métaux par des métabolites bactériens;
- l'interaction polymères extracellulaires-métaux: les polysaccharides principalement;
- les transformations enzymatiques telles que la méthylation et la déméthylation pouvant conduire à la volatilisation.

Les réactions telles que les réactions d'oxydo-réduction, de compléxation, de chélation, d'adsorption et de méthylation conduisent soit à la solubilisation ou la volatilisation des métaux, soit à leur insolubilisation (Gadd, 2004).

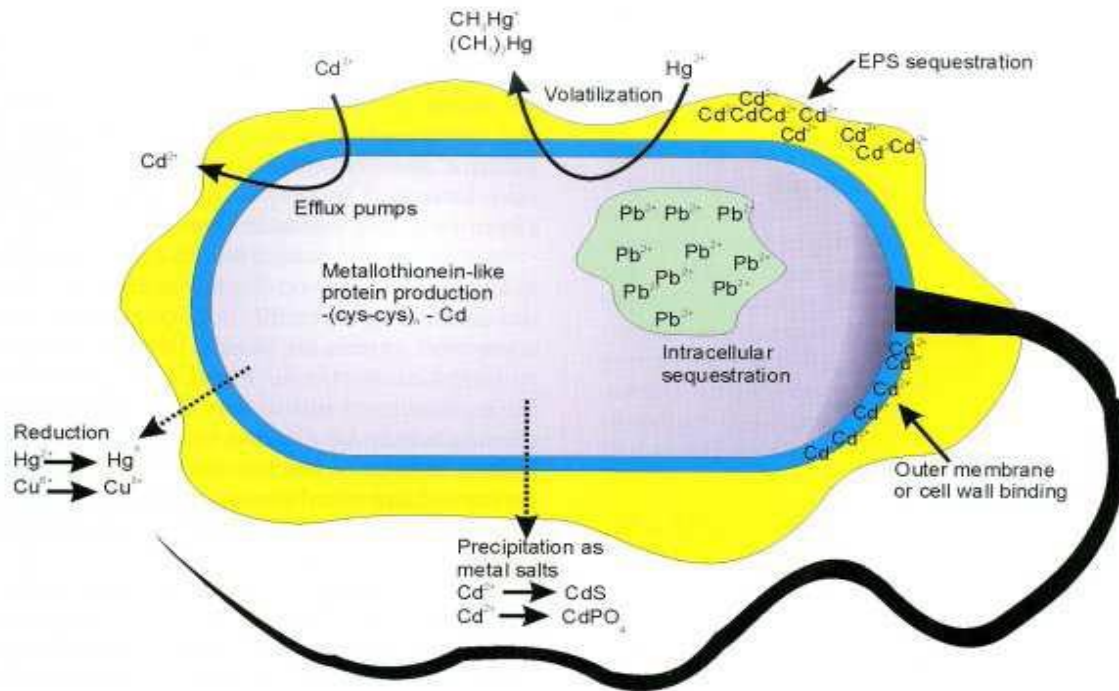


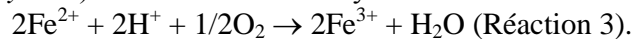
Figure 1. Interactions bactéries métaux (Maier et al., 2000).

### 2.1. Les mécanismes entraînant la mobilisation des métaux

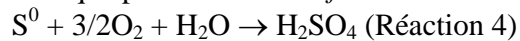
Les micro-organismes peuvent mobiliser les métaux à travers des lixiviations autotrophes et hétérotrophes soit par chélation à des métabolites et des sidérophores microbiens ou par méthylation ce qui peut résulter en une volatilisation. Certains processus peuvent être liés à la dissolution des composés métalliques insolubles et des minéraux incluant les oxydes, les phosphates et les sulfures. Tandis que d'autres peuvent être liés à la désorption des espèces métalliques à partir de sites d'échanges tels que les argiles ou la MO. Cinq types de solubilisation ou de mobilisation sont décrits ici: lixiviation hétérotrophe, lixiviation autotrophe, biométhylation, les transformations d'oxydoréduction (Gadd, 2004):

- les mécanismes hétérotrophes incluent l'acidification de l'environnement bactérien par des pompes à efflux (ex: ATPase) ou par l'accumulation de dioxyde de carbone résultant de la respiration. L'acidification peut amener une émission de métaux par de nombreux chemins (par exemple la compétition entre les protons et les cations métalliques (Gadd, 2004)). Le métabolisme hétérotrophe peut aussi amener à une lixiviation qui est le résultat de l'efflux de composés acides (Gadd, 2004). Les micro-organismes tels que *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* sont capables d'acidifier le milieu et d'entraîner ainsi la solubilisation des métaux par la production d'acide nitrique (lors de l'oxydation de l'ammonium);
- La plupart des lixiviations autotrophes sont réalisées par les bactéries chimiotrophes, acidophiles. On peut citer par exemple les mécanismes suivants:
  - ❖ Les bactéries sulfo-oxydantes du genre *Thiobacillus* sont capables de catalyser directement l'oxydation des sulfures métalliques (MS) insolubles en présence d' $O_2$  (Boon et al., 1998). Il s'ensuit la libération en solution d'un métal bivalent ( $Me^{2+}$ ) généralement soluble sous forme de sulfate:
 
$$MS + 2O_2 \rightarrow MSO_4 \text{ (Réaction 1).}$$
  - ❖ L'oxydation des sulfures peut avoir lieu par voie indirecte (Harvey et Crundwell, 1997; Boon et Heijnen, 1998; Boon et al., 1998). En effet, certaines bactéries peuvent générer du fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) qui oxydent les sulfures métalliques en milieu acide:
 
$$MS + 2Fe^{3+} \rightarrow M^{2+} + S^0 + 2Fe^{2+} \text{ (Réaction 2).}$$

Un cycle qui accélère la réaction chimique d'oxydation des sulfures peut se mettre en place. Les bactéries ferro-oxydantes (*Thiobacillus ferrooxydans* et *Leptospirillum ferrooxydans*) réalisent ensuite l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique:



Ainsi, les bactéries n'ont plus besoin d'être en contact avec le minéral et elles accélèrent la ré-oxydation des ions ferreux très lente en absence de bactérie. Cela peut conduire en une amplification progressive de la dissolution chimique des sulfures métalliques dans le cas de la présence de sulfure de fer. La réaction (1) génère du sulfate de fer ferreux. Ce dernier sera également transformé en fer ferrique sous l'action des bactéries (réaction 3) contribuant ainsi à l'amplification progressive de la dissolution chimique du sulfure métallique (réaction 2). Le soufre élémentaire ( $\text{S}^0$ ) formé (réaction 2) peut être oxydé en acide sulfurique par *Thiobacillus ferrooxidans* et *Thiobacillus thiooxidans*:



La production d'acide sulfurique permet le maintien de l'acidité de la solution à un pH favorable au développement des bactéries ferrooxydantes et à la solubilisation des métaux. L'ensemble de ce processus résulte donc de l'action d'une population bactérienne mixte constituée de trois espèces (*Thiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans* et *Leptospirillum ferrooxydans*) (Battaglia-Brunet et al., 1998).

- Les sidérophores sont des ligands très spécifiques du  $\text{Fe}^{2+}$ . Ces molécules sont excrétées pour aider l'assimilation du fer (Gadd, 2004);
- La méthylation de l'Hg ou de l'As peut être réalisée par des bactéries et des champignons en conditions aérobies et anaérobies. (Adriano et al., 2004; Gadd, 2004);
- Les micro-organismes peuvent mobiliser les métaux par des processus de réduction et d'oxydation (Gadd, 2004). Voici quelques exemples de ces mécanismes:
  - ❖ la réduction des oxydes de Fe et Mn peut être catalysée directement par les bactéries telles que *Clostridium* et *Bacillus*;
  - ❖ la réduction des oxydes de Fe et de Mn peut se produire également de manière indirecte par des agents réducteurs. Ces agents réducteurs peuvent provenir de la transformation de la matière organique (substances humiques, catéchols,...) ou de la libération de métabolites microbiens (oxalate, pyruvate...) (Isaure, 2001).

## 2.2. Les mécanismes entraînant l'immobilisation des métaux

Les quatre principaux mécanismes d'insolubilisation ou d'immobilisation sont la biosorption et l'accumulation intracellulaire, la liaison des métaux aux biomolécules, la précipitation par les bactéries sulfato-réductrices et la précipitation par la phosphatase. Ces quatre mécanismes sont explicités ci-dessous:

- la biosorption peut être définie comme la rétention de composés organiques ou inorganiques par des mécanismes physico-chimiques de sorption sur du matériel biologique. La sorption peut se faire sur les surfaces cellulaires. Certaines espèces cationiques peuvent être accumulées dans la cellule via des systèmes de transport membranaires. A l'intérieur de la cellule les métaux peuvent être liés, précipités, localisés à l'intérieur des structures intracellulaires... Les groupes carboxyles des peptidoglycanes sont les principaux sites de fixation des cations pour les bactéries gram<sup>+</sup> et les groupements phosphates chez les Gram<sup>-</sup> (Gadd, 2004);
- de nombreux composés spécifiques et non spécifiques pour la liaison des métaux sont produits par les micro-organismes. Les composés non spécifiques sont les acides organiques simples, les alcools et des macromolécules telles que les polysaccharides, les acides humiques et fulviques. Les polymères extracellulaires peuvent aussi adsorber des particules telles que les oxydes et les sulfures de métaux. Des protéines de faible poids moléculaire spécifiques pour la liaison des métaux sont produites en présence de métaux (Gadd, 2004);
- la précipitation des métaux sous forme de sulfures insolubles peut se produire grâce aux bactéries sulfato-réductrices. Elles sont capables de réduire en milieu anoxique les sulfates



suite à l'oxydation des composés organiques (lactate, acétate, pyruvate) issus de la dégradation de la matière organique. Il se forme alors dans le sédiment de fortes quantités de métaux sous forme de sulfures qui forment avec les métaux des phases solides quasiment insolubles. C'est un processus important de précipitation des métaux lors de la diagenèse (Calmano et al., 1993);

- dans les processus de précipitation par la phosphatase, une phosphatase libère du phosphate inorganique à partir d'une molécule organique donneuse de phosphate. Les cations métalliques sont ainsi précipités sous forme de phosphates dans la biomasse.

Les caractéristiques géochimiques du sol ont une influence sur les activités microbiennes, de la même manière que les activités microbiennes ont une influence sur les caractéristiques géochimiques du sol (Dassonville et Renault, 2002).

Tous ces processus de solubilisation et d'immobilisation des métaux sont utilisés dans les procédés de biorémediation des métaux dans les sols, les sédiments, les boues de stations d'épuration. Les synthèses de Gadd (2004) et Wiatrowski et Barkay (2005) montrent les différentes applications possibles de ces mécanismes dans la biorémediation.

En plus de ces fonctions de catalyseurs chimiques, les bactéries ont un rôle structural sur les sols. En effet, dans la nature, la plupart des bactéries «préfèrent» vivre sur des surfaces biotiques ou abiotiques (Matsuyama et Nakagawa, 1996). Les bactéries dans l'environnement sont principalement liées aux limons et aux argiles (Singh et Singh, 1995) et à la matière organique (Huang, 2004). Elles vont adhérer à ces surfaces pour former des biofilms et joueront un rôle important dans la formation des agrégats.

### 3. Les marqueurs moléculaires

Zuckerkindl et Pauling (1965) ont été les premiers à considérer les molécules comme des marqueurs de l'histoire évolutive et ont développé le concept d'horloge moléculaire. Quelques années plus tard, Woese et Fox (1977) ont procédé à des comparaisons systématiques de séquences d'ARNr. Ils ont ainsi constaté que ces molécules sont des marqueurs phylogénétiques pertinents et fiables, car:

- elles sont présentes dans tous les organismes;
- elles sont abondantes dans la cellule;
- elles accomplissent un rôle important dans la cellule et leur structure secondaire a été conservée durant l'évolution;
- elles possèdent des régions hautement conservées ou variables. Certaines sont identiques dans l'ensemble des bactéries et sont ciblées par des amorces universelles. D'autres sont spécifiques à un groupe et permettent l'identification des taxa (espèce, genre, phyla ou encore domaine). La comparaison de régions conservées permet d'évaluer les relations phylogénétiques entre micro-organismes éloignées, tandis que les régions variables permettent l'étude d'espèces plus proches;
- elles ont une taille adéquate pour les méthodes moléculaires.

En quelques années, l'analyse comparative des séquences de la petite sous-unité des ARNr amplifiées à partir de souches pures et d'échantillons environnementaux a totalement changé notre vision de la biosphère et a permis de reconstruire l'arbre de la vie. Les organismes vivants sont alors répartis en trois domaines : *Bacteria*, *Archaea* et *Eucarya*.

Les procaryotes possèdent trois molécules d'ARNr: l'ARNr 5S, l'ARNr 16S et l'ARNr 23S, réparties dans deux sous-unités et codées par des gènes généralement organisés en opéron. Bien que l'ARNr 23S possède une plus grande quantité d'information phylogénétique (~2300 nt), sa taille plus importante et la présence de structures secondaires particulièrement marquées ont longtemps rendu son clonage et son séquençage difficile. De plus, l'efficacité de l'ARNr 5S (~120 nt) pour l'étude de communauté complexe est limitée par sa petite taille. Par conséquent, les bases de données de séquences d'ARNr 16S (~1500 nt) sont rapidement devenues plus importantes et ont permis de mieux comparer les bactéries.

L'ARNr 16S est devenu le marqueur de référence pour identifier et déterminer les relations phylogéniques entre les différentes bactéries (Muyzer et Ramsing, 1995). L'identification d'une bactérie peut être simplement réalisée en évaluant la position de sa séquence d'ARNr 16S au sein d'un arbre phylogénétique. Deux bactéries appartiennent à la même espèce si leur ARNr 16S présente plus de 98,5 % d'homologie de séquence. Néanmoins, Normand et al. (1996) ont indiqué que le gène codant l'ARNr 16S n'est souvent pas assez divergent pour permettre une bonne séparation au sein d'espèces d'un même genre. Ce problème peut être résolu par l'analyse de la région localisée entre les gènes codant l'ARNr 16S et l'ARNr 23S, caractérisée par une taille et une composition de séquences fortement variables au sein de groupes phylogénétiquement proches et donc bien plus discriminante pour étudier la diversité de bactéries étroitement apparentées (García-Martínez et al., 1999).

Le choix de l'ARNr 16S pour déterminer la phylogénie bactérienne s'est basé sur une diversité de séquences purement due aux changements évolutifs et non pas influencée par des transferts horizontaux. Pourtant, dès 1993, Sneath a mis en évidence l'échange horizontal de fragments de gènes codant l'ARNr 16S chez des espèces d'*Aeromonas*. D'autres études ont mis en évidence des transferts latéraux de fragments de gènes d'ARNr chez des espèces de *Rhizobium*, *Helicobacter*, *Bradyrhizobium* et d'actinomycètes (Wang et Zhang, 2000; Parker, 2001; Schouls et al., 2003; Dewhirst et al., 2005). Des transferts d'opérons *rrn* complets, inter- ou intra-espèces peuvent également avoir lieu (Lan et Reeves, 1998; Yap et al., 1999). Bien que ces événements restent rares, leur possibilité impose une vérification plus rigoureuse de la validité d'arbres phylogénétiques basés sur les ARNr.

Si l'analyse des gènes codant l'ARNr 16S (ou d'autres marqueurs phylogénétiques) permet d'identifier les espèces présentes au sein d'une communauté bactérienne dans un environnement donné, l'analyse des ARNr (après une transcription inverse) permet la détection et l'identification d'espèces métaboliquement active, car la quantité d'ARNr produit est directement relié à l'activité de croissance des bactéries (Wagner, 1994).

#### **4. Outils de caractérisation de la population bactérienne**

L'étude d'une communauté microbienne peut être réalisée d'un point de vue de la diversité génétique mais aussi dans un point de vue du potentiel métabolique. La corrélation entre ces deux approches a été le sujet de nombreux travaux de recherches (Xue et al., 2008; Cycoń et al., 2013). La réponse métabolique d'une communauté face à des facteurs biotiques ou abiotiques reste un facteur important pour la caractérisation fonctionnelle de cet écosystème.

##### ***II.1. Les activités métaboliques***

L'analyse de la diversité métabolique peut être réalisée en examinant le comportement catabolique d'un individu ou d'une communauté vis-à-vis de plusieurs substrats. Les données concernant la dégradation de ces substrats peuvent être rassemblées formant ainsi un profil métabolique. Bochner (1989) propose l'utilisation de systèmes de microplaques (Biolog<sup>®</sup>), contenant différents substrats carbonés pour réaliser l'identification de différentes souches de bactéries. Plus tard, (Garland et Mills, 1991) ont adapté son utilisation à l'étude des communautés microbiennes.

Les empreintes métaboliques générées par cette méthode seront la base de plusieurs études en écologie microbienne (Insam et al., 1997). Le carbone étant un facteur clé dans plusieurs écosystèmes microbiens (Grayston et al., 1998). L'utilisation de cette technique apparaît spécialement adaptée pour la détermination de la versatilité métabolique d'un échantillon environnemental.

##### ***II.2. Diversité bactérienne: Etude de la structure génétique des bactéries***

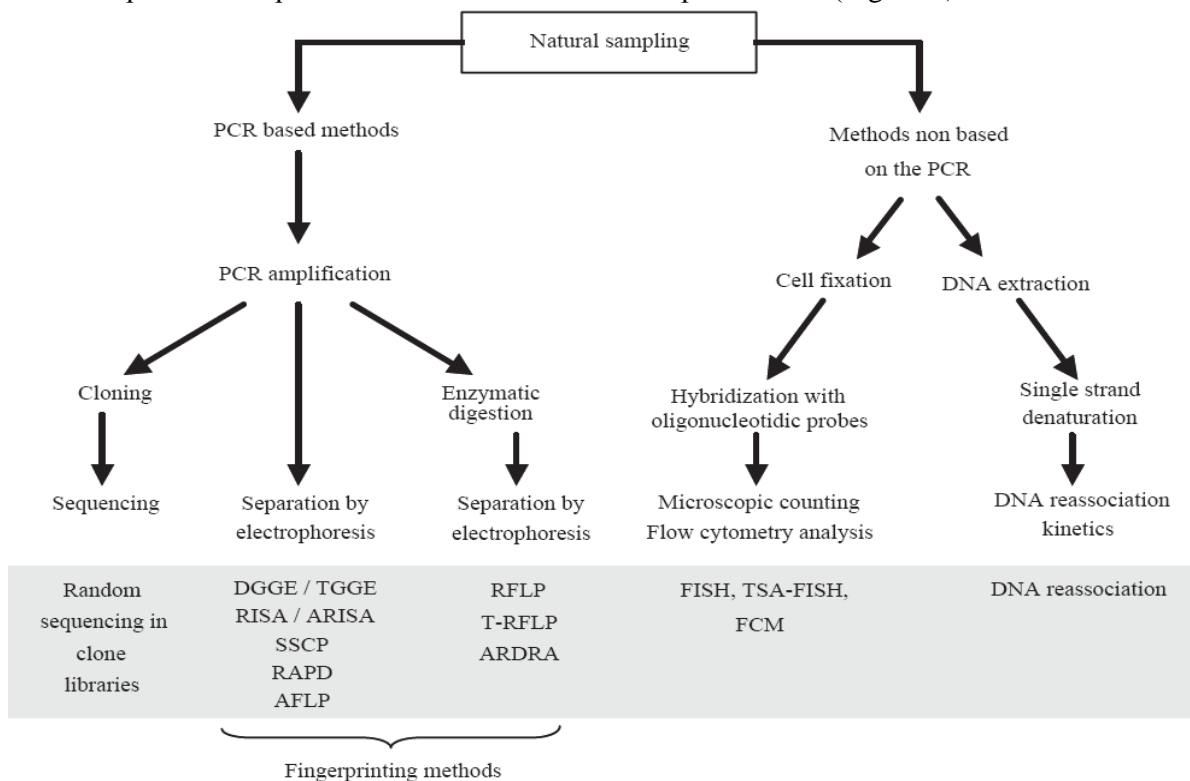
Le concept de la diversité comporte deux notions qui doivent être considérées de façon simultanée: la première concerne le nombre d'unités systématiques (nombre d'espèces = richesse)

présentes dans un écosystème donné et la seconde se rapporte à la façon dont les individus des diverses espèces se répartissent (Ramade, 2002).

Il est impossible d'étudier la structure d'une communauté bactérienne dans un sol sans utiliser des outils de biologie moléculaire; les espèces trop nombreuses et l'impossibilité de cultiver toutes les bactéries en font un outil indispensable. En effet, des études ont montré que dans les sols seulement 0,1 à 10 % des bactéries étaient prises en compte par les approches de cultures (Torsvik et Ovreas, 2002). Pour étudier la diversité bactérienne, il existe de nombreuses techniques moléculaires indirectes basées sur l'isolement et l'analyse des acides nucléiques (ADN et ARN) qui ont été développées à partir d'échantillons de sol sans mise en culture des micro-organismes. Plusieurs protocoles d'isolement de l'ADN microbien du sol ont été publiés (Steffan *et al.*, 1988; Miller *et al.*, 1999; Hurt *et al.*, 2001). Les méthodes détaillées ci-dessous ne sont pas exhaustives, il s'agit des techniques les plus employées lors de l'étude de la structure génétique de la communauté bactérienne. Certaines permettent de quantifier la séquence cible (séquence d'ADN choisi en fonction de ses caractéristiques) par conséquent de connaître le nombre de copies de la séquence (PCR quantitative) et d'autres offrent des indications sur la composition de la population (PCR-DGGE, séquençage...).

Les propriétés électriques de la molécule d'ADN (la molécule étant chargée négativement) permettent de séparer les molécules en fonction de leur taille ou de leur encombrement stérique sur des gels d'agarose ou d'acrylamide.

Parmi les méthodes de biologie moléculaire existantes permettant d'étudier la diversité bactérienne, deux grandes familles se distinguent : les techniques faisant appel à une amplification de l'ADN par PCR au préalable et celles ne nécessitant pas de PCR (Figure 2).



**Figure 2** Schéma des différentes approches moléculaires pour évaluer la diversité génétique des communautés bactérienne (Dorigo *et al.*, 2005).

DGGE: Denaturing gradient gel electrophoresis, TGGE: Temperature gradient gel electrophoresis, RISA: Ribosomal intergenic spacer analysis, ARISA: Automated ribosomal intergenic spacer analysis, SSCP: Single strand conformation polymorphism, RAPD: Random amplified polymorphic DNA, AFLP: Amplified fragment length polymorphism, (t)-RFLP: (terminal)- Restriction fragment length polymorphism, ARDRA: Amplified ribosomal DNA restriction analysis, (TSA)-FISH: (tyramide signal amplification)-Fluorescence in situ hybridization, FCM: Flow cytometry.

La PCR est une technique qui permet une polymérisation en chaîne de l'ADN en synthétisant un grand nombre de molécules. Ce type de réaction est possible depuis la découverte de la Taq Polymérase qui est une enzyme de synthèse de l'ADN et qui supporte de fortes températures. On introduit un tampon, des amorces (choisies en fonction du gène à amplifier) ainsi que des nucléotides (dNTPs) dans le milieu réactionnel. L'ADN est chauffé à 90-95 °C pour être dénaturé, les amorces grâce à une diminution de la température (40-70 °C selon les amorces) peuvent s'hybrider au niveau d'une séquence homologue sur le brin d'ADN à dupliquer et par une nouvelle augmentation de la température (72 °C) on peut synthétiser le nouveau brin d'ADN. Ce cycle de dénaturation, hybridation, synthèse est répété un grand nombre de fois et à chaque fois le nombre de séquences amplifiées est multipliée par deux. On obtient à la fin un nombre important de copies du gène d'intérêt (Maier et *al.*, 2000).

Lors de l'étude de la communauté totale, le gène le plus utilisé est le gène codant pour l'ARNr 16S. Ce gène code pour la petite sous unité du ribosome des bactéries. Il est présent chez toutes les bactéries, contient des séquences conservées qui peuvent être utilisées pour l'amplification et qui encadrent des régions variables permettant la différenciation des génotypes. Ce gène est choisi car il est présent chez toutes les bactéries et les comparaisons de séquences de l'ARNr 16S peuvent être établies par des méthodes standards d'identification des espèces bactériennes. De plus, le succès des méthodes basées sur l'amplification d'un gène (codant pour l'ARNr 16S ou autre) ne dépend pas de l'état physiologique des cellules dont provient l'ADN, mais seulement de la quantité et de la qualité de l'ADN extrait.

Les méthodes nécessitant une PCR donnent des informations intéressantes concernant la diversité bactérienne. Elles sont plus appropriées que les techniques ne nécessitant pas de PCR pour des études de diversité bactérienne dans le cas de populations complexes telles que celles des sols, des sédiments et des milieux aquatiques. Toutefois certains biais issus de la PCR peuvent être induits dans la mesure. L'amplification par PCR peut éventuellement induire la présence d'hétéroduplex ou d'amplifications préférentielles.

C'est la PCR-DGGE qui a été choisie ici comme technique pour aborder la structure génétique de la communauté bactérienne. La PCR-DGGE est parmi les techniques de biologie moléculaire permettant une analyse de la diversité bactérienne sur notre type de matrice.

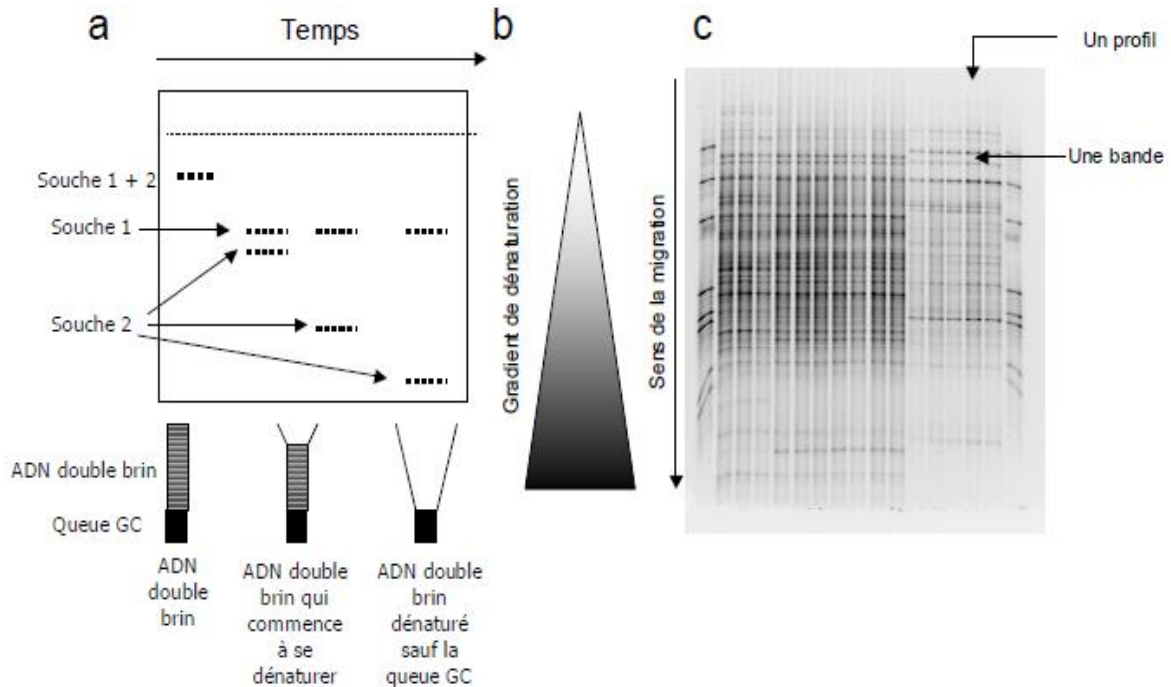
La PCR-DGGE est basée sur l'étude du polymorphisme d'un gène choisi. Le gène est amplifié par PCR et les fragments d'ADN ainsi obtenus seront de même taille mais pourront être de séquences différentes selon l'organisme dont ils sont issus. Les différentes séquences sont ensuite séparées par électrophorèse sur un gel contenant un gradient de dénaturant chimique. Grâce à la séparation des différentes séquences, on obtiendra une empreinte génétique de la communauté.

La molécule d'ADN chargée négativement migre dans le gel d'acrylamide par électrophorèse. La migration s'effectue dans un gradient dénaturant croissant. Les fragments d'ADN introduits sous forme de doubles brins migrent dans le gel jusqu'à ce que l'action des agents dénaturants provoque la dissociation du double brin en simple brin (Figure 3). Les doubles brins, grâce au gradient des agents dénaturant, vont donc se séparer à des temps de migration différents en fonction de leur  $T_m$  et donc de leur séquence. Ce changement de conformation, plus encombrante, freine, voire arrête, la migration (Muyzer et *al.*, 1993). La migration des fragments d'ADN double-brin, présentant des différences de séquences dans leur domaine de fusion, est ainsi ralentie ou stoppée à des positions variables le long du gradient de concentrations en substances dénaturantes.

La PCR-DGGE utilise le fait que les molécules d'ADN qui ont la même longueur mais qui diffèrent d'un seul nucléotide peuvent être séparées par électrophorèse à travers un gradient chimique linéaire tels que l'urée et le formamide (Muyzer et *al.*, 1993). La séparation complète des brins est empêchée par une séquence dont le  $T_m$  est élevé, la queue GC séquence riche en GC de 40 paires de bases sur l'une des deux amorces lors de la PCR et fait donc partie du brin amplifié. La présence de cette queue GC évite la dissociation totale de l'ADN double brin en

ADN simple brin à mobilité plus rapide qui risquerait de ne pas être visible dans les conditions de migrations employées.

A la fin de la migration, la révélation du gel fait apparaître des bandes horizontales sur chacun des profils (Figure 3). Une bande symbolise en théorie un génotype (une séquence du gène étudié).



**Figure 3.** Principe de la DGGE.

a) DGGE sur deux souches en fonction du temps (de gauche à droite l'évolution de la dénaturation le long du gel d'après [van Elsas *et al.*, 1997]), b) sens du gradient de dénaturation et de migration du gel, c) exemple d'un gel.

L'avantage principal de la PCR-DGGE, par rapport à d'autres techniques tel que le clonage-séquençage, permet d'étudier un grand nombre d'échantillon. Le fait que les bandes présentes sur le gel peuvent être excisées et séquencées est un autre avantage de cette technique. Par contre, les principales limites de cette technique résident i) dans la difficulté de comparer les échantillons de gels différents ce qui implique de faire de multiples gels avec de multiples combinaisons ; ii) des fragments d'ADN, avec des séquences différentes peuvent migrer ensemble, ce qui limite la sensibilité de la méthode (Van Elsas *et al.*, 1997; Ranjard *et al.*, 2000; Dorigo *et al.*, 2005) iii) une espèce peut être représentée par plusieurs bandes car une espèce peut avoir plusieurs séquences différentes du gène codant pour l'ARN16S (Ranjard *et al.*, 2000). D'autres problèmes liés à la fois à la PCR et à la DGGE peuvent apparaître (Volatier, 2004): une espèce présente qui ne serait pas représentée (limite de détection), une espèce représentée par plusieurs bandes (microhétérogénéité des copies des gènes amplifiés) (Van Elsas *et al.*, 1997), une bande qui ne correspond pas à un authentique produit PCR (par exemple un hétéroduplexe), une bande dont l'intensité n'est pas représentative de l'abondance relative de l'espèce (amplification préférentielle par exemple).

Pour finir, étant donné que la séparation de produits PCR dont la taille est supérieure à 500 paires de bases est difficile, l'information obtenue par DGGE sur la séquence est limitée [van Elsas *et al.*, 1997; Ranjard *et al.*, 2000]. Toutefois, la PCR-DGGE est un bon outil pour comparer des échantillons entre eux dans le but d'évaluer l'impact d'une contamination par exemple.

### **II.3. Apport des nouvelles technologies à haut débit**

#### **II.3.1. Séquençage**

Traditionnellement, l'étude de gènes à partir d'un environnement naturel incluait le clonage d'un ADN dans un vecteur, l'insertion du couple vecteur-insert dans une bactérie hôte, le criblage

et le séquençage de l'insert par la technique de Sanger. Les méthodes de séquençage par synthèse fournissent des méthodes rapides et plus simples pour séquencer le métagénome en contournant les biais de clonage liés à la méthode Sanger. Les nouvelles technologies de séquençage diffèrent dans le type de sortie, la longueur de lecture, la vitesse et la distribution du taux d'erreur. L'objectif de cette partie est de décrire les différentes techniques de séquençage et de présenter une synthèse sur les applications et les impacts de ces techniques pour l'étude de la diversité bactérienne.

Le pyroséquençage haut débit développé par la société "454 Life Sciences" (Connecticut USA) utilisant les séquenceurs GS FLX (Roche), a été appliqué pour l'étude de communautés microbiennes par des approches de métagénomique (Liu et *al.*, 2007). Cette technique permet d'avoir accès à de milliers de séquences simultanément, évitant le biais du clonage, une fois que la quantité d'ADN requise est très faible (Harkins et Jarvie, 2007).

Le "Illumina sequencing" ou "Solexa sequencing" est aussi une technique de séquençage nouvelle génération, souvent utilisée dans des études d'écologie microbienne (Lecroq et *al.*, 2011). Elle permet un débit de séquence encore plus important que le Pyroséquençage (GS FLX titanium) (Tableau 1).

**Tableau 1.** Comparaison des techniques de séquençage. D'après Hugenholtz P et Tyson GW: Microbiology: metagenomics. *Nature* 2008.

Méthode de séquençage	Productivité (Mb/heure)	Coût (€ par base)	Taille des séquences (pb)
Sanger (ABI 3730xl)	0,07	0,75	700 - 900
Pyroséquençage (GS FLX titanium)	400	0,0023	400
Illumina/Solexa (GAii)	2000	0,0005	35

Néanmoins, ces deux techniques présentent l'inconvénient de générer des fragments très courts, ce qui requiert des techniques de co-assemblage de séquences, à partir d'alignements avec des données de référence et utilisant des algorithmes d'insertion/délétion (Hugenholtz 2002; Ludwig et *al.*, 2004). Ces procédures peuvent conduire à des erreurs de reconstruction phylogénétiques qui affectent ainsi l'interprétation des résultats (Fox et *al.*, 1977; Liu et *al.*, 2007).

### II.3.2. Applications et impact des différentes techniques de séquençage dans l'étude de la diversité microbienne des sols

Les nouvelles générations de séquençage d'ADN permettent d'obtenir des données de séquences très importantes (ordre de grandeur: la gigabase) pour une variété d'applications. Nous nous intéressons dans cette synthèse bibliographique plus particulièrement aux applications du séquençage liées à l'étude des communautés microbiennes par l'analyse des gènes ARNr 16S. La plupart des études métagénomiques actuellement décrites sont basées soit sur la technique 454 (Roesch et *al.*, 2007) soit sur le séquençage conventionnel de type Sanger (Morales et *al.*, 2009). La raison principale étant la longueur de lecture, en effet plus grande sera la longueur du fragment d'ADN ribosomique séquencé plus informative sera son analyse et donc plus précis et juste sera le positionnement phylogénétique et taxonomique de l'organisme à l'origine du gène étudié (Wang et *al.*, 2007). Etant donné que le sol est considéré comme le plus important réservoir de biodiversité bactérienne en termes de nombre de populations bactériennes différentes, ce ci suscite un grand intérêt pour estimer la richesse génomique. L'utilisation de la cinétique de réassociation de l'ADN appliquée à l'ADN extrait du sol a permis d'estimer le nombre d'espèces bactériennes dans un gramme de sol à environ 10 000 (Torsvik et *al.*, 1990). Récemment cette estimation a été réévaluée, ce qui a permis de prédire que près de  $10^7$  espèces microbiennes pouvaient coloniser un gramme de sol (Gans et *al.*, 2005), une valeur trop élevée pour être vérifiée par les technologies de séquençage actuelles (Gans et *al.*, 2005). D'autres études ont tenté d'estimer le nombre d'espèces bactériennes dans un gramme de sol par extrapolation basée sur l'amplification, le clonage puis le séquençage des gènes ARNr 16S. Schloss et Handelsman (2005) ont estimé ce

nombre d'espèces compris entre 2000 et 5000 à partir d'une banque de clones ADNr 16S riche de 1033 et 600 clones, respectivement. En fait, aucune des estimations indiquées dans la littérature n'est basée sur un nombre suffisant de séquences pour fournir une extrapolation raisonnable. En effet, le nombre d'espèces détectées dans un échantillon est fortement influencé par le nombre de séquences analysées (Schloss et Handelsman, 2005). Roesch et *al.* (2007) ont obtenu la plus importante banque de séquences ARNr 16S (53 533), en utilisant la technique de pyroséquençage 454 (Roesch et *al.*, 2007). Le nombre d'OTU unique alors estimé par extrapolation est d'environ 6000 par gramme de sol. Incontestablement, les avancées des technologies de séquençage durant la dernière décennie ont des retombées directes sur l'étude de la diversité microbienne, la résolution étant de plus en plus fine. Ces technologies offrent ainsi la chance de répertorier, identifier et caractériser des bactéries appartenant à des phylums totalement inconnus même si ces études peuvent encore être limitées par des biais d'extraction de leur ADN, d'amplification, de clonage ou de séquençage.

### II.3.3. Identification et taxonomie

L'identification d'un micro-organisme consiste à déterminer à quel groupe taxonomique il appartient. Cette notion présuppose donc une classification existante. Le processus d'identification est basé sur la comparaison des propriétés phylogéniques ou biochimiques de l'espèce isolée par rapport à plusieurs souches considérées comme représentatives.

Jusqu'au début des années 1960, la taxonomie microbienne s'appuyait sur des méthodes biochimiques et phénotypiques (taxonomie phénotypique et numérique) basées sur le comportement métabolique d'un isolat vis à vis de certains substrats et sur un nombre restreint de caractères tels que la morphologie ou la taille. Cette classification s'est révélée inefficace, fournissant peu d'information pour l'identification de beaucoup d'organismes.

Suite à l'avènement des méthodes moléculaires, Fox et *al.* (1977) proposent les acides nucléiques comme marqueurs de l'évolution et d'identification des organismes. Cette nouvelle approche, basée sur le principe que chaque micro-organisme possède un génome qui lui est spécifique, a pallié les limitations inhérentes aux méthodes classiques et a modifié profondément la classification des micro-organismes.

L'identification moléculaire s'effectue par l'analyse comparative de séquences d'un gène ou de régions orthologues aux organismes étudiées. Woese (1987) suggère la possibilité d'utiliser du gène de l'ADNr 16S comme marqueur de phylogénie. La même année, Wayne et *al.* (1987) définie l'espèce procaryote et considère que deux souches appartiennent à une même espèce si les valeurs d'hybridation ADN-ADN sont supérieures ou égales à 70 %. Compte tenu de la généralisation de l'usage de l'ADNr pour l'identification des espèces et les progrès concernant la connaissance de la systématique bactérienne, l'International Committee on Systematics of Prokaryotes (ICSP) en 2002, a revu la définition d'espèce, considérant que des souches présentant plus de 97 % d'homologie de l'ADNr appartient à la même espèce (Stackebrandt et *al.*, 2002).

L'étude de l'ADNr s'est avérée pertinente, notamment la région D1 / D2 de la grande sous-unité (Kurtzman et Robnett, 1998). L'information générée par ces approches conduira à des décisions taxonomiques importantes.

### II.3.4. Analyse phylogénétique

La phylogénie permet d'étudier l'évolution d'objets biologiques au cours du temps et d'observer des liens de parenté entre eux, avec comme principe fondamental que la ressemblance de deux individus est due à l'existence d'une ascendance commune. Cette analyse se fait à partir de l'étude de caractères spécifiques comparables pour plusieurs individus. La phylogénie moléculaire a pour objet l'analyse de la similarité entre séquences biologiques (ADN et protéines). Les résultats de cette analyse sont représentés sous forme graphique: arbre phylogénétique. Cette représentation graphique de la phylogenèse facilite ainsi l'interprétation des degrés de parenté entre les groupes étudiés. Plusieurs méthodes basées sur deux approches différentes permettent l'élaboration de ces arbres phylogénétiques.

Les méthodes basées sur approches cladistique opère directement sur les séquences alignées, analysant les homologies, c'est-à-dire la conservation des caractères. Cette méthode utilise un scénario évolutif qui minimise le nombre total des étapes (substitutions, insertions, délétions) nécessaires pour passer d'une séquence à une autre en parcourant l'arbre phylogénétique. Des méthodes comme le Maximum Parsimony et Maximum Likelihood, sont les plus utilisées dans ce type d'approche. La première permet la construction d'un arbre en minimisant le nombre de substitutions (Insertions, délétions, etc.), c'est la méthode qui demande le minimum d'hypothèses de transformations de caractères. Le Maximum Likelihood cherche une conformation qui en termes de probabilité représente mieux le modèle évolutif.

Les méthodes phénétiques (ou de distances) utilise le calcul préalable de la distance entre deux taxons. Cette distance est inscrite dans une matrice qui servira de base à la construction des arbres. UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) et Neighbor- Joining sont deux exemples de méthodes couramment utilisées.

La méthode UPGMA calcule la distance entre des séquences deux à deux pour générer une matrice de distance avec l'ensemble des séquences étudiées. Elle contraint les distances à être ultra-métrique et donc qu'elles évoluent à une vitesse constante. Sachant que cette hypothèse est rarement confirmée et cette méthode devient inappropriée dans l'étude des phylogénies. Le Neighbor Joining est la méthode de distances préconisée actuellement. Elle tente de corriger la méthode UPGMA afin d'autoriser un taux de mutation différent sur les branches prenant en compte la divergence moyenne de chaque séquence avec toutes les autres.

Le simple comptage des différences entre deux séquences peut sous-estimer le nombre d'évènements mutationnels. Afin de corriger ce biais, des hypothèses ont été proposées pour expliquer la façon dont les bases ou acides aminés se sont substituées à un locus donné. Pour répondre à ce problème Kimura (1980) a proposé un modèle de correction.

L'objectif est de tenter de restituer au mieux la distance réelle en prenant en compte les homéoplasies possibles dans les séquences et en supposant une fréquence plus importante pour les transitions que les transversions, ce qui permet d'estimer les distances évolutives en termes de nombre de substitutions de nucléotides.

#### ***II.4. Méthodes culture dépendante et culture indépendante***

Les outils moléculaires basés sur des méthodes culture indépendante présentent l'avantage d'accéder à un grand nombre des espèces présentes dans une communauté, y compris les micro-organismes non cultivables. Néanmoins, cette globalité d'accession représente ainsi l'ADN total des micro-organismes qui sont sous différentes formes, ceux qui sont dormant ou ne contribuent pas au système fonctionnel d'un écosystème et ne prend donc pas en considération l'activité cellulaire. Les méthodes culture dépendante malgré tous les biais qui leur sont associés, restent toujours importantes pour les études en écologie. Elles permettent l'isolement d'espèces pour la mise en collection, leurs analyses postérieures et fournissent des informations sur le potentiel fonctionnel d'un écosystème (Ellis et *al.*, 2003).

L'application de ces deux méthodes doit donc se faire en synergie, de sorte que la complémentarité des informations générées puisse contribuer à une meilleure compréhension des écosystèmes microbiens (Nichols, 2007).

### **III. Trésor minéral et biodiversité végétale**

#### **1. L'originalité botanique des sites métallifères**

La flore des sites métallifères présente une spécialisation écologique, une fréquence de rareté et un risque d'extinction élevés (Whiting et *al.*, 2004). Elle représente un modèle d'étude original et intéressant en biologie de la conservation, à la fois d'un point de vue fondamental (processus écologiques et évolutifs) et d'un point de vue appliqué (stratégies de conservation à employer dans ce contexte).

L'adaptation aux métaux lourds chez les plantes a focalisé l'intérêt des écologistes, physiologistes et des chimistes depuis très longtemps. Dès le XVI<sup>ème</sup> siècle, le célèbre savant



Georgius Agricola (1556) rapporte que des végétaux semblent souffrir lorsqu'ils se développent sur des sols riches en minerais. De même lorsque son but est de repérer les veines métallifères intéressantes, il précise qu'une végétation particulière, absente aux alentours, se développe au-dessus de ces ressources. Il remarque ainsi l'effet nocif des métaux sur une végétation dite sensible et la relative tolérance d'une végétation plus adaptée.

Les végétations des affleurements métallifères possèdent un nombre important d'espèces endémiques très vraisemblablement nées sur les sites métallifères par le jeu de l'isolement écologique et géographique (Rajakaruna, 2004). Cette flore semblerait aussi présenter un caractère délictuel comprenant des espèces très répandues au cours d'un épisode climatique défavorable à la forêt (Wild, 1978).

Les végétations des différents types d'habitats métallifères présentent des caractéristiques communes:

- une rareté et faible recouvrement des phanérophytes;
- sur-représentation des espèces à stratégie stress-tolérante;
- sous-représentation des arbres;
- une hauteur limitée;
- un recouvrement total souvent < 100 %;
- une faible productivité;
- un syndrome de stress tolérance par la présence de petites feuilles coriaces persistantes.

## 2. Mécanismes de transfert des ETM dans les plantes

### 2.1. Absorption foliaire

L'absorption foliaire peut représenter une voie importante dans la contamination de la plante. C'est le cas dans les zones à forte contamination atmosphérique comme cela a été décrit en milieu urbain ou industriel (Pacheco et al., 2008). Il a été mis en évidence une absorption foliaire de Cd et Pb dans des salades ayant poussé sur des sols non contaminés et exposées aux émissions atmosphériques d'une usine de recyclage de batteries au plomb (Uzu et al., 2010).

Les éléments essentiels ou non essentiels peuvent se déposer sur les surfaces des organes aériens de la plante avec des retombés atmosphériques par voie humide ou sèche (Prasad, 2008). Une partie solubilisée de ces ETM va s'adsorber aux lipides épicuticulaires et pénétrer dans les feuilles sous forme d'ions après le passage au travers la cuticule qui fonctionne comme un faible échangeur d'ions (Uzu et al., 2010). La perméabilité de la cuticule dépend de la taille du cation. Ainsi, la majeure partie de Pb reste fixée au niveau de la cuticule tandis que Cd, Zn et Cu pénètrent plus facilement dans la feuille (Prasad et Hagemeyer, 1999). Dans les études concernant l'application foliaire de différentes formes de Zn pour la nutrition des plantes, il a été montré que le Zn est absorbé plus facilement par les jeunes feuilles, car le développement de la cuticule présente une barrière pour la pénétration de Zn dans les feuilles (Barker et Pilbeam, 2007).

Les ETM non solubilisés peuvent également pénétrer dans les feuilles via les stomates avec des particules de diamètre inférieur à 10 nm (Eichert et al., 2008), comme cela a été montré pour le Pb dans les feuilles de salade (Uzu et al., 2010). La capacité des plantes à absorber les ETM via les feuilles dépend de nombreux facteurs, tels que l'âge et la morphologie des feuilles, la densité stomatique, l'intensité de respiration ou la forme et la densité du feuillage (Eichert et Burkhardt, 2001).

### 2.2. Adsorption racinaire

En dehors des zones à forte pollution atmosphérique, la voie principale d'absorption des ETM du sol par les plantes est la voie racinaire (Assadian et Fenn, 2001; Seregin et Ivanov, 2001). L'activité racinaire peut réguler le flux des éléments majeurs et en traces dans la rhizosphère. Les ETM peuvent être transférés vers la rhizosphère par deux processus: la diffusion et le flux de masse (Assadian et Fenn, 2001). Lors du prélèvement d'un élément, la plante crée un gradient de concentration dans les zones les plus proches de la racine, par rapport aux zones du sol plus éloignées (0,1-15 mm). Ainsi, les éléments diffusent pour compenser cette différence. En ce qui concerne le flux de masse, les ETM peuvent être déplacés avec les flux de solutés, créés par la

plante lors du prélèvement d'eau. Il se crée donc une différence de potentiel hydrique entre la rhizosphère et les zones de sol plus éloignées de la racine. Ce transport s'effectue sur quelques centimètres de distance (Tremel-Schaub et Feix, 2005).

Les ETM peuvent s'adsorber à la surface des racines sous forme d'ions ou de complexes avec des ligands organiques, comme les acides uroniques du mucilage de la racine (Hasan et al., 2009). L'affinité des éléments pour les mucilages racinaires peut varier. Ainsi, la force de rétention des ETM par les exsudats de racines de maïs a été reportée comme suit :  $Pb^{2+} > Cd^{2+} > Zn^{2+}$  (Mench et al., 1987).

La fixation des ETM dans les couches supérieures du cortex racinaire (rhizoderme et collenchyme/parenchyme) constitue une barrière physique contre leur pénétration dans la racine. La formation de plaques d'oxydes et d'hydroxydes de Fe à la surface racinaire peut jouer un rôle important dans l'établissement de cette barrière physique (Liu et al., 2008). Il en est de même pour les mucilages, contenant des ligands capables de complexer les ions, qui peuvent être excrétés par la plante afin de créer une couche physique supplémentaire de protection des racines (Hinsinger et al., 2009). Dans le cas des sols calcaires, le Ca se trouve en excès dans la rhizosphère et peut précipiter sous forme de carbonate, formant ainsi des plaques de  $CaCO_3$  autour des racines. Les ETM ayant une affinité pour Ca, comme Zn, Mg et Mn, peuvent aussi précipiter, diminuant ainsi leur phytodisponibilité dans la rhizosphère (Assadian et Fenn, 2001). Les mycorhizes peuvent également constituer une barrière physique en fixant les ETM et diminuer ainsi les flux vers la racine (Hall, 2002). Toutefois, l'effet protecteur des mycorhizes n'est pas certain et dépend des souches de champignons considérées, des espèces végétales étudiées et des concentrations en ETM du milieu (Jentschke et Godbold, 2000). De même, les exsudats des plantes peuvent, selon les espèces, soit augmenter, soit diminuer la mobilité des ETM dans la rhizosphère.

### 2.3. Absorption racinaire

Les mécanismes qui contrôlent l'accumulation des ETM par les racines ne sont pas encore bien connus (Hasan et al., 2009). Les ETM pourraient pénétrer dans la racine par diffusion passive (sans implication d'énergie et de processus métaboliques) ou par voie active (nécessitant une dépense d'énergie et l'implication de transporteurs) (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). L'absorption des ETM par les parois cellulaires semble être contrôlée par le gradient de potentiel électrochimique entre le cytosol et l'apoplaste, lequel a une sélectivité assez faible (Clemens et al., 2002). Les tissus jeunes, possédant des parois fines, comme dans la zone apicale, sont les zones absorbant le plus de Pb ou de Cd (Seregin et Kozhevnikova, 2008). Les systèmes de transport et les sites d'échange peuvent participer au transfert des ETM à travers la membrane plasmique des cellules du rhizoderme. Le Cd et le Pb sous forme d'ions pourraient emprunter une voie passive via les canaux ioniques et/ou les transporteurs ioniques dont certains ne sont pas sélectifs (Perfus-Barbeoch et al., 2002). Certaines familles de transporteurs transmembranaires de cations divalents ( $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ) comme les facilitateurs de diffusion cationique (*Cation Diffusion Facilitator, CDF*) ou les transporteurs ZIP (*ZRT/IRT-like Protein*) peuvent également transporter le Cd ou le Pb (Clemens et al., 2002; Clemens, 2006). Ainsi, l'absorption d'un élément dépend des concentrations et de la nature des autres éléments avec lesquels il est en compétition. Par exemple, les ions  $Cd^{2+}$  semblent être en compétition pour les mêmes transporteurs transmembranaires avec les éléments essentiels comme Ca, K, Fe, Mg, Mn, Cu, Zn et Ni (Benavides et al., 2005). Kim et al. (2002) ont montré que l'ajout d'ions  $Ca^{2+}$  et  $Mg^{2+}$  dans le milieu inhibait la pénétration de Pb et de Cd dans les racines de riz. Pourrut (2008) a démontré que le Pb pénètre dans les racines de *Vicia faba* via des canaux calciques calmoduline-dépendant.

### 2.4. Translocation des ETM des racines vers les parties aériennes

Dans le système racinaire, la grande majorité des ETM y restent fixés (Huang et Cunningham, 1996). Malgré des niveaux d'accumulation différents en fonction des espèces végétales. Les concentrations en ETM sont généralement plus élevées dans les racines que dans

les parties aériennes (Fritioff et Greger, 2006). Ainsi, les racines constituent une première barrière qui protège les organes aériens de la plante. L'efficacité de cette barrière dépend fortement de l'espèce végétale ainsi que de l'élément. En effet, le Cd et le Zn sont transférés vers les parties aériennes plus facilement que Pb qui reste complexé au niveau de la racine (Seregin et Kozhevnikova, 2008).

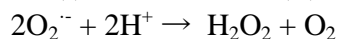
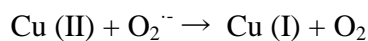
Dans la racine, les ETM peuvent être transportés par la voie symplastique (à l'intérieur de la cellule) et/ou apoplastique (à l'extérieur de la cellule) (Benavides et *al.*, 2005).

### 3. Les effets délétères des éléments en traces métalliques

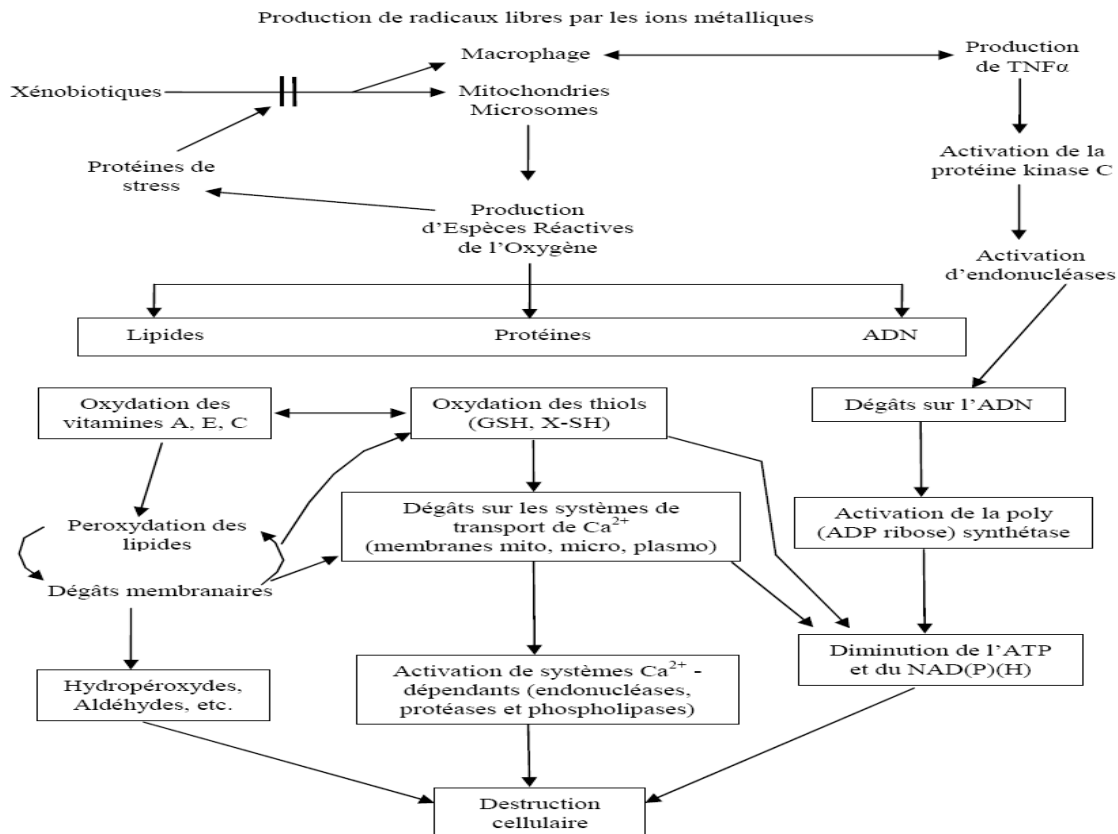
Les ETM peuvent facilement être bioaccumulés dans les organismes interférant dans les mécanismes physiologiques et cellulaires. En tant qu'analogues à d'autres éléments essentiels, les cations métalliques peuvent entrer en compétition lors de l'absorption des nutriments, pouvant induire des carences. En cas d'accumulation dans l'appareil végétatif des plantes, les ETM interfèrent aussi dans les fonctions essentielles que sont la photosynthèse ou les échanges gazeux, perturbant la bonne santé de la plante (phytotoxicité). La phytotoxicité des métaux se remarque par certains symptômes visuels tels qu'une inhibition de la croissance, la chlorose ou la nécrose des parties aériennes des plantes.

Lorsqu'ils entrent dans les cellules biologiques, les éléments métalliques bouleversent le fonctionnement intracellulaire. Les propriétés chimiques des métaux leur donnent une forte affinité pour les groupements thiols (-SH) retrouvés dans de nombreuses protéines dont les enzymes. En se fixant sur de telles molécules, les métaux (principalement Cd ou Hg) peuvent ainsi inactiver la fonction essentielle de ces enzymes (Chrestensen et *al.*, 2000). De plus, beaucoup d'enzymes possèdent un noyau métallique qui peut être déplacé par d'autres métaux conduisant encore une fois à l'inhibition de l'activité enzymatique (Van Assche et Clijsters, 1986). Par ailleurs, les métaux, en particulier le cuivre et le fer, participent à bon nombre de réactions redox et à la formation, via les réactions de Fenton, d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Stohs et Bagchi, 1995) responsables de ce que l'on nomme «stress oxydatif».

Réactions de Fenton :



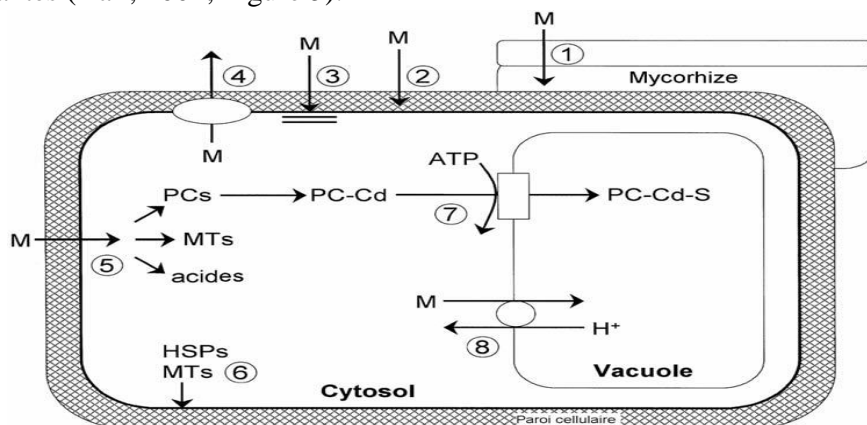
Ces ERO ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^{\cdot}$ ) sont très dommageables aux cellules. Elles entraînent la peroxydation des lipides, abîment l'ADN et altèrent l'homéostasie du calcium (Figure 4). Les différentes propriétés des métaux entraînent donc des dégâts différents dans les cellules. La production d'ERO par la réaction de Fenton concerne plutôt le fer, le cuivre, le chrome ou encore le vanadium alors que d'autres métaux tels que le mercure, le nickel, le plomb et surtout le cadmium entraînent une diminution du glutathion (GSH) molécule essentielle au système antioxydant (Schützendübel et Polle, 2002).



**Figure 4.** Résumé des interactions connues mettant en jeu les espèces réactives de l'oxygène et leurs dégâts dans les tissus (traduit d'après Stohs et Bagchi, 1995).

#### 4. Les mécanismes de réponse au stress métallique

En réponse à la toxicité des ETM, les organismes développent un certain nombre de mécanismes de protection. Pour réduire le stress métallique, les organismes peuvent limiter l'accumulation des métaux dans les cellules (exclusion), stocker l'élément toxique dans les vacuoles (chélation et séquestration) et/ou activer les systèmes antioxydants (protéines de réponse au stress). Ces mécanismes de défense se retrouvent chez tous les organismes et en particulier chez les plantes (Hall, 2002; Figure 5).



**Figure 5.** Résumé des mécanismes cellulaires connus potentiellement impliqués dans la détoxification des métaux et la tolérance des plantes. 1. Immobilisation (extra- et intracellulaire) par les mycorhizes 2. Liaison avec la paroi cellulaire et les exsudats racinaires. 3. Réduction de l'influx à travers la membrane plasmique. 4. Efflux actif dans l'apoplaste. 5. Chélation dans le cytosol par différents ligands. 6. Réparation et protection de la membrane plasmique sous conditions de stress. 7. Transport du complexe PC-Cd dans la vacuole. 8. Transport et accumulation des métaux dans la vacuole. (d'après Hall, 2002). PCs = Phytochélatins, MTs = Metallothioneins, HSPs = Heat Shock Proteins.

En réponse à l'augmentation des concentrations en ETM, les plantes produisent des composés complexants tels que les acides aminés, l'acide citrique, l'acide malique, la phytine, le glutathion, les métallothionéines et les phytochélatines (Cobbett, 2000; Hall, 2002; Shah et Nongkynrih, 2007). Les cations métalliques peuvent avoir une affinité plus forte pour les ligands contenant de l'oxygène comme les alkoxydes (OR) et de l'azote comme les amides (NR<sub>2</sub>) (Fulton et al., 2002) ainsi qu'avec les ligands contenant du soufre et notamment des groupements thiols (-SH), comme les protéines riches en cystéine (métallothionéines), le glutathion et les phytochélatines (Roth et al., 2006). Le Zn aurait plus d'affinité pour les ligands contenant de l'oxygène et de l'azote (Verkleij et al., 2009), tandis que le Cd et le Pb auraient davantage d'affinité pour les groupements thiols (Seregin et Ivanov, 2001).

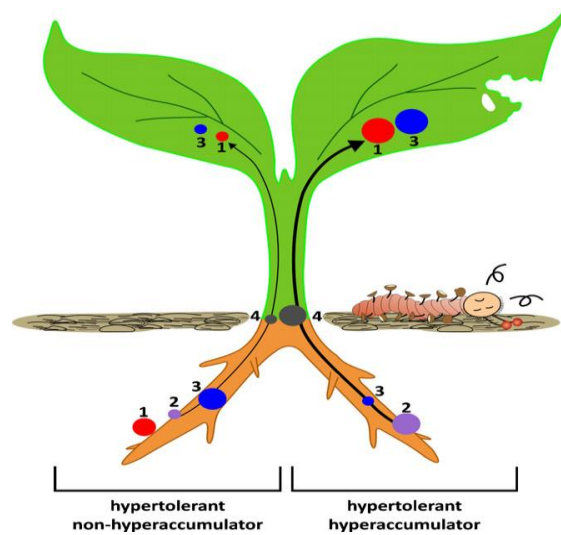
Parmi tous ces composés, les phytochélatines (PC) ont un rôle reconnu dans la détoxification et la régulation des ETM (Cobbett, 2000). Ces molécules sont des polypeptides qui contiennent de la cystéine et sont synthétisées à partir de glutathion réduit (GSH). D'ailleurs, le GSH est aussi capable de chélater directement les ETM. Le rôle important des PC dans la détoxification a été largement étudié pour le Cd dans certaines plantes et levures (Roth et al., 2006). La synthèse de PC peut être initiée par d'autres éléments, comme Pb, Zn, Cu, Sb, Ag, Hg ou AsO<sub>4</sub> (Cobbett, 2000; Clemens, 2006).

Après la chélation des ETM par les PC, les complexes ETM-PC sont majoritairement transportés dans les vacuoles (Clemens, 2006). Les PC peuvent aussi jouer d'autres rôles dans le transfert des ETM. Ainsi, il a été montré que les PC participent au transport de Cd des racines vers les parties aériennes d'*Arabidopsis* exposée au Cd (Gong et al., 2003). Ils peuvent également participer à la redistribution des ETM des feuilles vers d'autres organes, notamment les racines (Mendoza-Cozatl et al., 2008). Dans des plantes d'*Arabidopsis* génétiquement modifiées ne possédant pas de PC dans les racines, il a été montré un flux des PC des feuilles vers les racines pour faire face à l'afflux de Cd (Chen et al., 2006a).

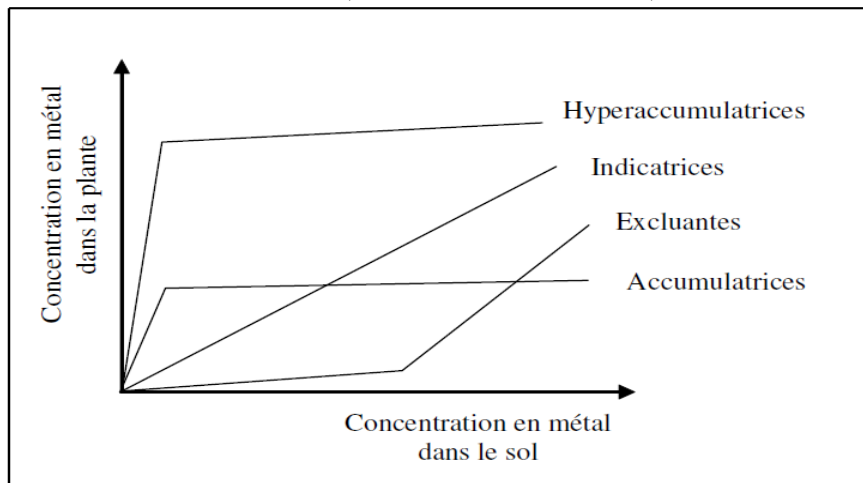
## 5. Adaptation aux métaux lourds et espèces métallophytes

Les espèces végétales vivant sur les sites contaminés par des métaux lourds, ou espèces métallophytes, constituent des modèles biologiques depuis des décennies (revue dans Antonovics et al., 1971). En 1934, une étude comparative entre une population provenant d'une mine de cuivre et une population non minière de l'espèce *Melandrium silvestre*, conduisait pour la première fois à la notion de résistance à un métal en tant que résultat de la sélection naturelle (Prat, 1934). Ensuite, il a fallu attendre les années 50 pour que ces études se poursuivent, de manière indépendante en Grande-Bretagne (Bradshaw, 1952) et en Allemagne (Baumeister, 1954) pour les sites miniers, et aux Etats-Unis pour les sols serpentiniques (Kruckeberg, 1951). Elles ont démontré que la tolérance aux métaux lourds, est la «capacité d'une plante à survivre et se reproduire sur des sols toxiques ou défavorables à la plupart des organismes en raison d'une contamination métallique» (Antonovics et al., 1971; Macnair et al., 2000), donnant ainsi lieu à des écotypes métallicoles ou à des espèces endémiques des sites métallifères.

En comparant les concentrations en métal des parties aériennes et des parties racinaires on met en évidence deux grandes stratégies de tolérance aux métaux lourds: l'exclusion des métaux des parties aériennes ou au contraire, d'accumulation des métaux dans les feuilles (Figure 6) et d'autres chercheurs ont ajouté une troisième stratégie d'indication (Baker, 1981) (Figure 7).



**Figure 6** Les mécanismes impliqués dans l’hypertolérance et la distribution des métaux lourds des plantes non-hyperaccumultrices -exclusion- (à gauche) et hyperaccumultrices (à droite). (1) de métaux lourds lier à la paroi cellulaire et/ou aux exsudats cellulaires, l’absorption racinaire (2), (3) chélation dans le cytosol et/ou séquestration dans les vacuoles, (4) racines-à-pousses translocation. Les points indiquent l’organe végétal dans lequel les différents mécanismes se produisent et les tailles place au niveau de chacun d’eux. (Rascio et Navari-Izzo, 2010)



**Figure 7.** Comportement des plantes en fonction de la concentration en métal dans le sol (d’après Baker, 1981)

La tolérance est un caractère adaptatif rare et limitant pour l’installation des espèces, si bien que les écosystèmes métallifères récents présentent une faible diversité spécifique due à une dynamique de colonisation lente (Antonovics et *al.*, 1971). En revanche, les affleurements naturels peuvent accueillir une flore endémique diversifiée. Les variations de l’expression de la tolérance dépendent de la quantité de métal biodisponible dans le sol d’origine (Baker et *al.*, 1990).

Parmi les individus tolérants aux métaux lourds, la plupart excluent les métaux de leurs parties aériennes, mais certains sont capables d’y stocker de très grandes quantités de métal et sont dits hyperaccumulateurs (Baker et *al.*, 1990). L’hyperaccumulation du nickel chez *Alyssum bertolonii* correspond à la découverte du phénomène (Minguzzi et *al.*, 1948). Ensuite, le seuil d’hyperaccumulation du nickel, cuivre et cobalt a été défini en analysant les espèces des flores serpentiniques, qui montraient des concentrations foliaires supérieures à 1000 mg.kg<sup>-1</sup> (Brooks et *al.*, 1998), alors que la plupart des espèces contiennent 1-10 mg.kg<sup>-1</sup>, et que le seuil de toxicité se situe autour de 10-50 mg.kg<sup>-1</sup> (Marschner, 1995). Cette définition s’est ensuite étendue aux autres

métaux: le seuil d'hyperaccumulation est de 10000 mg.kg<sup>-1</sup> pour le Zn et Mn, 1000 mg.kg<sup>-1</sup> pour le Pb, As, Co, Cr, Cu, Ni, Sb, Se et Tl et 100 mg.kg<sup>-1</sup> pour le Cd (Baker et al., 1989; Rascio et Navari-Izzo, 2010).

Plus de 500 espèces et approximativement 0,2 % de tous les angiospermes ont été identifiés comme (As, Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, Sb, Se, Tl, Zn) hyperaccumulatrices, ce qui représente moins de 0,2 % de toutes les espèces connues (Rascio et Navari-Izzo, 2010;). Toutefois, de nouveaux rapports de ce genre de plantes continuent de s'accumuler (Sun et al., 2006), de sorte qu'il est concevable que de nombreuses plantes hyperaccumulatrices encore non identifiées peuvent s'exister dans la nature, aussi bien dans les zones tropicales que tempérées. D'autre part, certaines espèces classées comme hyperaccumulatrices sur les échantillons de terrain peuvent être supprimées de la liste si cette accumulation n'est pas confirmée par l'expérimentation en conditions contrôlées (Macnair, 2003). La majorité d'entre elles (75 % des taxons) concernant l'hyperaccumulation du nickel (Rascio et Navari-Izzo, 2010). Les espèces relatives à l'hyperaccumulation du zinc arrivent en deuxième position, bien qu'elles soient en nombre beaucoup plus réduit. Elles appartiennent surtout à la famille des Brassicaceae, aux genres *Thlaspi* (11 espèces) et *Arabidopsis* (une espèce) (Baker et al., 1989). Les autres métaux concernés par l'hyperaccumulation sont le Cd même si il est très toxique ne possède qu'un faible nombre de plantes hyperaccumulatrices (seulement 5 espèces) ont été trouvés et récemment *Solanum nigrum* (Solanaceae) a été remarqué comme la cinquième espèce hyperaccumulatrice du Cd (Sun et al., 2006). Les espèces hyperaccumulatrices du Se sont réparties dans les genres de familles différentes, parmi lesquelles Fabaceae, Asteraceae, Rubiaceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae et Scrophulariaceae (Reeves et Baker, 2000).

Bien que la large répartition biogéographique du phénomène d'hyperaccumulation dans plusieurs taxa et localités implique la sélection indépendante de fonctions adaptatives (Pollard et al., 1997), la signification évolutive de ce trait a fait l'objet de plusieurs hypothèses non exclusives: protection contre l'herbivorie par la toxicité métallique (Boyd et al., 1992; Pollard et al., 1997; Davis et al., 2001), prélèvement efficace et simultané de plusieurs métaux en milieu pauvre (Davis et al., 2001) ou utilisation des métaux comme protection contre la sécheresse par augmentation de l'osmolarité des cellules ou de l'imperméabilité de l'épiderme (Boyd et al., 1992). Chez les Brassicaceae, notamment *Thlaspi caerulescens*, cette dernière hypothèse a été remise en question (Whiting et al., 2003), et l'hypothèse de protection contre l'herbivorie est discutée, car l'intervention de composés de défense, les glucosinolates, est également probable (Noret et al., 2005).

Les métalrophytes strictes sont des espèces qui ne sont présentes que sur les écosystèmes métallifères, soit sur l'ensemble de leur aire de distribution, soit dans une région géographique précise (Antonovics et al., 1971). En revanche, les métalrophytes facultatives sont constituées d'un écotype métallicole (sur sols contaminés) et d'un écotype non métallicole (sur sols normaux) de la même espèce et dans la même région.

## 6. Une biodiversité menacée

De par son aptitude à tolérer et accumuler les métaux lourds, la flore métallicole représente une ressource biologique remarquable, à la fois scientifiquement intéressante et précieuse pour de nombreuses applications biotechnologiques. Whiting et al. (2004) parlent même « d'*el dorado* » de matériel génétique qui pourrait être utilisé dans la décontamination et la restauration écologique de sites contaminés par les métaux lourds. Sa contribution à la biodiversité de certaines régions du monde et sa qualité en tant que ressource biologique lui confèrent un intérêt de conservation élevé.

En plus de contaminer les habitats non métallifères par les poussières métalliques des industries et ainsi éroder leur biodiversité, l'exploitation minière menace directement la biodiversité des affleurements qu'elle exploite par l'extraction de minerais en surface. Les espèces végétales des affleurements métallifères associées en communautés primaires sont détruites par le

remaniement du substrat lors de l'extraction du minerai en surface et ne régénèrent pas dans les zones perturbées (Pascal et *al.*, 2008).

Néanmoins, l'activité minière crée aussi de nouveaux habitats. Il s'agit d'une contamination des sols par les déchets ou les poussières atmosphériques métalliques provenant des industries minières (Ginocchio et *al.*, 2002). Ces habitats offrent une large gamme de conditions écologiques et peuvent être colonisés par des espèces adaptées aux milieux ouverts et à la toxicité des métaux (Ash et *al.*, 1994). Ces habitats constitueraient une nouvelle opportunité pour l'évolution de certaines espèces des habitats primaires naturellement tolérantes aux métaux (Bizoux et *al.*, 2008).

## **7. Particularités de la biologie de la conservation des métallobytes**

Même si les menaces sur la biodiversité des sites métallifères sont élevées, seules quelques métallobytes ont été étudiées en biologie de la conservation (Bizoux et *al.*, 2008). La biologie de la conservation des métallobytes, comme celle de l'ensemble des espèces menacées, requiert une étude écogéographique, démographique, de la diversité génétique et de la biologie de la reproduction des populations.

La pression de sélection due à la toxicité aux métaux lourds influence directement la diversité génétique des populations par la disparition des individus non tolérants (Antonovics et *al.*, 1971). Elle ferait subir à la population métallicole un goulot d'étranglement (*bottleneck*) fort qui, associé à de potentiels effets de fondation, résulteraient en une diminution importante de la diversité génétique intra-populationnelle (Lefèbvre et Vernet, 1990). Ce phénomène de réduction de diversité génétique pourrait avoir des conséquences sur la viabilité des populations, il constitue donc un élément important dans la biologie de la conservation des métallobytes.

La variation génétique est répartie en fonction des pressions de sélection locales, souvent spécifiques à la nature du métal et à sa teneur dans le sol. La relation entre le degré de tolérance à un métal de populations métallicoles distantes d'à peine quelques mètres et la concentration en métal dans le sol laisse clairement apparaître une réponse adaptative locale à l'exposition aux métaux (Antonovics et *al.*, 1971).

La variabilité des habitats métallifères (naturels, anthropogènes, pollution polymétallique, secs, humides...), ainsi que leur hétérogénéité interne laisse penser qu'il existe une diversité de niches écologiques au sein de la flore métallicole (Baker et Brooks, 1989). La caractérisation de la niche écologique des diverses métallobytes est donc nécessaire. L'étude de la variation des facteurs écologiques au sein d'un habitat ou entre habitats en relation avec la biomasse et l'abondance de l'espèce permet d'identifier l'optimum écologique et apporte des informations élémentaires pour la conservation des métallobytes.

## **IV. Les techniques de dépollution**

Depuis la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, le secteur industriel s'est développé sans préoccupation des rejets d'éléments toxiques dans les sols. De fait, le sol a été longtemps considéré comme une ressource renouvelable, voire même inépuisable à l'échelle des générations humaines, capable de recevoir sans conséquence les rejets de nos activités. On sait maintenant que les sols sont caractérisés par un équilibre fragile et sont vulnérables. Aujourd'hui, ce patrimoine est menacé à la fois par le lourd héritage du passé et par l'extension des surfaces consacrées au développement industriel. La prise de conscience des atteintes à l'environnement n'est que relativement récente puisque le premier meeting international sur les sols pollués n'a eu lieu qu'en 1985 au Pays Bas. Ce fut l'occasion de reconnaître le besoin de comprendre les processus à l'origine de ces pollutions et de trouver des moyens possibles de dépollution (Assink et Van den Brink, 1986).

### **1. Les différentes méthodes de dépollution**

Le but de la dépollution des sols est de restituer les sites dans un état aussi proche que possible de l'état antérieur à la pollution. En outre, la ou les techniques de traitement des sols ne doivent pas être plus polluantes que le résultat de la dépollution. C'est-à-dire qu'il ne doit pas y



avoir de transfert de pollution. La liste des critères auxquels doivent répondre les techniques de dépollution (Perchet, 2008):

- Enlever ou neutraliser les matières incriminées;
- Peser aussi peu que possible sur les ressources mises en œuvre (eau, air, énergie, capital...);
- Ne pas provoquer d'émissions secondaires (eau et air du processus) contenant des polluants;
- Obtenir un taux important de recyclage du matériau traité;
- Minimiser la quantité et le danger potentiel des matières résiduelles;
- Ne pas produire de nouvelles substances toxiques par l'enlèvement ou le transfert de celles déjà existantes.

La dépollution des sites contaminés par des sources de pollution variées est contrainte par différents facteurs, la nature de la pollution étant le premier. Toutefois, la dépollution d'un site encore en activité sera beaucoup plus contraignante que celle d'un site fermé (Legrand, 2006). Les traitements proposés peuvent être définis en trois grandes familles :

- Les procédés «*in situ*», réalisés dans le sol en état;
- Les procédés «*on site*» ou «*sur site*», traitements sur place des sols excavés;
- Les procédés «*hors site*» ou «*off site*» ou «*ex situ*», nécessitant l'évacuation.

Ces différents procédés sont dépendants d'un facteur de temps, sachant que les traitements «*in situ*» demandent un temps plus long que ceux réalisés hors site. Enfin, le type de traitement choisi dépendra également de la nature du ou des polluants, certains d'entre eux présentant la caractéristique d'être biodégradables et d'autres non.

Ainsi trois méthodologies peuvent s'appliquer pour le traitement de polluants non biodégradables:

- Les traitements physico-chimiques;
- Les traitements thermiques;
- Les méthodes de confinement.

Ces trois méthodologies s'appliquant essentiellement pour le traitement de polluants non biodégradables, nous exposerons dans un quatrième temps les techniques liées à la biodégradation.

### **1.1. Les procédés physico-chimiques**

Les traitements classiques de dépollution des sols contaminés par des composés organiques sont essentiellement basés sur des méthodes physico-chimiques: la neutralisation chimique, l'incinération, l'adsorption sur charbon actif ou sur résines, la lixiviation des sols par des solvants ou encore la photo-oxydation (UltraViolet UV/Ozone O<sub>3</sub>) (Oh et al., 2004).

Bien qu'elles diminuent les concentrations en polluants, ces méthodes ne restaurent pas les sols et ont la plupart du temps un effet néfaste sur l'activité biologique et la fertilité des sols traités (Padmavathiamma et al., 2007).

La technique physique la plus répandue actuellement consiste à injecter des fluides dans le sol afin de transférer et concentrer la pollution vers des points de récupération. Cette technique de «lavage des sols» préalablement excavés peut être réalisée à pression normale ou haute pression. L'eau est ensuite dépolluée par passage dans une station d'épuration adaptée au polluant, l'air chargé en vapeurs toxiques est filtré sur charbon actif. Cette méthode s'adresse à la plupart des polluants sur sols grenus. Elle atteint des rendements de 80 % et peut être améliorée si elle est associée à un traitement biologique ou en ajoutant des tensioactifs.

Pour l'extraction des métaux et des petites molécules organiques chargées, il existe des procédés électriques. Le principe repose sur la circulation d'un courant électrique dans le sol par l'intermédiaire d'électrodes poreuses. Le procédé sera d'autant plus efficace que le sol aura une grande teneur en eau et un pouvoir tampon faible. Cette technique nécessite une excavation du sol et le traitement est réalisé *on-site*.

Les techniques d'ordre chimique consistent à détruire, fixer ou neutraliser les polluants par l'introduction de composés chimiquement actifs. Toutefois ces techniques s'appliquent difficilement aux matrices solides et nécessitent de bien connaître la nature du réactif et du sol. En

effet, leur utilisation non maîtrisée pourrait générer d'autres formes de pollution. A l'heure actuelle, il existe un très grand nombre de procédés chimiques qui permettent d'éliminer la majeure partie des polluants. Cependant les coûts et l'efficacité des traitements sont très différents d'un produit à un autre. L'extraction par solvant est la technologie la plus simple et donnant les meilleurs résultats. On utilise comme solvant organique des alcanes, des alcools ou des cétones qui permettent de dissoudre la plupart des polluants organiques toxiques. Le solvant est introduit sur le sol préalablement excavé. Il solubilise alors les polluants qui passent dans la phase organique. Le solvant est alors extrait.

D'autres exemples peuvent également résulter de l'adaptation de deux ou trois principes de fonctionnement permettant d'améliorer les rendements de dépollution.

### **1.2. Les traitements thermiques**

Dans le cadre de ces techniques physiques existent aussi des traitements thermiques qui peuvent être réalisés sur le site même «on-site» ou sur des sites appropriés «hors-site» comme une usine d'incinération. Cette technique est adaptée aux sols contaminés par des composés organiques facilement oxydables et convertibles en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O. Il est nécessaire de procéder à une excavation des sols, un broyage et un tamisage avant le traitement thermique.

Il existe deux méthodes de chauffage:

- Le chauffage direct où le sol est chauffé à 1000°C directement en introduisant de l'oxygène,
- Le chauffage indirect où le sol est dans un four étanche et n'est pas en contact avec la source de chaleur. La température avoisine les 800 °C et est suffisante pour extraire les polluants par l'intermédiaire des vapeurs se dégageant.

Ces deux méthodes sont très efficaces mais très coûteuses en énergie. Il existe à l'heure actuelle plusieurs types de fours.

### **1.3. Les méthodes de confinement**

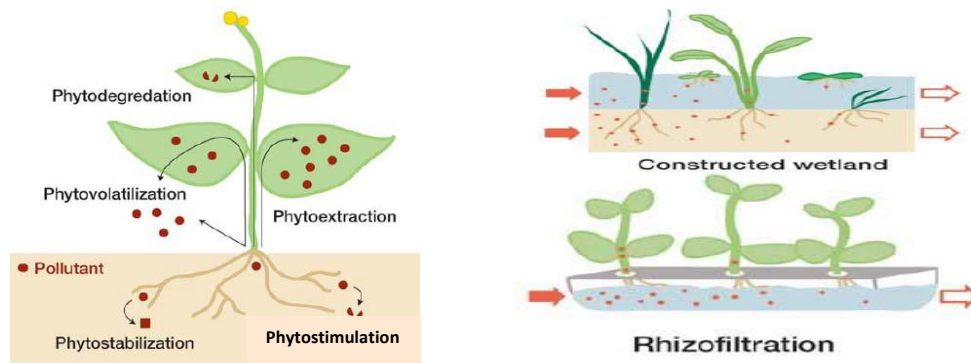
Le confinement est plus une solution qu'une méthode de dépollution. Cette méthode permet le traitement de surfaces importantes et de polluants multiples. La pollution n'est donc pas enlevée ni supprimée. Le confinement ayant pour objectif d'en réduire les effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement (Legrand, 2006). Il peut s'appliquer selon trois méthodologies:

- Le confinement de surface avec mise en place d'une géomembrane;
- Le confinement vertical, derrière des parois étanches en béton, matériaux rétenteurs ou mortiers plastiques;
- Le confinement horizontal profond.

## **2. Réhabilitation des écosystèmes métallifères par phytoremédiation et bioremédiation**

### **2.1. Techniques de phytoremédiation**

Afin de pallier les principales limitations des méthodes actuellement disponibles dans les stratégies de dépollution, les recherches s'orientent depuis quelques années vers l'utilisation de plantes supérieures. On sait en effet depuis longtemps que la présence d'un couvert végétal induit ou stimule la biodégradation d'une grande variété de contaminants organiques (Miller et al., 1996). Par ailleurs, certaines plantes dites métalphytes sont capables de se développer normalement sur des sites fortement contaminés par divers métaux. Certains de ces végétaux, qualifiés d'hyperaccumulateurs, sont capables de stocker massivement les métaux dans leurs parties aériennes (Brooks, 1998). Elles peuvent être utilisées sur des substrats solides (sols pollués), liquides (eaux contaminées) ou gazeux (filtration d'air chargé en composés nocifs volatils) (Pilon-Smits et al., 2005) (Figure 8). Ainsi, les études concernant l'écophysiologie et le métabolisme des plantes supérieures en milieu contaminé ont progressivement permis d'insérer le concept de phytoremédiation à côté de celui de bioremédiation des sites pollués.



**Figure 8** Les principales techniques de phytoremédiation (d'après Pilon-Smits, 2005)

Aujourd'hui, le terme de phytoremédiation est largement accepté et regroupe toutes les méthodes basées sur l'utilisation de végétaux supérieurs dans un but de dépollution. Malgré leur développement récent, ces méthodes sont variées et des résultats encourageants ont d'ores et déjà été obtenus pour des problématiques diverses. Plus précisément, les quelques études réalisées à ce jour permettent d'envisager six types de stratégies de phytoremédiation particulièrement prometteuses (Lasat, 2002):

- *La phytoextraction* est basée sur l'utilisation de végétaux hyperaccumulateurs qui absorbent les métaux du sol et les accumulent dans des organes aériens faciles à récolter (McGrath, 1998). Cette méthode, qui se révèle efficace pour une grande variété de métaux lourds (Pb, Cd, Ni, Zn, ...), est aujourd'hui proposée par de nombreuses sociétés américaines. La possibilité de recyclage de ces métaux ("phytomining") rendrait cette technique encore plus rentable (Leblanc et al., 1999).
- *La phytovolatilisation* permet la transformation des polluants inorganiques en produits volatiles puis le relargage dans l'atmosphère d'éléments tels que le mercure ou le sélénium (Pilon-Smits et al., 2005). Cette approche, encore au stade expérimental, fait actuellement l'objet de recherches très actives. Les résultats dans ce domaine sont particulièrement encourageants (Bizily et al., 1999).
- *La rhizofiltration* utilise les capacités élevées du système racinaire de certains végétaux pour fixer les polluants d'un milieu liquide. Cette méthode a notamment été testée en Ukraine dans le cadre de la dépollution du site de Tchernobyl (US EPA, <http://clu.in.org>).
- *La phytostabilisation* n'est pas une méthode de dépollution sensu stricto, mais elle permet de diminuer la mobilité des contaminants en limitant l'érosion éolienne, ruissellement et le lessivage du sol. Cette approche vise ainsi à limiter les risques de transfert de la pollution en dehors du sol contaminé et permet en même temps une meilleure intégration paysagère pour des sites présentant d'importants volumes impossibles à stocker en décharge, car les plantes auraient en effet une action mécanique (parties aériennes et racinaires), et chimique (complexation des métaux grâce à des substances provenant des racines) (Berti et al., 2000). Dans ce contexte, l'utilisation d'arbres est particulièrement intéressante puisque leur système racinaire est profond et dense et l'évapotranspiration est très efficace, ce qui limite d'autant plus le lessivage et le ruissellement (Schnoor, 2000).
- *La phytodégradation / phytotransformation* c'est une méthode de Transformation par la plante et les micro-organismes associés de molécules organiques complexes en composés plus simples qui seront intégrés dans les tissus de la plante (Garbisu et Alkorta, 2001).
- *La phytostimulation / Rhizodégradation* exploite l'effet stimulant de la rhizosphère sur la dégradation microbiologique des composés organiques (Kuiper et al., 2004). Cette démarche est notamment utilisée depuis plusieurs années par l'armée américaine (<http://www.wes.army.mil:el:phyto>) dans le cadre de la dépollution de sites contaminés par des explosifs (TNT) ou par des herbicides.

Ces quelques exemples, loin d'être exhaustifs, montrent que le recours aux végétaux supérieurs dans les stratégies de dépollution est considéré avec un intérêt croissant. Cette tendance est particulièrement marquée sur le continent Nord-Américain où plusieurs brevets ont été déposés. Certains d'entre eux protègent une méthodologie spécifique et bénéficient d'une couverture internationale (Chaney et *al.*, 1998), alors que les autres ont trait à des mises au point techniques ou à l'utilisation d'espèces végétales.

Cependant, à l'heure actuelle, le principal obstacle au développement de la phytoremédiation réside dans le faible nombre d'espèces potentiellement utilisables à l'échelle industrielle. En effet la plupart des métallophytes connues sont caractérisées par un enracinement peu profond, une croissance assez lente et une faible production de biomasse, autant de critères qui limitent considérablement les taux prévisibles d'extraction. Par ailleurs, un rendement optimal nécessite que les conditions de culture (climatiques et édaphiques) sur les sites pollués correspondent aux exigences naturelles des végétaux utilisés; ce paramètre est par essence très difficile à contrôler et représente une limitation supplémentaire de la méthode. Par conséquent, il est nécessaire de poursuivre les recherches afin de sélectionner de nouvelles plantes tolérantes et/ou accumulatrices et de mieux comprendre leur comportement sur site pollué.

## 2.2. Techniques de bioremédiation

Les techniques de bioremédiation utilisent les propriétés dépolluantes de micro-organismes (des bactéries essentiellement, mais également des champignons) endogènes ou exogènes au terrain contaminé (Boopathy, 2000) dans le but de dégrader ou transformer les contaminants à une forme moins contaminée (Vidali, 2001). Les micro-organismes ont besoin de nutriments et de source carbonée pour fournir l'énergie nécessaire à leur croissance et leur survie. La bioremédiation doit faire face à un environnement hétérogène dans lequel la plupart du temps, le(s) contaminant(s) est (sont) présent(s) en association avec des particules, dissous dans la solution du sol, etc. Pour cette raison, la bioremédiation se doit d'avoir une approche pluridisciplinaire prenant ainsi en compte la microbiologie, l'ingénierie, l'écologie, l'écotoxicologie, la pédologie et la chimie.

La mise en œuvre de ces techniques se fait sur le site même (*in situ*). Certaines nécessitent l'excavation des terres et sont réalisés sur site (excavation des terres qui sont traitées sur le site même) ou hors site (excavation et transport des terres vers un centre de dépollution) (Vidali, 2001). Ces techniques peuvent être subdivisées en sept catégories selon le principe biologique ou le mode de dépollution mis en œuvre:

- *biodégradation*: Utilisation de la capacité de certains micro-organismes à transformer le polluant en substrat (source de carbone, d'énergie) (Vidali, 2001);
- *bioimmobilisation*: Utilisation de la capacité de certains micro-organismes à immobiliser un ou plusieurs composants présents à l'état soluble (bactéries) (Barkay et Schaefer, 2001);
- *biolixiviation*: Solubilisation et entraînement dans la phase aqueuse par les micro-organismes de polluants fixés ou piégés dans le sol (Rohwerder et *al.*, 2003);
- *bioslurry* (traitement en bioréacteur): Création d'une boue épaisse en mettant la partie fine du sol dans l'eau (concentration de solide entre 10 et 50 % en poids). L'eau utilisée étant de l'eau de rivière ou de l'eau souterraine, contaminée ou non et ajout de nutriments pour stimuler la croissance de la population microbienne. Un système d'aération est employé pour les procédés aérobies. En fin de traitement, les phases solides et liquides sont séparées et le sol est remis en place (Zappi et *al.*, 1996);
- *biorestauration*: Ajout de nutriments (azote/phosphore) pour stimuler la croissance des micro-organismes indigènes et favoriser la dégradation des polluants (Hutchins et *al.*, 1991);
- *bioaugmentation*: Introduction dans le sol de micro-organismes exogènes adaptés aux polluants à traiter (Sayler et Ripp, 2000);

- *biostimulation*: Réensemencement de populations prélevées sur le site dont la croissance a été stimulée en laboratoire ou en bioréacteurs installés sur site (Cunningham et Philip, 2000).

### 2.3. Techniques innovantes

Les techniques biologiques les plus innovantes développées en laboratoire et prometteuses du point de vue de leur application sur le terrain ont été identifiées. Elles concernent principalement la combinaison de procédés existants et bien connus. Elles sont au nombre de quatre:

#### 3.3.1. Couplage bioremédiation (rhizosphère) / phytoremédiation

Le concept de «rhizosphère» a été introduit pour la première fois en 1904 par Lorenz Hiltner (Hiltner, 1904), et ceci pour décrire la zone sous l'influence biologique et biochimique des racines (Curl et Truelove, 1986). Le terme «rhizo» vient du grec signifiant «racine» tandis que le terme «sphère» dérive du grec ancien «sphaira» décrivant une balle, un globe. En 1986, Curl et Truelove (1986) décrivent la rhizosphère comme «une étroite zone du sol sujette à l'influence des racines, ce qui se manifeste par la perte ou l'exsudation de substances affectant l'activité microbienne». Si d'un point de vue morphologique, les racines et le sol, ou les micro-organismes et le sol devraient être clairement séparés, il n'en va de même d'un point de vue fonctionnel (Ulrich, 1987).

Selon Lawton et Jones (1995), les racines des végétaux peuvent être considérées comme les «ingénieurs biologiques du sol». En effet, ces dernières créent et maintiennent leur propre milieu, et ceci, non seulement par leur présence physique mais aussi par leur activité. Par des processus tels que l'exsudation d'acides organiques et d'enzyme dans la rhizosphère, les racines vont pouvoir, par exemple, permettre le maintien de communautés microbiennes (Curl et Truelove, 1986) ou l'accroissement de l'érosion des minéraux (Hinsinger et al., 1992). Ainsi, en dépit du faible volume de la rhizosphère dans les sols, celle-ci joue un rôle central dans le maintien du système sol-plante (Gobran et al., 1998).

Parmi les micro-organismes retrouvés dans le sol, certains vivent en symbiose ou mutualisme avec les végétaux, c'est-à-dire en association à bénéfices réciproques. L'apport d'eau et de nutriments à la plante, en échange de substances carbonées et d'une protection physique aux micro-organismes peuvent définir ces échanges.

Dans ces associations, les micro-organismes peuvent être classés en deux catégories :

- les ectosymbiontes qui constituent les micro-organismes colonisant l'extérieur de la racine, c'est-à-dire, la rhizosphère ou le rhizoplane (surface des racines). Parmi ces organismes, sont retrouvés des bactéries telles que *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter* (Gray et Smith, 2005) et des champignons (*Trichoderma*). Les bactéries de ce type sont alors définies comme des rhizobactéries ou bactéries rhizoplane;

- les endosymbiontes qui regroupent les micro-organismes vivant à l'intérieur des cellules de la plante hôte. Le plasmalemme peut également être transpercé, ceci étant l'œuvre de bactéries dites endophytes. Ces bactéries, appartenant principalement aux genres *Rhizobium* et *Frankia*, peuvent alors former des nodules racinaires, et ceci sur les racines des légumineuses et des ligneuses (Gray et Smith, 2005; Lugtenberg et Kamilova, 2009).

En raison de leurs caractéristiques rhizosphériques et endophytiques, les bactéries ont retenu l'attention au cours des dernières années pour promouvoir l'établissement des plantes dans des conditions défavorables, en favorisant les processus de phytoremédiation. Ces bactéries peuvent être isolées à partir de plantes vivant sur des sols contaminés par des métaux ou des composés organiques.

#### 3.3.2. Couplage bioaugmentation / phytoremédiation

Inoculation de micro-organismes spécifiques (bio-augmentation) dans des matrices poreuses (sols, sédiments), capables : i) de dégrader des molécules organiques (des pesticides notamment) ou ii) d'augmenter le stock de métaux disponibles pour les plantes utilisées pour la phytoextraction (avec des micro-organismes producteurs de sidérophores par exemple). En

conséquence, la croissance des micro-organismes inoculés est améliorée par l'approvisionnement de nutriments exsudés par les racines des plantes utilisées pour la phytoextraction.

### 3.3.3. Couplage phytoextraction / valorisation énergétique de la biomasse

En 2003, le ministère fédéral de la Recherche (BMBF) de l'Allemagne a lancé un programme visant à mettre en place un réseau interdisciplinaire sur la thématique "Energies renouvelables à partir de biomasse issue de la phytoextraction des sols contaminés". Ce programme est piloté par l'Institut CUTEC (Clausthaler Umwelttechnik-Institut, Allemagne) pour une durée de deux ans. Dans le cadre de ce programme, neuf projets ont été menés qui visent à réaliser les objectifs suivants : i) la mise en place d'un réseau d'experts permettant de faire l'état des lieux de la science et de la technique dans le domaine de l'utilisation de biomasse provenant de sols décontaminés par phytoextraction, ii) l'évaluation des possibilités et des limites de ce procédé, iii) la conception de projets prioritaires. Actuellement, ce réseau se compose de 35 experts issus de divers secteurs scientifiques et industriels et qui travaillent sur des thématiques telles que:

- la récupération des métaux lourds dans les plantes;
- les différentes techniques disponibles actuellement;
- les meilleures méthodes pour l'utilisation énergétique des plantes (Ex : la combustion);
- les limites des procédés actuels et les nouvelles solutions envisageables.

### 3.3.4. Système de phytoremédiation multiprocess

Combinaison de diverses techniques de bioremédiation autour d'un système de phytoremédiation pour décontaminer les sols pollués par des hydrocarbures pétroliers totaux (HPT) persistants. Les techniques impliquées dans le système sont:

- le landfarming (aération);
- la bioremédiation (bactéries);
- la phytoremédiation.

## 2.4. D'autres techniques, déjà anciennes, évoluent peu

Les techniques biologiques de dépollution des sols commercialisées par les entreprises sont déjà anciennes et ne font plus l'objet de travaux majeurs de recherche et développement. Il s'agit de techniques de bioremédiation qui consistent soit à stimuler la population bactérienne endogène, soit à opérer dans un espace contrôlé. Elles emploient les huit procédés suivants:

- bioventing (ventilation, injection d'air et de nutriments dans le sol);
- Traitement des sols par injection d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>);
- Epanchage contrôlé (ou landfarming);
- biosparging (lavage);
- combinaison bioventing / biosparging (ventilation / lavage);
- pump and treat (traitement du sol associé au traitement de la nappe);
- biotertre (biopile: excavation des terres avant ajout de micro-organismes adaptés au polluant, correspondant à de la bioaugmentation);
- compostage.

## V. Choix méthodologiques et objectifs

Les questions scientifiques majeures sur lesquelles s'appuient nos travaux de recherche sont:

- Les métaux lourds, dans notre cas en présence du fer et du phosphore, ont-ils une influence sur les micro-organismes et les plantes?
- Quelle est la contribution de la population végétale à la capacité de phytoremédiation du sol?

L'objectif général de ce projet de thèse était d'étudier, d'expliquer et d'exploiter la variabilité naturelle dans la réponse des plantes et des bactéries aux métaux. La sélection des cultivars de plantes présentant des caractères de tolérance aux métaux, sur la base de leurs performances à décontaminer des sols, pourra constituer une véritable alternative à la production de plantes transgéniques et elle contribuerait à la conservation et à l'exploitation des ressources génétiques naturelles. Les objectifs spécifiques du projet de thèse sont décrits ci-dessous.

- i) Connaître les caractéristiques physico-chimiques comme la texture et la répartition des métaux du sol, notamment de Zn, Pb, Cr, Cd, Cu et Fe, d'un ancien gisement de fer abandonné,
- ii) Mettre en évidence les relations entre les principales caractéristiques physico-chimiques du milieu,
- iii) Identifier les espèces végétales possédant une grande capacité d'accumulation des métaux et du phosphore. Dans cette partie, nous avons procédé à une caractérisation chimique en mesurant les concentrations de ces éléments dans les racines et les parties aériennes (ICP-AES),
- iv) Identifier les micro-organismes possédant une grande capacité de rétention des substances polluantes. Dans cette partie, nous avons procédé à une caractérisation génétique de ces espèces avec des méthodes de biologie moléculaire (ERIC-PCR, BOX-PCR, séquençage ...),
- v) Améliorer les connaissances de la biodiversité des bactéries persistantes dans le site. La description de la diversité impose que celle-ci soit quantifiée. Si en théorie cette question peut paraître simple, dans la pratique cette quantification est généralement plus difficile. L'étude de la diversité était composée de deux piliers, le premier est la diversité structurelle (PCR-DGGE de 16S ADN<sub>r</sub>) et le deuxième est la diversité fonctionnelle (BIOLOG<sup>®</sup> EcoPlaque),
- vi) Développer les stratégies de restauration d'un site pollué. Ce travail de recherche concernant les végétaux et les bactéries capables de croître dans des milieux contaminés par les métaux lourds et leurs potentialité de développer plusieurs stratégies pour se protéger de la toxicité chimique engendrée par la présence des métaux lourds présente un grand intérêt tant de point de vue fondamental que pour la réhabilitation des sites contaminés.

Afin d'étudier plus particulièrement la répartition des métaux, il a été nécessaire de suivre la concentration totale en métaux et sa concentration dissous. Nous avons choisi de suivre certains métaux en vue de leur concentration dans le sol en place et de leurs effets sur les organismes. Les oxydes de Fe ayant un rôle important dans la rétention des métaux en conditions toxiques, le dosage du Fe et des autres éléments a été déterminé par (ICP-AES). La matière organique étant, elle aussi, un site important de liaison des métaux, elle est suivie par mesure du carbone organique total.

La caractérisation bactérienne d'une matrice complexe se déroule en deux étapes: par leur métabolisme et par leur diversité structurelle. La diversité de la communauté bactérienne totale a été abordée ici par une étude de la diversité du gène codant pour l'ARN 16S. Les différents ribotypes de l'ARN 16S sont séparés par la méthode de la PCR-DGGE. La synthèse bibliographique fournit des informations concernant le choix de la DGGE. Cette méthode permet dans une matrice complexe riche d'étudier la diversité de manière qualitative et semi-quantitative. La diversité métabolique potentielle des bactéries cultivables du sol représentée par la richesse (S) et l'activité métabolique moyenne de la plaque (AWCD) est déterminée, en utilisant le système

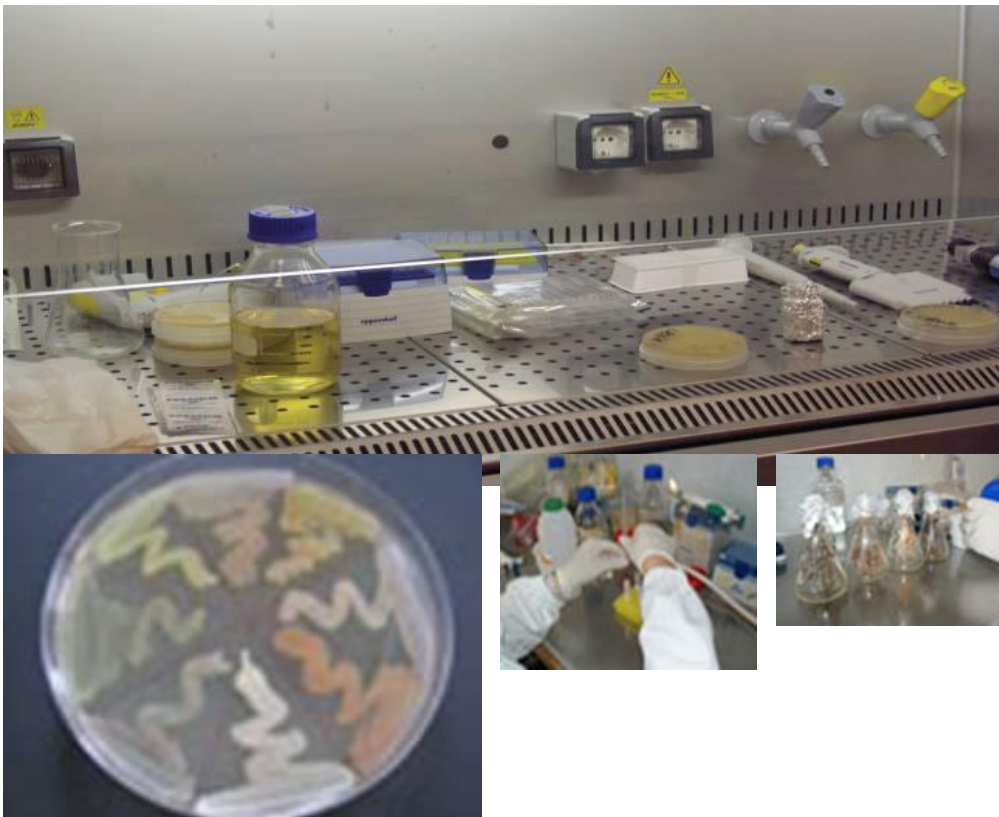
Biolog<sup>®</sup> EcoPlaque. L'activité métabolique des bactéries cultivables repose sur leur capacité à métaboliser un certain nombre de substrats carbonés. Cette consommation est révélée par un indicateur coloré de développement microbien aérobie (sel de tétrazolium). L'intensité de cette coloration violette est proportionnelle à la consommation du substrat; elle est mesurée par spectrophotométrie à 590nm après une incubation à 20 °C à l'obscurité.

L'étude des plantes du site se déroule en deux étapes également: la mesure des concentrations des métaux dans les plantes (racines et parties aériennes) afin d'évaluer les plantes phytoremédiatrices des autres tolérantes et l'identification et la caractérisation des bactéries rhizoplantes et endophytes par l'utilisation des techniques de biologie moléculaire (ERIC et BOX-PCR et séquençage).



# CHAPITRE II.

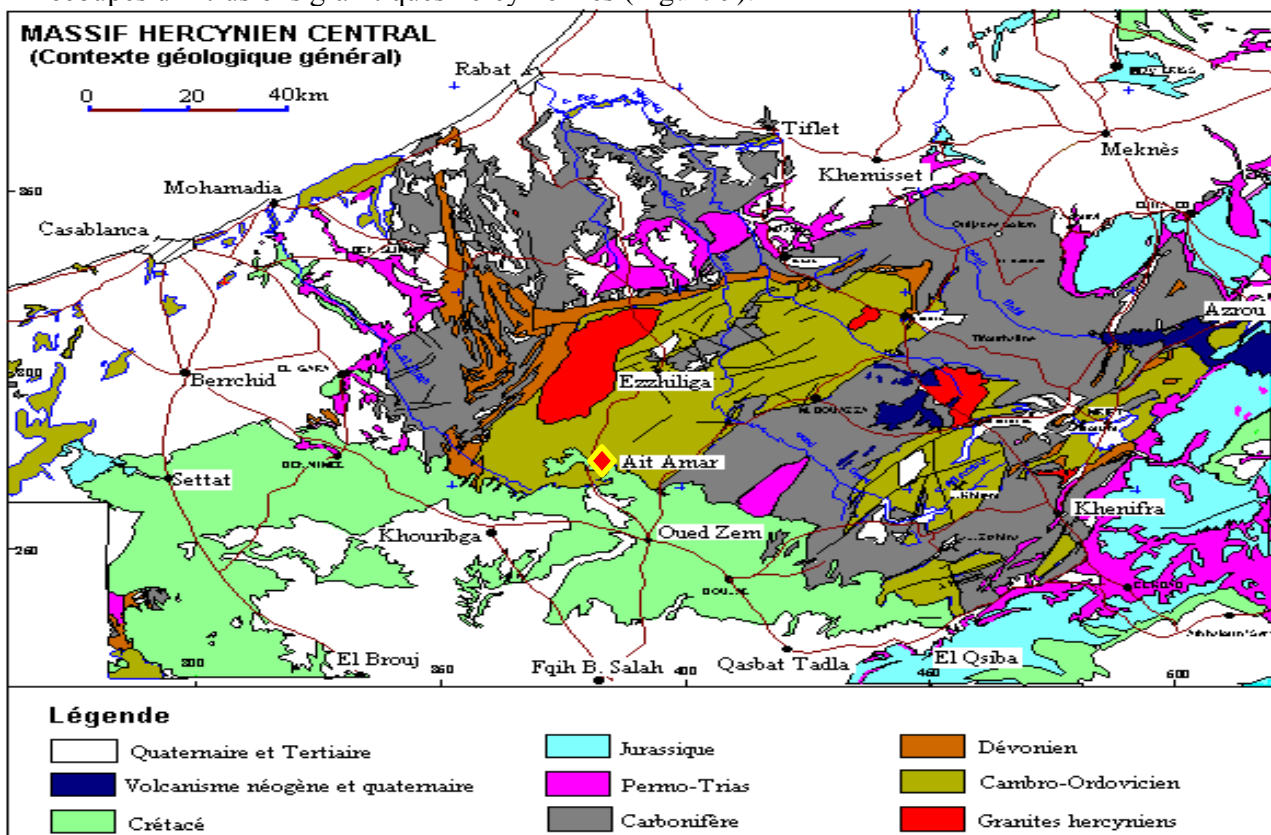
## Matériels & Méthodes



## I. Site étudié

La zone d'étude est un gisement de fer, se situe dans le nord-ouest de la ville d'Oued Zem (environ 25 km) dans la province de Khouribga. Le climat de la région est de type méditerranéen, aride à semi-aride avec une saison sèche d'Avril à Octobre et une saison de pluie de Novembre à Mars. Les précipitations moyennes annuelles sont de 350 mm avec une grande variation dans le temps et l'espace. Le moyenne d'évaporation annuelle est d'environ 1800 mm. Les températures connaissent des variations saisonnières très importantes: un pic en Août de 40 °C et un minimum en Janvier de 3 °C (Bellouti et *al.*, 2002).

Le gisement de fer d'Ait Ammar (33° 04' N; 6° 38' W) se trouve dans le massif hercynien central. Ce dernier, correspond au vaste plateau, qui occupe la partie septentrionale de la meseta marocaine occidentale. Il est limité au nord par le miocène de l'avant pays rifain, au sud par le plateau des phosphates et à l'est par le causse moyen atlasique. Le massif hercynien central est constitué, essentiellement, de terrains paléozoïques allant de l'ordovicien au carbonifère, organisés en une suite d'anticlinoriums et de synclinoriums, d'orientation générale NE-SW, et recoupés d'intrusions granitiques hercyniennes (Figure 9).



**Figure 9.** Contexte géologique régional du secteur d'Ait Ammar (Ministère de l'Énergie et des Mines).

Le gisement de fer d'Ait Ammar fait partie de l'anticlinorium de khouribga-oulmès où il est encaissé dans une série schisto-gréseuse (l'intercalation schisteuse peut atteindre 0,5 à 4 m), d'âge ordovicien (Llandeilien inférieur et moyen). Cette série est coiffée par d'importantes lentilles gréseuses ou grésoschisteuses, parfois transformées en de véritables quartzites.

La minéralisation ferrifère se présente sous forme de deux couches lenticulaires de fer oolithique, intercalées dans cette série gréseuse dont la puissance est estimée à une centaine de mètres (1000 à 1500 m). La couche minéralisée débute par un niveau de schistes noirs chloriteux.

La couche principale, qui a fait l'objet d'exploitation en carrière, puis en souterrain, s'étend sur 3 km, avec un pendage de 20° NE et une puissance maximale de 30 m, dans sa partie centrale.

Vers les extrémités, le minerai devient de plus en plus pauvre et la puissance de la couche se réduit jusqu'à disparition complète parmi les terrains encaissants.

La composition minéralogique de la minéralisation ferrifère comprend: chamosite (39 %), magnétite (28 %) et sidérite (13,4 %). Les autres minéraux associés sont: apatite (3,5 %), muscovite + argile (11,3 %), quartz (1,7 %) et des traces d'oligiste, antigorite, pyrite, hématite, psilomélane, diopside et mispickel (Ministère de l'Énergie et des Mines, Direction régionale de Beni Mellal).

Ce gisement (Figure 10), exploité entre 1937 et 1962 par la société marocaine des mines et des produits chimiques (SMMPC), a produit environ 6 millions de tonnes de minerai. Cette exploitation, faite en carrière et partiellement en souterrain, a cessé, d'une part, par les teneurs en Fe basses (entre 43 et 47 %) et élevées en silice (entre 12 et 17 %) et alumine (8 %) et d'autre part, pour des raisons de frais d'exploitation élevés (passage de l'extraction en découverte à l'exploitation souterraine vers 1957) en adoptant la méthode d'exploitation des chambres et piliers: l'abattage se faisait à l'explosif, le chargement à la main et le roulage par berlines. Suite à ces difficultés, la direction des mines du ministère de tutelle a chargé le Bureau de recherches et de Participations Minières (BRPM) d'étudier les différents aspects, techniques et commerciaux, permettant à cette exploitation de continuer. Après une étude qui a placé ce dernier dans son contexte géologique et paléogéologique, ce gisement a examiné les possibilités d'enrichissement de son minerai à l'évaluation de ses ressources.



**Figure 10.** Le gisement de fer d'Ait Ammar.

Il est à signaler, que la société exploitait dans des conditions très défavorables par suite d'un manque de mécanisation (concassage, chargement et abattage), d'un personnel ouvrier instable et d'un prix de transport élevé. La conjugaison de ces différents facteurs a abouti à la fermeture de la mine en 1963-1964 (Ministère de l'Énergie et des Mines, Direction régionale de Beni Mellal).

## **II. Protocole d'échantillonnage**

Etant donné que les sites pollués ont souvent une composition très hétérogène, un échantillonnage systématique a été conçu. La zone étudiée a été divisée en quatre transepts (T.1.1, T.2.1, T.3.1 et T.4.1) (Figure 11). Des échantillons de sol contaminé (4 transepts avec 5 points chacun) et un échantillon non contaminé comme référence (0 - 20 cm de profondeur) ont été prélevés le 19 Juillet 2010. Les échantillons ont été tamisés à 2 mm et soumis à une caractérisation physico-chimique. Les coordonnées géographiques de chaque échantillon dans le site ont été déterminées avec un système de localisation mondial (GPS). Les coordonnées de chaque site sont présentées dans le tableau 2.

L'ensemble des manipulations expérimentales effectuées utilisant comme matériel le sol est résumé sous la forme du schéma récapitulatif présenté sur la figure 12.

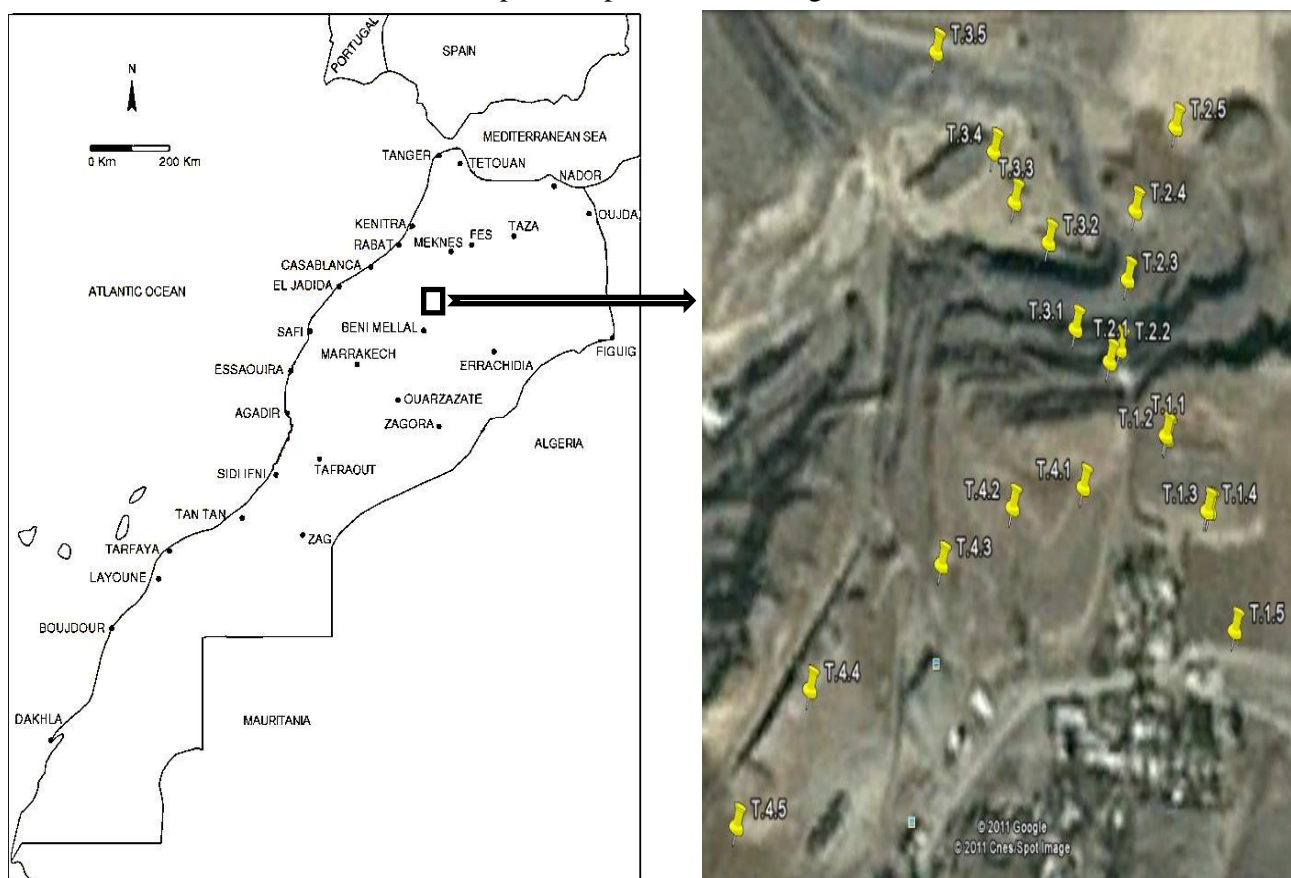
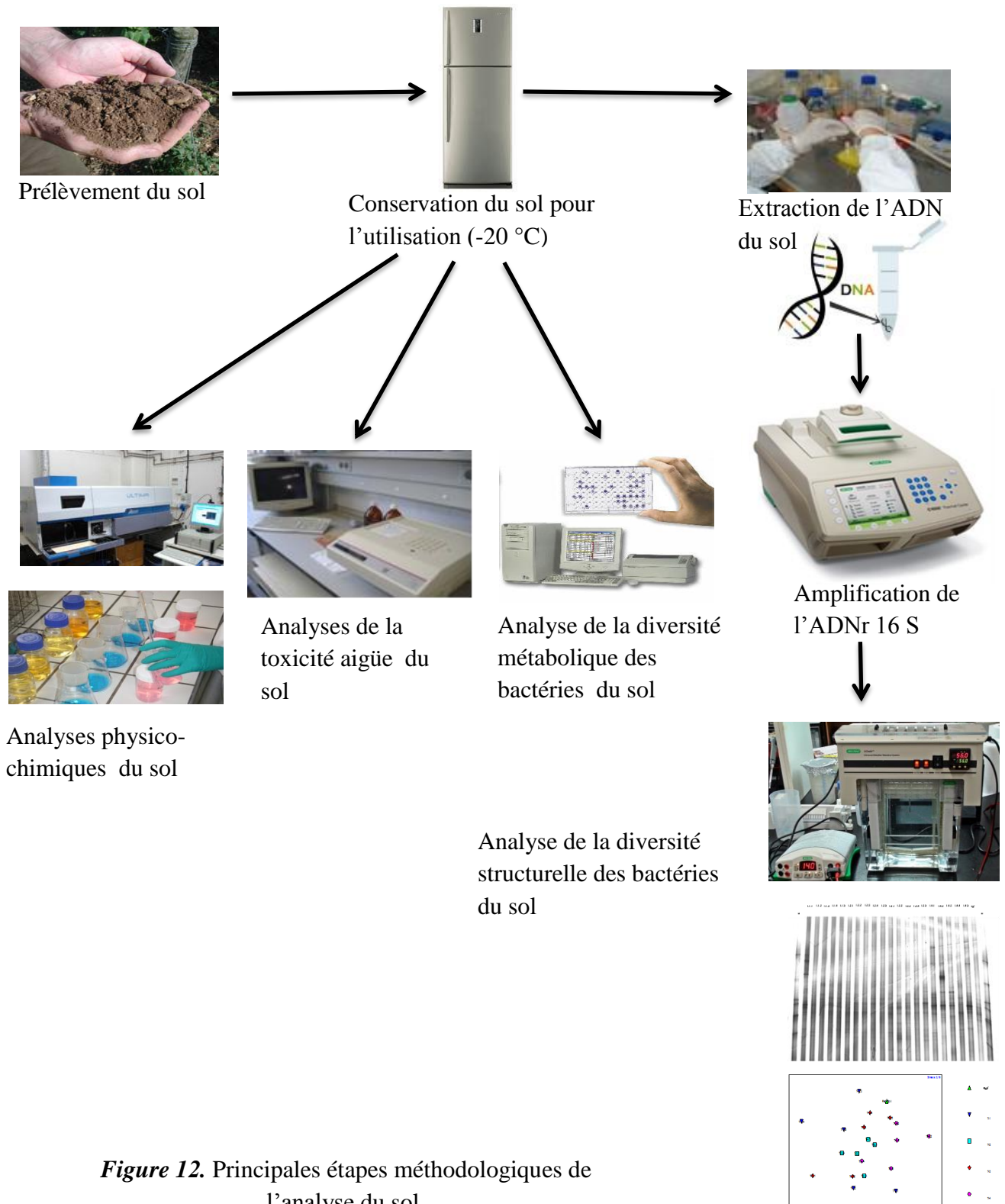


Figure 11. Site d'étude, Ait Ammar, région d'Oued Zem et localisation de prélèvements.

Tableau 2. Description du site d'étude dans la région d'Oued Zem.

Code d'échantillon	Coordonnées UMT
T.1.1	29 S 720066 3661172
T.1.2	29 S 720065 3661173
T.1.3	29 S 720105 3661134
T.1.4	29 S 720103 3661134
T.1.5	29 S 720129 3661071
T.2.1	29 S 720014 3661211
T.2.2	29 S 720023 3661218
T.2.3	29 S 720029 3661255
T.2.4	29 S 720035 3661292
T.2.5	29 S 720070 3661337
T.3.1	29 S 719983 3661228
T.3.2	29 S 719958 3661273
T.3.3	29 S 719927 3661294
T.3.4	29 S 719908 3661320
T.3.5	29 S 719855 3661372
T.4.1	29 S 719992 3661144
T.4.2	29 S 719929 3661132
T.4.3	29 S 719866 3661100
T.4.4	29 S 719750 3661031
T.4.5	29 S 719686 3660957
Réf	29 S 727740 3634697



**Figure 12.** Principales étapes méthodologiques de l'analyse du sol.

### III. Descriptif des analyses physico-chimiques

La connaissance des propriétés physico-chimiques des polluants dans les sols permet de mieux appréhender leurs mécanismes de transformation et de transfert, et ainsi de mieux prévoir leur lixiviation. Néanmoins, les réactions sol-polluant sont nombreuses et les interactions, souvent difficiles à identifier et à quantifier, viennent complexifier ce système.

### 1. Granulométrie

L'analyse granulométrique a été réalisée par une analyse mécanique selon la méthode décrite dans FAOUN (1984). La partie minérale des échantillons du sol obtenu après un prétraitement avec de l'eau oxygénée pour oxyder la matière organique et avec une solution d'hexamétaphosphate de sodium pour disperser les particules, a été séparé en différentes fractions (2 mm, 1 mm, 500  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$  et 63  $\mu\text{m}$ ) par tamisage (Figure 13). Dans les sols ferrallitiques, les oxydes de fer et les substances organiques assurent des liaisons avec les argiles. Pour mieux estimer la répartition de chaque fraction, il est primordial de détruire ces liaisons. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur cette méthode qui consiste tout d'abord à détruire la matière organique à l'eau oxygénée ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et à disperser l'argile par l'hexamétaphosphate de sodium.



Figure 13. Refus dans les différents tamis.

### 2. Analyse de la teneur en eau

La matière sèche est évaluée en mesurant l'évolution de la masse d'échantillon prélevé humide après passage à l'étuve à 105 °C. Pour cela, 10 g du sol humide sont prélevés et placés dans des creusets de porcelaine puis pesés au centième de gramme. Les creusets sont ensuite placés à l'étuve à 105 °C pour une durée de 24 heures et pesés à nouveau. La différence de masse observée permet de calculer la teneur en eau des échantillons.

### 3. Mesure du $\text{pH}_{\text{eau}}$ , $\text{pH}_{\text{KCl}}$ et de la conductivité électrique

Le  $\text{pH}_{\text{eau}}$  (l'acidité réelle) du sol et la conductivité électrique sont mesurées dans une suspension sol-eau (1:5, v/v rapport d'extraction) selon la méthode décrite dans FAOUN (1984). Ainsi, dans des flacons en polypropylène, 10 g de chaque échantillon de sol, ont été agités mécaniquement avec 50 ml d'eau distillée pendant 30 min. Les mélanges ont été laissés reposer pendant 1 h et le pH du surnageant a été mesuré en utilisant un pH-mètre pré-étalonné. La conductivité a été mesurée avec un conductivité-mètre, dans la même suspension, qui a été laissé au repos pendant la nuit pour permettre à la majeure partie du sol de se tasser (FAOUN, 1984).

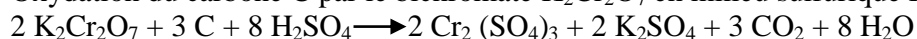
L'acidité potentielle ( $\text{pH}_{\text{KCl}}$ ), le pH a été mesuré conformément à la procédure recommandée par la norme internationale FAOUN (1984) et Dewis et Freitas (1984). Le pH des sols est mesuré après dilution dans une solution de chlorure de potassium KCl 1N. Pour l'analyse du pH, 10 g de chaque échantillon de sol sont prélevés et dilués dans 50 mL d'eau ou de KCl 1N, agités pendant 15 min sur une table d'agitation de type orbital (700  $\text{tr}\cdot\text{mn}^{-1}$ ), puis laissés au repos pendant 30 min. Le pH est ensuite mesuré à l'aide d'un pH-mètre. L'équilibre ionique atteint entre la phase solide et la phase liquide, la mesure du pH est effectuée par différence de potentiel existant entre une électrode de mesure et une électrode de référence plongée dans la solution aqueuse de la suspension en équilibre avec l'échantillon.

Le  $\text{pH}_{\text{eau}}$  mesure l'acidité réelle et prend en compte les ions  $\text{H}_3\text{O}^+$  libres dans la solution du sol. Le  $\text{pH}_{\text{KCl}}$  mesure l'acidité potentielle qui prend en compte les ions  $\text{H}_3\text{O}^+$  libres dans la solution du sol et ceux déplacés par le KCl.

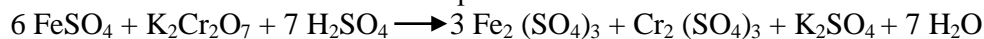
#### 4. Dosage du carbone organique total (COT)

Le dosage du COT est basé sur l'oxydation du carbone organique C par le bichromate de potassium  $K_2Cr_2O_7$  (Walkley et Black, 1934) selon le schéma réactionnel suivant:

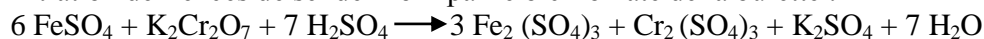
\* Oxydation du carbone C par le bichromate  $K_2Cr_2O_7$  en milieu sulfurique  $H_2SO_4$ :



\* Réduction de l'excès de bichromate par le sulfate de fer  $FeSO_4$  du sel de Mohr  $Fe_2(SO_4)_3$ :



\* Titration de l'excès de sel de Mohr par le bichromate de la burette :



Théoriquement, 1 mL de solution 1N de  $K_2Cr_2O_7$  oxyde 3mg de carbone organique. Si l'on considère que le taux d'oxydation n'est pas total, on ne pourra que prendre le taux de 77% correspondant au taux de la méthode Walkley et Black par rapport à la méthode Anne pour les sols.

#### 5. Dosage de l'azote total: Méthode Kjeldahl

Le dosage de l'azote total sous ses formes ammonium, nitrate, nitrite et organique, est basé sur la minéralisation à ébullition de type Kjeldahl en utilisant un catalyseur au Sélénium et en présence de cuivre ( $K_2SO_4 + CuSO_4 \cdot 5H_2O + Se$ ). 2 g du sol sont mis à digérer dans 20 mL d'acide sulfurique  $H_2SO_4$  pur pendant 1 h. Cette étape est suivie d'une distillation au cours de laquelle l'ammoniac  $NH_3$  libéré est titré par une solution d'acide sulfurique  $H_2SO_4$  à 0.1N.

#### 6. Les concentrations métalliques et du phosphore: totale et biodisponible

Les concentrations des métaux totaux ont été déterminées par spectrométrie d'émission atomique ICP-AES après digestion des échantillons. Le protocole peut être résumé de la façon suivante :

1. Peser 150 mg (entre 140 et 160 mg) d'échantillon dans un bécher téflon Savillex 30 mL.
2. Ajouter 2 mL de  $HNO_3$  conc. (70 %), on sait que la réaction peut être assez moussante sur des échantillons contenant des carbonates ou des sulfures. laisser les béchers ouverts, porter à sec sur la plaque chauffante à 100 - 110 °C;
3. Ajouter 3 ml de HF concentré, fermer les béchers, et laisser 15 heures (au minimum on peut même laisser deux à trois jours) sur la plaque chauffante à environ 140 - 150 °C;
4. Sortir les béchers de la plaque. Après refroidissement, ouvrir les béchers et porter à sec sur la plaque chauffante à environ 110 °C;
5. Ajouter 2 ml de  $HNO_3$ , laisser les béchers ouverts et porter à sec sur la plaque chauffante à environ 110 °C;
6. Ajouter 2 ml de HCl, laisser les béchers ouverts, porter à sec sur la plaque chauffante à environ 120 °C;
7. Sortir les béchers de la plaque et les remettre dans leurs portoirs, ajouter 25 ml de HCl 2M (on peut avoir préparé à cet effet du HCl 2M dans une bouteille munie d'un distributeur), fermer les béchers, agiter, laisser 2 heures sur l'autre plaque chauffante à environ 100 °C;
8. Sortir les béchers de la plaque et peser le poids total (bécher + bouchon + solution) et le noter sur le log de mises en solution ou directement sur la feuille de calcul.

Après refroidissement et filtration, on détermine les concentrations de Cd, Cr, Cu, Pb, Zn, Fe et P par ICP-AES (Jobin Yvon ULTIMA 2).

Les concentrations biodisponibles des métaux du sol (la fraction mobile) ont été déterminé selon la procédure d'extraction avec 0,01 M  $CaCl_2$  (Gupta et *al.*, 1996) et, parfois, cette fraction dénommée comme "la fraction efficace du métal biodisponible " (Alvarenga et *al.*, 2009). Selon l'expérience acquise par Pueyo et *al.* (2004), la procédure d'extraction avec 0.01 M  $CaCl_2$  semble être une méthode appropriée pour la détermination de la mobilité du Cd, du Cu, du Pb et du Zn dans les sols, car cette procédure présente une capacité d'extraction approprié pour ce type d'études et utilise également une concentration de sel plus faible. Ce fait simplifie la matrice des extraits et facilite la détermination du métal avec les techniques d'analyse, telles que l'ICP-AES.

Les concentrations des métaux et phosphore ont été déterminées en utilisant 0,01M du CaCl<sub>2</sub> (1/10 du sol ( $\leq 2$  mm) / 0,01 M CaCl<sub>2</sub>) (Houba *et al.*, 1990; NEN 5704, 1996). Après avoir agité pendant 2 h sur une table agitatrice, les extraits ont été décantés et 60 ml ont été centrifugés (2000 xg), et les concentrations en métaux et en phosphore ont été mesurées par ICP-AES.

#### IV. Analyses biologiques

##### 1. Techniques microbiologique

###### 1.1. Diversité métabolique: BIOLOG<sup>®</sup> EcoPlaque

L'analyse des Profils physiologiques des communautés microbiennes (*Community Level Physiological Profil: CLPP*), a été conduite avec des microplaques commerciales BIOLOG<sup>®</sup> EcoPlaque (Biolog, Inc., Hayward, CA). Cette méthode rapide permet d'analyser l'utilisation de différentes sources de carbone par une communauté bactérienne et donc de déterminer la diversité métabolique d'un échantillon naturel. Sur une microplaque de 96 puits, 31 sources de carbones sont testées simultanément en triple (Tableau 3). Chaque puits contient un substrat carboné, un colorant et des nutriments. Le tétrazolium qui change de couleur quand il est réduit avec la source de carbone permet de détecter la respiration. Le tétrazolium est réduit en formazant par NADH libéré par les bactéries. Si la bactérie est capable de dégrader le substrat carboné, elle libérera du NADH qui réduira le tétrazolium. Le protocole a été adapté d'après (stephan *et al.*, 2001).

**Tableau 3.** Substrats disposés sur les microplaques Biolog<sup>®</sup> EcoPlaques.

Classes chimiques	Composés
Glucides	D-cellobiose, Érythritol, Acide D-galactonique $\gamma$ -lactone, N-acétyl-D-glucosamine, Glucose-1-phosphate, $\beta$ -méthyl-D-glucoside, D, L- $\alpha$ -glycérol-phosphate, $\alpha$ -D-lactose, D-mannitol, D-xylose
Acides carboxyliques	Acide $\gamma$ -hydroxybutyrique, Acide $\alpha$ -cétobutyrique, Acide D-galacturonique, Acide D-glucosaminique, Acide itaconique, Acide D-malique, Acide pyruvique méthyl ester
Acides aminés	L-arginine, L-asparagine, Acide glycy-L-glutamique, L-phénylalanine, L-sérine, L-thréonine
Sources de carbone complexe	$\alpha$ -cyclodextrine, Glycogène, Tween 40, Tween 80
Amines	Phényléthylamine, Putrescine
Acides phénolique	Acide 4-hydroxybenzoïque, Acide 4-hydroxybenzoïque

Environ 2 g du sol ont été pesé deux fois en deux tubes à essais et incubés dans l'obscurité à 20-28 °C pendant une semaine. Après cette période, on ajoute 20 ml d'une solution de pyrophosphate de 0,2 % dans chaque tube à essai. Après, 1 ml du mélange de l'échantillon a été transféré dans un autre tube à essai, et on ajoute 18 ml de pyrophosphate. Le tube a été mélangé et 140  $\mu$ l d'aliqotes de cette solution ont été placés dans les puits de la microplaque du Biolog<sup>®</sup>. Les microplaques inoculées (un pour chaque échantillon) ont été incubées dans l'obscurité à 20-28 °C pendant 15 jours. Les lectures sont réalisées et enregistrées deux fois par jour dans un spectrophotomètre (Tecan Sunrise) pour la mesure de l'absorbance à 590 nm, et en se terminant lorsque la couleur des puits ne change plus.

Les AWCD (*Average Well colour development*) ont été calculé pour chaque microplaque: les valeurs d'absorbance brutes des puits à différents temps de lecture ont d'abord été retournées à blanc premièrement par rapport à la lecture du temps "zéro", puis les valeurs, ont été retournées à blanc deuxièmement par rapport au puits qui ne contenant pas de source de carbone (puits témoins négatifs) de chacune des plaques. Toutes les valeurs négatives ont été remises à zéro. AWCD a été calculé comme la moyenne des valeurs d'absorbance obtenues pour les 95 des puits (Garland et Mills, 1991). Pour chaque temps de lecture, les valeurs de DO<sub>590</sub> ont été utilisées pour quantifier



la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes du sol en calculant le nombre de substrats utilisés ( $DO_{590} > 0,15$ ) par la communauté (richesse). Pour comparer l'effet de la toxicité des échantillons, les données d'utilisation des substrats ont également été divisées en six catégories de substrat représentant différentes guildes de substrat (glucides, des acides carboxyliques, des polymères, des acides aminés, des amines et des substrats divers) et l'absorbance moyenne dans chaque catégorie a été analysée (Garau et al., 2007).

$$AWCD = \Sigma (C - R)/n$$

Où :

C = DO de chaque substrat

R= DO du témoin d'eau stérile

n = nombre de substrats (31)

Les AWCD et les substrats guildes des différents échantillons ont été comparés en utilisant des mesures répétées. Les ordinations basées sur la similarité des échantillons ont été obtenus par une non-métrique multidimensionnelle (MDS). Par la suite un ANOSIM a été calculé pour déterminer les différences significatives, soit entre le prélèvement (dans le cas d'AWCD) ou parmi la toxicité des échantillons (dans le cas des corporations de substrat). La matrice de similitude soulignée est obtenue avec la distance euclidienne des valeurs d'AWCD transformées en  $\log(x + 1)$ . Les analyses de coefficient de rang de Spearman sont réalisées avec SPSS v17 et la MDS et l'ANOSIM sont calculés avec PRIMER 5 pour les logiciels Windows.

### 1.2. Test de toxicité du *V. fischeri*: Microtox®

Les bactéries *Vibrio fischeri* NRRL-B-1177 utilisés pour le test sont fournies sous forme lyophilisées (fournies par Azur Environmental Corp., USA) et rehydratés dans de l'eau ultra pure.

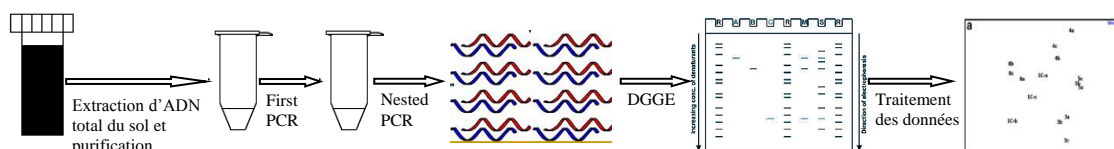
Les essais ont été exécutés selon le protocole du test Basic de la phase solide Microtox® (Microbics-Corporation, 1992) en milieu NaCl 35 % (35 mL) à 15 °C et à l'obscurité. L'inhibition de la luminescence des bactéries en 30 min a été mesurée avec le luminomètre Azur 500 (Microbics Model 500 Analyser) et les données sont analysées avec le logiciel Microtox® Omni de Windows version 1.18 (*data Collection and Reduction, Azur Environmental*). Les bactéries sont placées dans l'échantillon à tester (10 µL) dont la salinité est préalablement ajustée (ajout d'une solution de NaCl 35 %), et la luminescence des bactéries dans l'échantillon comparée à la luminescence dans une solution standard de NaCl 35 %. Les dilutions au ½ sont effectuées dans le même milieu (NaCl 35 %).

La concentration efficace nécessaire pour induire des effets toxiques sur 50 % de la population ( $EC_{50}$ ) a été déterminée pour chacun des échantillons de sol. En outre, les données de toxicité ont été classées selon une classification française basée sur les valeurs d' $EC_{50}$  (exprimée en mg/L) (Mamindy-Pajany et al., 2013). Suite à la qualité des sols, quatre scores de toxicité (0-3) sont établis: négligeable ( $EC_{50} > 10$ , score 0), faible ( $0,5 < EC_{50} < 10$ , note 1), modéré ( $0,2 < EC_{50} < 0,5$ , score 2) et élevé ( $EC_{50} < 0,2$ , note 3).

## 2. Techniques de biologie moléculaire

### 2.1. PCR-DGGE

Cette technique, très utilisée en écologie microbienne, permet d'évaluer la diversité dans une communauté complexe de micro-organismes sur la base de leurs génotypes. Elle est basée en premier lieu sur une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) qui permet l'amplification d'une région cible du génome (Figure 14).



**Figure 14.** Principe de l'analyse de la structure des communautés microbiennes du sol par PCR-DGGE.

*a. Extraction d'ADN*

Les échantillons des sols congelés subissent une décongélation douce à 4 °C. Le kit commercial *UltraClean Soil DNA kit* a été utilisé (*mobio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA*) pour l'extraction de l'ADN directement du sol et la purification selon le protocole du fabricant. La qualité de l'ADN a été contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % avec du TAE 1X (Tris-acétate-EDTA). Après migration, le gel est révélé par la coloration de l'ADN avec la solution de coloration des acides nucléiques RedSafe™ ADN (20000 X) puis photographié sur une plaque à UV. L'ADN extrait a été stocké à -20 °C pour les applications futures.

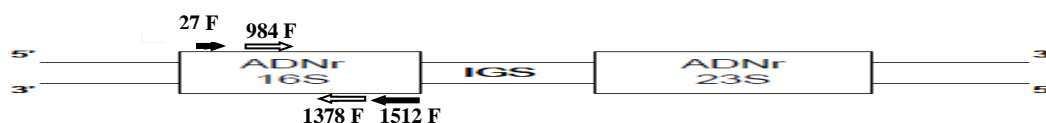
*b. Amplification de l'ADN par PCR*

La PCR est une technique qui permet d'amplifier le nombre de copies d'une séquence spécifique d'ADN et donc de détecter la présence de celle-ci grâce à l'accumulation des amplicons. Cette technique se base sur la répétition de cycles l'élongation d'amorces-spécifiques du gène ciblée grâce à une polymérase thermorésistante. L'activité polymérase est contrôlée via un thermocycleur qui assure les changements de température propres à obtenir les phases de dénaturation, d'hybridation, d'élongation de l'ADN. Avec des amorces, le protocole suivant a été utilisé:

L'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S a été réalisée dans un volume réactionnel de 25 µL en deux étapes. La première PCR, contenant 0,5 µL de BSA (2 mg.mL<sup>-1</sup>), 2,5 µL de désoxynucléotides triphosphates (dNTPs), 0,25 µL des amorces 27F (Gomes et al., 2001) et 1512R (Cawthorn et al., 2008) (Tableau 4 et Figure 15), 2,5 µL de 10x Tampon PCR (KCl), 3 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2,5 U de Taq polymérase (Fermentas) et 1 µL d'ADN. La deuxième PCR (nested PCR) contenant 0,5 µL d'acétamide (50 %), 2,5 µL de désoxynucléotides triphosphates (dNTPs), 0,25 µL des amorces 984F-GC et 1378R (Heuer et al., 1997) (Tableau 4 et Figure 15), 2,5 µL de 10x Tampon PCR (KCl), 3 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2,5 U de Taq polymérase (Fermentas) et 1 µL d'ADN. Les amplifications ont été réalisées avec un thermocycleur C1000™ (Bio-Rad, Hercules, CA). Le programme d'amplification des deux PCR est présenté dans le tableau 5.

**Tableau 4.** Les amorces utilisées pour l'amplification d'ADN.

PCR	Amorce	Séquence (5'-3')	Référence
First PCR	27 F	AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG	(Weisburg et al., 1991)
	1512 R	ACGGTTACCTTGTACGACTT	(Weisburg et al., 1991)
Nested PCR	984 F	AACGCGAAGAACCTTAC	(Heuer et al., 1997)
	1378 R	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	(Nübel et al., 1996 ; Heuer et al., 1997)
	GC-clamp	CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGG GCGGGGGCACGGGGGG 5' lié au 984F	(Nübel et al., 1996)



**Figure 15.** Schéma de la structure de l'unité d'ADN ribosomique (ADNr) bactérien et position des amorces utilisées. IGS = InterGenic Spacer.

**Tableau 5.** Les conditions d'amplification d'ADN par PCR.

PCR	Etape d'amplification	Température °C	Temps	Nombre de cycle
First	Dénaturation initiale	94	5 min	30
	Dénaturation	94	45 sec	
	Hybridation	56	45 sec	
	Elongation	72	1 min 30 sec	
	Elongation finale	72	10 mn	
Nested	Dénaturation initiale	94	4 min	35
	Dénaturation	94	1 min	
	Hybridation	53	1 min	
	Elongation	72	1 min 30 sec	
	Elongation finale	72	7 mn	

La qualité des produits de PCR ont été contrôlée par électrophorèse dans des gels d'agarose 1 % colorés avec la solution de coloration des acides nucléiques RedSafe™ ADN (20000 X). Pour chaque amplification, un contrôle positif (16S ADNr d'*Escherichia coli*) et un contrôle négatif ont été utilisés comme références.

#### c. Analyse de la diversité bactérienne par DGGE

Le principe de la DGGE est présenté dans la partie bibliographie (voir chapitre II p 21). La migration électrophorétique est effectuée avec le système Biorad D-CODE (Universal Mutation Detection System, Bio-Rad, Hercules, CA) selon le mode opératoire décrit ci-dessous.

La migration se fait dans un gel de 1 mm d'épaisseur contenant:

3. Une solution de polyacrylamide à 8 % (acrylamide / bis-acrylamide 37,5:1).
4. Un gradient linéaire de substances dénaturantes égal à 32-72 %. Ces solutions dénaturantes de 32 et 72 % étant obtenues *via* une solution mère à 100 % contenant de l'urée (7M) et du formamide (40% v : v).
5. Des agents de polymérisation: il s'agit de 85 µL de l'Ammonium persulfate (APS) 10 % et de 30 µL du Temed.

Le gel est coulé entre deux plaques de verre maintenues dans une position verticale. Ensuite préalablement la formation est faite à l'aide d'un peigne.

En fin de polymérisation, environ 45 minutes à l'air ambiant et après retrait du peigne et nettoyage des puits à l'aide du tampon (TAE 1X), le gel est placé dans le bain DGGE contenant du TAE 1X à 60 °C. Environ 8 µL des produits de PCR sont introduits dans le gel en présence d'un tampon de charge. La migration se déroule pendant 16 h à 75 volts.

A l'issue du temps de migration, les gels sont colorés à l'argent selon Heuer *et al.* (1997). Pour ce faire, le gel est immergé à l'obscurité pendant 20 minutes dans la première solution de coloration contenant 750 µL d'acide acétique, 15 mL d'éthanol, 0,3 g de nitrate d'argent et la quantité suffisante pour 150 mL de l'eau milli-Q stérile. Après un lavage avec eau milli-Q, le gel est immergé dans la deuxième solution de coloration composée de 50 mL de la soude 9 %, 405 µL d'aldéhyde formique 37 % en agitant à température 54,5 °C et en fin le gel est stocké dans la troisième coloration (stop solution) composée du carbonate de sodium 0,75 %. Une photo du gel est ensuite réalisée sur une plaque UV avec le logiciel Molecular Imager FX (Bio-Rad, Hercules, CA).

#### d. Interprétation des gels DGGE

Un marqueur est déposé dans les deux puits situés aux deux extrémités opposées du gel afin de permettre les comparaisons inter-gel. Il est constitué des souches bactériennes dont les distances de migrations des séquences d'ADNr 16S sont connues. Ces distances sont variables selon les souches et leur répartition est telle qu'elle recouvre la totalité de la distance de migration.

L'analyse du gel est réalisée à l'aide du logiciel GelCompar 4.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgique). Cette analyse comporte 4 étapes:

1. La définition des limites du gel et des différents profils à analyser;
2. La définition de certains paramètres tels que le bruit de fond;
3. la définition du marqueur qui permet le réajustement du ou des gels, c'est à dire que l'on va corriger les différentes distances de migration sur chacun des gels en utilisant le marqueur de migration;
4. La vérification et l'assignation des bandes sur chaque profil.

En fin d'analyse DGGE, chaque échantillon est représenté par un profil DGGE caractérisé par l'absence ou la présence d'une bande (phylotypes) dont l'intensité est variable en fonction de la représentativité du phylotype dans l'échantillon de départ. Le logiciel permet l'identification des bandes et la quantification de leurs intensités et leurs distances. La position et l'intensité des bandes ont été traitées dans Excel (Microsoft), et l'intensité de la bande a été convertie en intensité relative en divisant l'intensité sur la somme de toutes les intensités des bandes sur une voie (échantillon). Ce traitement a été effectué avec une tolérance et d'optimisation de (0,5 %).

On obtient ainsi une matrice comportant  $p$  lignes (échantillons) et  $n$  variable (bandes). Celle-ci est ensuite utilisée pour le traitement des données.

#### e. Traitement des données

A partir de cette matrice, l'analyse statistique est réalisée à l'aide du logiciel Primer 5 (PRIMER-E Ltd, Plymouth, United Kingdom), on génère une matrice de similarité avec le test de Bray Curtis (transformée avec  $\log(x + 1)$ ). Ce test couramment utilisé en écologie, il permet de satisfaire tous les critères désirés (Clarke et Warwick, 2001):

1. il attribue une valeur de 100 quand deux échantillons sont similaires (ce qui n'est pas le cas de tous les tests);
2. il attribue une valeur de 0 quand les deux échantillons n'ont aucune espèce en commun (c'est une condition que beaucoup de tests ne réalisent pas);
3. sa valeur est inchangée par l'ajout ou l'exclusion d'espèces qui sont conjointement absentes des deux échantillons (ceci est une autre difficulté à satisfaire et beaucoup de tests ne réalisent pas);
4. l'ajout ou la suppression d'un troisième échantillon, C, dans la base de données ne donne pas de différences à la similarité entre A et B (étonnamment, beaucoup de coefficients ne suivent pas cette condition, car ils dépendent d'une forme d'étalonnage portant sur chacune des espèces et sur le nombre total d'espèces ou à travers le nombre maximal obtenu sur tous les échantillons);
5. il a la possibilité de prendre en compte l'abondance totale de deux échantillons ce qui apporte une plus grande précision quand les abondances relatives sont identiques entre deux échantillons.

A partir de la matrice de similarité, on réalise une représentation en *multi-dimensional-scaling* (MDS). Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant l'ANOSIM, indice de Shannon-Wiener (H) (logarithme de base de 2) et la corrélation de rang de Spearman.

## V. Les plantes

Les espèces végétales (herbacées) les plus abondantes dans le site d'étude ont été collectées (Figure 16).



**Figure 16.** Plantes récoltées du site d'étude pour les analyses physico-chimiques. 1 : *Echinops spinosus* L. ; 2 : *Eryngium ilicifolium* Lam. ; 3 : *Carlina acaulia* subsp *caulescens* ; 4 : *Eryngium triquetrum* Vahl. ; 5 : *Carthamus lanatus* L. ; 6 : *Scolymus hispanicus* L. ; 7 : *Leontodon hispidulus* (Delile) Boiss. ; 8 : *Bromus rubens* L. ; 9 : *Lamarckia aurea* L. (Moench). ; 10 : *Cladanthus arabicus* (L.) Cass. ; 11 : *Bromus hordeaceus* ; 12 : *Stipa capensis* Thunb.

Les plantes ont été, tout d'abord, recueillies, placées dans des sacs en plastique stériles et transportées immédiatement au laboratoire à 4 °C dans un réfrigérateur. La figure 17 représente le diagramme du protocole expérimental des analyses utilisant comme matériel les plantes.

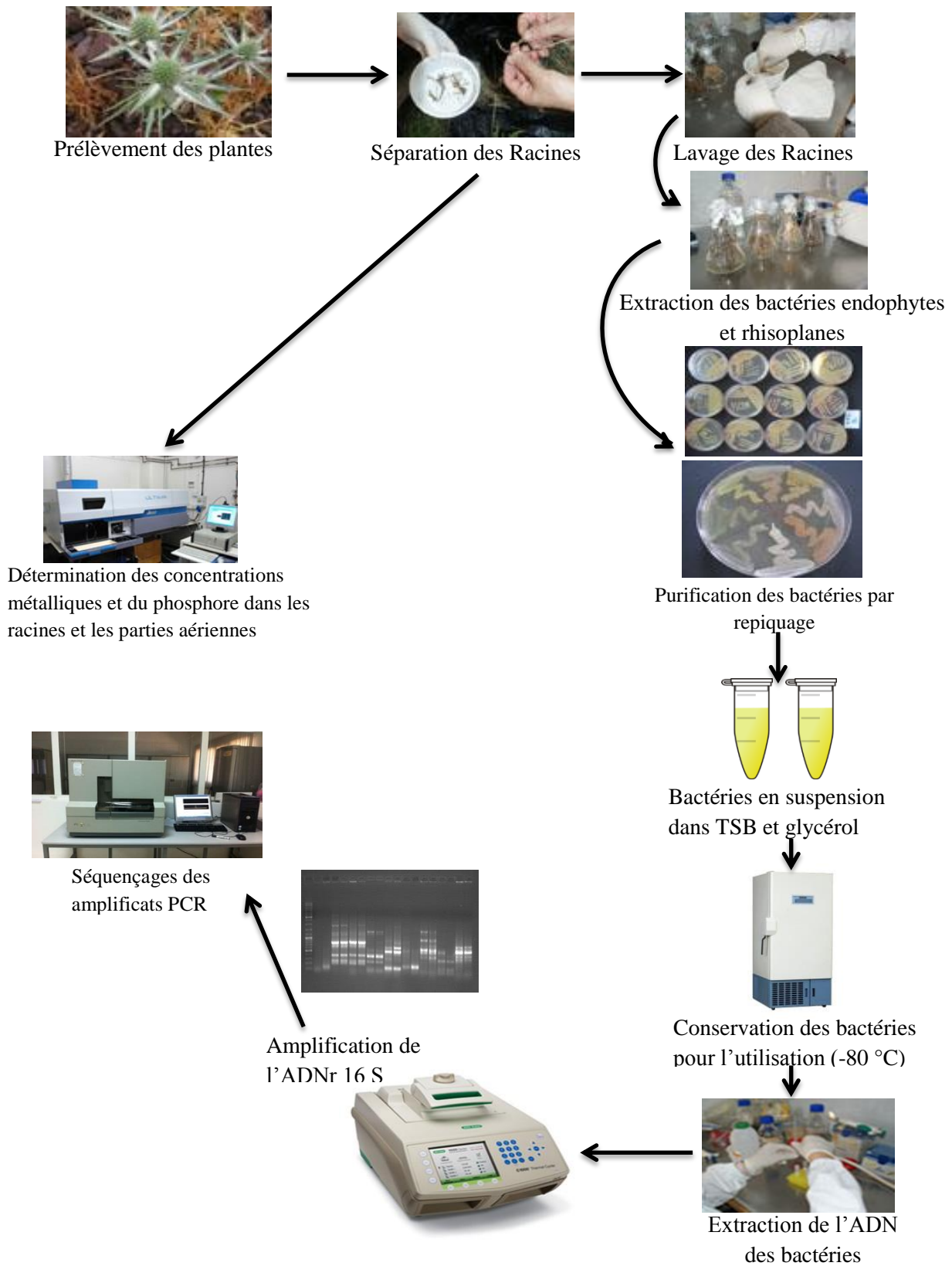


Figure 17. Principales étapes méthodologiques du traitement des plantes.

## 1. Les analyses physico-chimiques: Concentrations totales des métaux et du phosphore

Les échantillons des plantes ont été lavés avec de l'eau du robinet afin d'éliminer toute la surface du sol ou de dépôt de poussière, puis rincés deux fois avec de l'eau distillée et séparés en racines et pousses. La biomasse sèche des pousses et des racines de chaque espèce a été obtenue après le séchage des échantillons à 80 °C pendant 24 heures. Par la suite, ces échantillons ont été broyés en poudre fine et soumis à des analyses pour déterminer les concentrations des métaux et le phosphore selon la méthode USEPA 3050. 1 g d'échantillons de plantes ont été digérés en utilisant des acides nitrique et chlorhydrique. L'échantillon a été dilué à 100 ml et analysé pour déterminer les concentrations totales des métaux (Cd, Cr, Cu, Zn, Pb et Fe) et du P par ICP-AES.

## 2. Analyses biologiques

### 2.1. Techniques microbiologique

#### 2.1.1. Isolement des bactéries rhizoplantes

Les bactéries rhizoplantes ont été isolées à partir des racines des plantes *Eryngium ilicifolium* Lam., et *Eryngium triquetrum* Vahl. (Figure 16), de procéder plus tard à l'analyse des profils 16S ADNr de ces communautés. Le protocole suivi dans cette étude est basée sur les travaux de Gomes et al. (2001), Forcheti et al. (2007), Aravind et al. (2008) et Dias et al. (2009). Pendant le processus d'isolement, toutes les étapes nécessitent des conditions stériles et la procédure a en principalement lieu dans une hotte à flux laminaire et en utilisant du matériel stérile.

Les racines ont été coupées avec une paire de ciseaux (environ 5 g) puis rincées 4 fois dans une solution tampon saline de phosphate (PBS: *Phosphate-buffered saline*) (Fisher - BioReagents 10x) pour éliminer les particules de sol et les lâches rhizobactéries. L'excès de PBS sur les racines a été enlevé avec du papier absorbant et, à ce moment-là, les particules de saleté visible ont été enlevées avec une paire de pincettes. Les racines ont été mises dans une Erlenmeyer avec des perles de verre de 4 mm environ de diamètre (la quantité de perles sur chaque ballon était à peu près égal au poids des racines) et immergés dans une solution de pyrophosphate de sodium à 0,01 % (Acros Organics - Pro Analyse) contenant 0,1 % de Tween 20 (Sigma-Aldrich) (le volume de la solution ajoutée est de 45 ml pour 5 g de racines). Ensuite, les flacons ont été placés sur un agitateur orbital à 200 tours par minute pendant 30 minutes. Cette procédure a permis aux bactéries rhizoplantes de se concentrer dans la solution liquide. La solution finale a été diluée en série à  $10^{-6}$  et 100 µL de chaque dilution ont été étalées sur des boîtes de pétri contenant la Gélose Tryptone-soja TSA (*Tryptone Soya Agar*) (Himedia IVD) en moyen (3 boites par dilution) et incubées à 28 °C et les boites ont été surveillés tous les jours (Gomes et al., 2001) . Pour empêcher la croissance des champignons, les milieux TSA devrait être complétés avec 40 mg.L<sup>-1</sup> de cyclohexamide (Sigma-Aldrich ≥ 94 %).

#### 2.1.2. Isolement des bactéries endophytes

Les bactéries endophytes ont été isolées à partir des racines des plantes *Eryngium ilicifolium* Lam et *Eryngium triquetrum* Vahl (figure 16). On procède plus tard à l'analyse des profils 16S ADNr de ces communautés. Le protocole suivi dans cette étude est basé sur les travaux de Gomes et al. (2001), Forcheti et al. (2007), Aravind et al. (2008) et Dias et al. (2009). Pendant le processus d'isolement, toutes les étapes nécessitent des conditions stériles et la procédure a en principalement lieu dans une hotte à flux laminaire et en utilisant du matériel stérilisé.

Pour procéder à l'extraction des bactéries endophytes, les mêmes racines, utilisées pour l'extraction des bactéries rhizoplantes (voir précédemment), étaient encore une fois lavées avec de l'eau distillée, puis couper en petits segments 2-3 cm de long avec une paire de ciseaux. Les racines ont été immergés dans du PBS et laisser tremper pendant 10 min, afin de stériliser les surfaces radiculaires. Les segments de racines ont été immergés successivement dans l'éthanol à 70 % pendant 1 min, en hypochlorite de sodium à 2,5 % (Sigma-Aldrich 6-14 % Cl actif) contenant 0,1 % de Tween 20 pendant 20 min et enfin à nouveau dans de l'éthanol 70 % pendant 30 sec. Après les immersions, les segments des racines sont rincés à l'eau distillée 5 fois. De la solution résultant du dernier lavage, 100 µL ont été réparties dans des boîtes de pétri en TSA

contenant cyclohexamide en double exemplaire pour chaque échantillon. Les boîtes ont été incubées à 28 °C, pendant 48 h, pour vérifier la présence bactérienne. L'absence de croissance bactérienne indique le succès du processus de stérilisation. Les racines étaient macérées dans un tampon PBS (volume nécessaire pour immerger les racines) en utilisant un mortier et un pilon. Une série de dilution de la solution macérât a été faite jusqu'à 10<sup>-6</sup> dilution et 100 µL de chaque dilution est répartie dans des boîtes de TSA (3 plaques par dilution) et incubé à 28 °C et suivie quotidiennement.

### 2.1.3. Purification et stockage des bactéries

Après la croissance bactérienne (rhizoplane et endophytes), les colonies ont été purifiées par des stries. La biomasse des souches isolées sur boîtes de Pétri (TSA) est récupérée et conservée par congélation à -80 °C dans un milieu 5 % *Tryptone Soya Broth* (TSB) supplémenté avec 20 % de glycérol (99 %). (Dias et al., 2009).

### 2.1.4. Isolement de bactéries résistantes aux différents métaux

Les bactéries obtenues à partir des racines (bactéries endophytes et rhizoplanes) de plantes recueillis dans la région de mine seront inoculées dans un milieu contenant différents métaux à des concentrations différentes. Les concentrations de métaux à tester seront basées sur les concentrations moyennes respectives déterminées dans les échantillons de sol prélevés dans cette zone contaminée (Annexe).

#### a. La croissance des bactéries isolées pour les tests de résistance

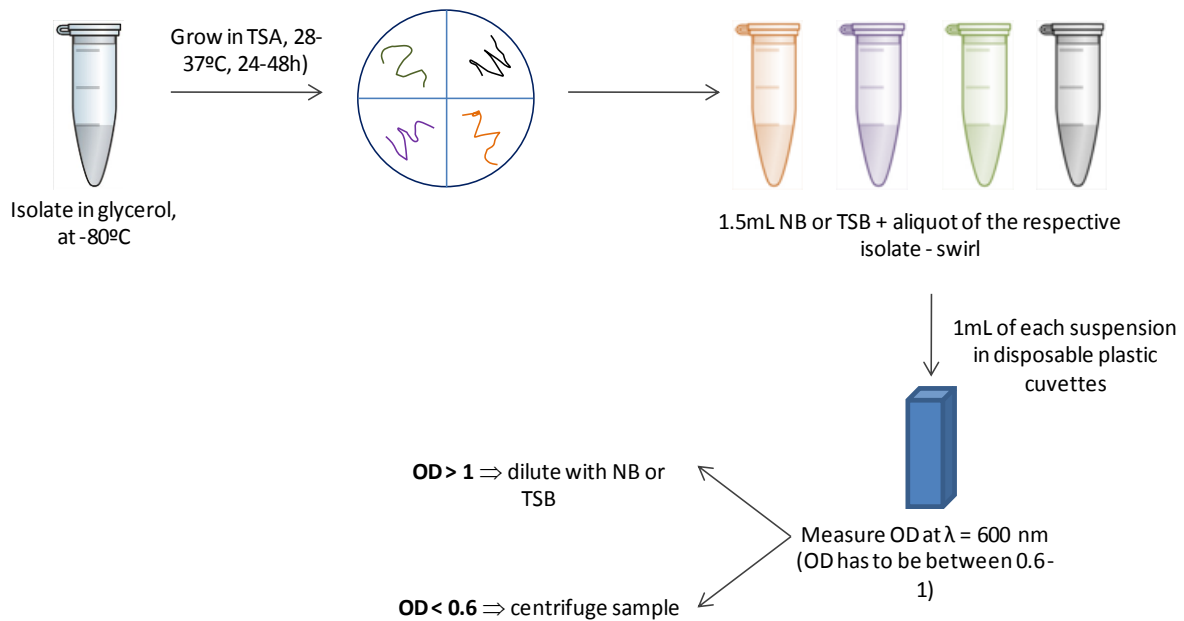
##### ✓ Dans un bouillon nutritif (ou TSB)

- \* Verser 5 ml de bouillon nutritif dans des tubes Falcon en plastique stériles de 15 ml;
- \* Transférer 5 µL de chaque bactérie isolée dans un tube;
- \* Placer les tubes inoculés dans l'obscurité à température ambiante pendant 4h sans agitation;
- \* Placer les tubes inoculés à 37 °C et à 100 tpm pour 11-14 h (nuit);
- \* Prendre les cultures de l'incubateur et les conserver à température ambiante et dans un endroit sombre ou enveloppés par du papier aluminium.

##### ✓ Dans des plaques de TSA

- \* Inoculer les bactéries isolées (dans TSB et glycérol à -80 °C) dans des boîtes avec TSA, en faisant plusieurs stries,
- \* Incuber pendant 48 heures à 28-37 °C,
- \* Prélever une aliquote des bactéries et les cultivées dans un Eppendorf contenant 1,5 ml de bouillon nutritif (ou TSB) et agiter,
- \* Pipeter 1 ml de cette suspension dans une cuvette en plastique de 1 ml et mesurer la densité optique à 600 nm. Le blanc est faite avec bouillon nutritif (ou TSB);
- \* La densité optique doit être comprise entre 0,6 et 1. Si elle est plus élevée, l'échantillon doit être dilué avec le bouillon nutritif (ou TSB). Si elle est inférieure, l'échantillon doit être centrifugé dans un minicentrifuge (VWR Galaxy Mini);
- \* Lorsque la densité optique est à l'intérieur de ces valeurs, la suspension est prête à être ensemencé dans les plaques de TSA contaminés par les solutions métalliques respectives (Figure 18).



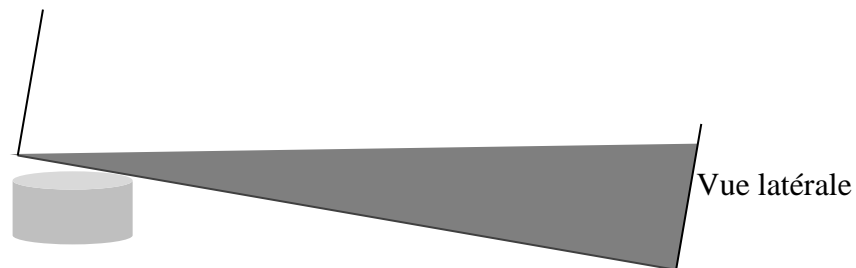


**Figure 18.** Les différentes étapes de croissance d'un clone résistant au métal.

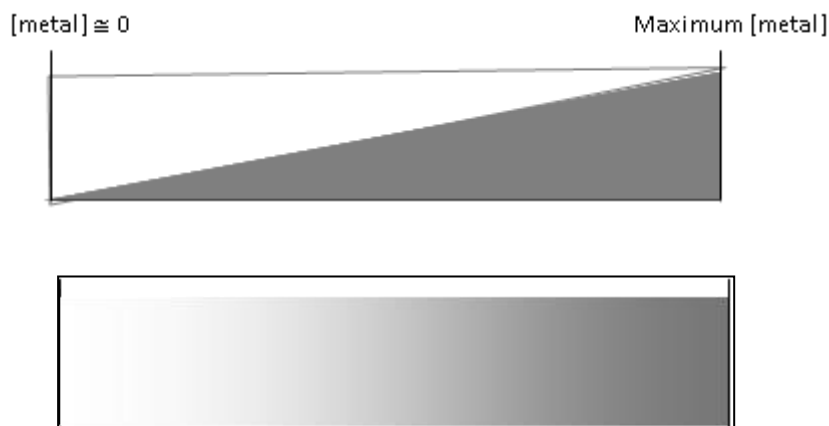
*b. Méthodologie pour tester la résistance de bactéries au métal*

Ce procédé considère le test d'un gradient de concentration du métal. Pour cela, on a utilisé des boîtes en plastique quadrangulaires.

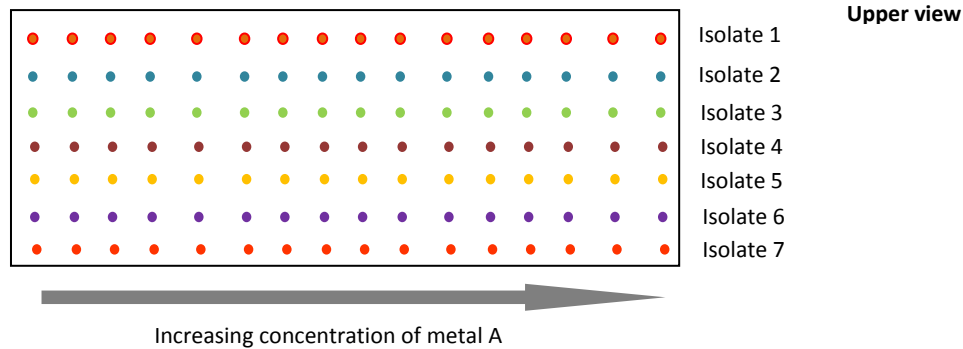
- \* Faire une solution avec la plus forte concentration du métal à tester;
- \* Préparer deux flacons avec TSA et les stérilisées. Laissez-les refroidir à 60-50 ° C et avant de se disperser dans les boîtes, contaminer l'un des flacons TSA avec le volume approprié de la solution métallique;
- \* Placer la plaque quadrangulaire en position inclinée Introduire 50 ml d'agar contaminé (le triangle gris sur la figure). Attendez que l'agar se solidifier;



- \* Puis retirer l'objet en dessous et mettre 50 ml de gélose non contaminés dans la plaque sur la gélose solidifiée contaminés. De cette façon, la gélose non contaminé se défendre travers celui contaminés, en créant ainsi un gradient de concentration de métal;



- \* Avec une micropipette pipeter plusieurs fois 1  $\mu\text{L}$  (jeter jusqu'au 1er arrêt de la micropipette) de chaque suspension bactérienne et la déposer au long de la ligne horizontale de la plaque, conformément à la figure ci-dessous. (Assurez-vous que tout en rejetant la suspension n'est pas réparti sur l'agar sinon il sera difficile d'évaluer la croissance des bactéries, ainsi que, différentes bactéries peuvent se développer sur d'autres.);



- \* Les plaques seront incubées pendant 48 h à 28 °C et à la fin de cette période, il sera évalué la croissance des bactéries.
- \* Telle évaluation est qualitative: en utilisant les symboles "+", "++" et "+++", on peut décrire la croissance bactérienne entre les traitements testés, qu'ils grandissent moins ou de plus en plus.

Remarque: dans le but d'aider la distribution des différentes suspensions dans les boîtes, ainsi que leur identité, un papier de millimètre (marquées avec des points pour le rejet des suspensions) doit être maintenu au-dessous des boîtes. La position de chaque suspension doit être consignée dans un cahier.

## 2.2. Techniques de biologie moléculaire

Les différentes bactéries isolées au cours de nos travaux ont été identifiées par des méthodes moléculaires: Extraction de l'ADN total des isolats bactériens, ERIC-PCR, BOX-PCR et le séquençage de l'ADN 16S de bactéries cultivables comme était décrit précédemment.

### 2.2.1. Extraction de l'ADN total à partir des isolats bactériens

À partir des bactéries cultivées sur milieu solide (TSA) et avec l'utilisation d'une curie dent stérile, quelques colonies ont été prélevées. Par la suite, ces colonies ont été suspendues dans 20  $\mu\text{L}$  d'eau distillée stérile et ont été incubées 10 minutes à 100 °C dans un bain sec et ensuite l'ADN a été conservé à 4 °C jusqu'à caractérisation (ERIC ou BOX PCR) et séquençage.

### 2.2.2. ERIC PCR

ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR*) a été utilisé pour distinguer génétiquement les isolats (De Bruijn 1992; Versalovic et al., 1991). La plupart des isolats (58 types de bactéries) ont été caractérisés par l'ERIC-PCR. Il s'agit d'amplifier les segments intergéniques en utilisant un couple d'amorce défini d'après des séquences connues et répétées du génome des bactéries. C'est ainsi qu'on obtient des profils spécifiques de chaque souche, selon l'emplacement et le nombre de copies de ces séquences dans le génome bactérien. Les séquences des amorces oligonucléotidiques selon les travaux de Versalovic et al. (1991) et De Bruijn (1992) sont:

ERIC 1R: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'

ERIC 2R: 5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG-3'

Le contrôle négatif a été inclus dans les essais de PCR et les échantillons ont été exécutés régulièrement en double pour vérifier la reproductibilité des empreintes moléculaires. Les

conditions et le cycle d'amplification sont indiqués dans le tableau 6 et le tableau 7. Le volume de la solution finale est de 12,5  $\mu\text{L}$ .

Amplification a été réalisée dans un thermocycleur (Bio-Rad, C1000<sup>TM</sup>). L'amplification (10  $\mu\text{L}$ ) est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % avec TAE 0,5X (Tris acétate EDTA) à 120 V pendant 20 min. Le gel est révélé par la coloration de l'ADN avec la solution de coloration des acides nucléiques RedSafe<sup>TM</sup> ADN (20000 X) puis photographié sur une plaque à UV. Les isolats ont été regroupés en fonction de profils de bandes similaires avec un seuil de similarité de 80 %.

### 2.2.3. BOX PCR

Cette méthode consiste à l'amplification des fragments d'ADN en utilisant une amorce BOX A1R (Versaslovic et al., 1994) (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'). Elle s'est avérée être un outil utile au typage moléculaire de nombreuses bactéries Gram<sup>+</sup>. Elle n'est cependant pas très efficace pour le typage de Gram<sup>-</sup>, les motifs obtenus n'étant pas assez spécifiques. L'amplification est déroulée suivant presque le même protocole que celui décrit précédemment pour ERIC PCR (Tableaux 6 et 7), nous changeons seulement les amorces et la température d'hybridation. L'amplification est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose suivant le même protocole que celui décrit pour ERIC PCR. Les isolats ont été regroupés en fonction de profils de bandes similaires avec un seuil de similarité de 80 %.

**Tableau 6.** Conditions réactionnelles pour l'amplification.

	Concentration	Volume		
		ERIC PCR (qsp 12,5 $\mu\text{L}$ )	BOX PCR (qsp 12,5 $\mu\text{L}$ )	16 S (qsp 25 $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O				
dNTPs	10 mM	0,25 $\mu\text{L}$	0,25 $\mu\text{L}$	0,5 $\mu\text{L}$
Amorce 1	100 $\mu\text{M}$	0,38 $\mu\text{L}$	0,76 $\mu\text{L}$	0,75 $\mu\text{L}$
Amorce 2	100 $\mu\text{M}$	0,38 $\mu\text{L}$		0,75 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,5 $\mu\text{L}$	1,5 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L}$
Tampon 5X	5 X	2,5 $\mu\text{L}$	2,5 $\mu\text{L}$	2,5 $\mu\text{L}$ (10X)
Taq	5 U/ $\mu\text{L}$	0,06 $\mu\text{L}$	0,06 $\mu\text{L}$	0,1 $\mu\text{L}$
DMSO		0,63 $\mu\text{L}$	0,63 $\mu\text{L}$	1,25 $\mu\text{L}$

qsp: quantité suffisante pour

**Tableau 7.** Cycle d'amplification utilisé.

PCR	Etape d'amplification	Température °C	Temps	Nombre de cycle
ERIC	Dénaturation initiale	95	7 min	35
	Dénaturation	94	1 min	
	Hybridation	52	1 min	
	Elongation	65	8 min	
	Elongation finale	65	16 mn	
BOX	Dénaturation initiale	95	7 min	35
	Dénaturation	94	1 min	
	Hybridation	53	1 min	
	Elongation	65	8 min	
	Elongation finale	65	16 mn	
16 S	Dénaturation initiale	94	9 min	30
	Dénaturation	94	30 sec	
	Hybridation	56	30 sec	
	Elongation	72	1 min 30 sec	
	Elongation finale	72	10 mn	

#### 2.2.4. Le séquençage de l'ADN 16S de bactéries cultivables

Tous les isolats bactériens (coefficient de similarité  $\leq 80\%$ ) sont soumis à une PCR ciblant le gène de l'ARN 16S avec les amorces 16S - 1Dr (5' AAG GAG GTG ATC CAG CC 3') et 16S - 1Df (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') décrit par Weisburg et *al.* (1991). Les amplifications sont exécutés dans un thermocycleur programmable (Bio-Rad, C1000<sup>TM</sup>). L'enzyme utilisée est la Taq polymérase de Fermentas. Selon les recommandations du fabricant et la composition du tampon et des mix PCR (Tableau 6). Le protocole de PCR est décrit dans le tableau 7. L'amplification est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose suivant le même protocole que celui décrit pour ERIC PCR. Les produits d'amplification sont destinés au séquençage.

#### 2.2.5. Identification des bactéries par séquençage

Les séquences d'ADN obtenues ont été comparées avec celles disponibles dans les bases de données GenBank et Ribosomal Database Project (pour les séquences d'ARNr 16S). Les similarités de séquence avec les séquences références obtenues ont été recherchées à l'aide des programmes BLASTn, disponibles sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

Les manipulations, les analyses et les alignements de séquences ont été réalisés en utilisant le logiciel Sequence Viewer version 7 (CLC Bio), puis retouché manuellement dans le même logiciel. Seuls les nucléotides non ambigus ont été utilisés pour les analyses phylogénétiques et évolution moléculaire en utilisant le logiciel MEGA version 6.0 (Tamura et *al.*, 2013) par les méthodes Neighbor joining avec la correction de Kimura (1980) et par des analyses de bootstrap sur 1000 répliques. Les séquences environnementales partageant plus de 90 % d'identité ont été considérées comme appartenant à une même espèce.

## VI. Traitement de données et analyse statistique

### 1. Tests paramétriques

Le test de student a été utilisé pour comparer les échantillons entre eux ou deux à deux. Ces analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS 17.0.

### 2. Tests non paramétriques

Les tests de Kruskal-Wallis, de Spearman, test de Bray Curtis, de Kolmogorov-Smirnov et de Pearson ont été utilisés pour comparer les échantillons entre eux ou deux à deux. Ces analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS 17.0.

### 3. Statistique Descriptive Multidimensionnelle

La statistique descriptive multidimensionnelle désigne l'ensemble des méthodes permettant de traiter simultanément un nombre quelconque de variables. Ces méthodes descriptives sont des outils très réponsus en biostatistique et ils sont particulièrement bien adaptés à l'analyse numérique de données écologiques.

#### 3.1. Analyse par réduction des dimensions

L'Analyse en Composantes Principales (ACP) est une méthode utilisée pour réduire  $p$  variables corrélées, en un nombre  $q$  de variables non corrélées de telles manières que les  $q$  variables soient des combinaisons linéaires des  $p$  variables initiales. Cette méthode a été appliquée à l'analyse de la relation entre les métaux, phosphore, pH, azote total et la matière organique.

L'ACP, notamment, est une méthode d'analyse factorielle permettant d'effectuer la synthèse de l'information contenue dans un grand nombre de variables (ici 10 variables) grâce à l'obtention de «composantes principales» qui sont des nouvelles variables, indépendantes, combinaisons linéaires des variables initiales possédant une variance maximale. Ces composantes principales (CP) autorisent une représentation graphique de grandes quantités de données trop complexes à décrire par les méthodes graphiques habituelles. Falissard (1996) a expliqué qu'il est possible d'y observer, au sens propre du terme, des regroupements, des

oppositions, des tendances directionnelles. Il a ajouté qu'il est impossible de discerner sur une grande matrice des nombres même après un examen prolongé.

Cette technique a également servi à l'analyse de la composition microbienne cultivable des échantillons, permettant ainsi de visualiser et de comparer les différentes populations par l'utilisation des AWCD.

### 3.2. Le positionnement multidimensionnel

Nous avons choisi le positionnement multidimensionnel MDS (*Multidimensional Scaling*) qui est une méthode d'analyse courante en écologie. Ainsi, l'homogénéité des populations bactériennes pour un site de prélèvement donné a été testée en comparant les profils de DGGE. Les erreurs entre les matrices de similarité de rang et la représentation MDS ont été évaluées grâce à une valeur d'un paramètre appelé «stress». De faibles valeurs de stress (0 à 0,2) indiquent une bonne représentation par le MDS de l'information contenue dans la matrice de similarité de rang. De fortes valeurs de stress (supérieures à 0,2) indiquent que le MDS ne permet pas une bonne représentation de l'information. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test de Bray Curtis et un test non-paramétrique (ANOSIM). Il teste les différences significatives entre les profils en se basant sur la dissimilarité qui les séparent. Il compare la dissimilarité entre groupes avec la dissimilarité à l'intérieur d'un groupe. La valeur de R donnée par le test statistique indique l'importance de la différence (R est compris entre 0 et 1 et plus R est élevé plus les échantillons sont différents) et la valeur de p indique le seuil de significativité de cette différence (Clarke, 1993);  $R < 0,25$  - pas de différences significatives,  $0,25 < R < 0,50$  - faible différence et  $0,50 < R < 1$  - haute différence (Clarke et Gorley, 2001).

Le test de similarité, l'ANOSIM, teste la proximité ou la similarité entre les groupes ou traitements. Cette similarité est calculée à travers le chiffre R-global. Cette valeur se définit comme le rapport de (moyenne des distances de rang entre groupes - moyenne des distances de rang intragroupes)/(le nombre de rang/2). La valeur de R-global est considérée comme statistiquement «utilisable» au seuil de  $p < 0,05$ . Si  $R\text{-ANOSIM} > 0,75$  les groupes sont bien séparés;  $0,5 < R\text{-ANOSIM} < 0,75$  les groupes sont considérés comme séparés mais légèrement chevauchant;  $0,25 < R\text{-ANOSIM} < 0,5$  les groupes séparés mais fortement chevauchant;  $R\text{-global} < 0,25$  les groupes non séparés (Paule, 2012). Les ANOSIM ont été réalisés avec le logiciel Primer v5 (PrimerE, Ltd, Luton, United Kingdom).

Cette technique a également servie à l'analyse de la composition microbienne cultivable des échantillons, permettant ainsi de visualiser et de comparer les différentes populations par l'utilisation des AWCD. La matrice de similitude a été obtenue avec la distance euclidienne normalisée des valeurs d'AWCD transformées en  $\log(x + 1)$ .

### 3.3. Analyse par classification hiérarchique

Le principe de la classification ascendante hiérarchique (CAH) consiste à créer une nouvelle partition de l'ensemble des données en agrégeant les deux éléments les plus proches (basée sur ces similitudes/dissimilitudes) selon une distance choisie à priori. La ressemblance des individus est mesurée par différents indices (similarité, dissimilarité ou distance). Pour l'analyse des données binaires, les indices les plus fréquemment utilisés sont l'indice de Jaccard, l'indice de Dice et l'indice de Ward. Pour des données quantitatives, la distance euclidienne est la plus appropriée.

La relation entre les profils de ERIC et BOX PCR a été analysée à partir de ces méthodes soit transformant les variables en matrices binaires (l'indice de Dice de similarité) basée sur la présence/absence de bandes, soit gardant les valeurs quantitatives (ERIC et BOX PCR) comme la hauteur des bandes pour le calcul d'une distance euclidienne. Ces matrices de l'indice de Dice de similarité ont permis de générer des dendrogrammes en utilisant la méthode UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). L'analyse de profils métaboliques Biolog<sup>®</sup> a également été réalisée par (CAH), les valeurs d'absorbance standardisée de chaque substrat ont été prises comme variables. Après le calcul d'une matrice de distance euclidienne des dendrogrammes ont été générés.

#### 4. Les facteurs de bioconcentration et de transfert

Le facteur de bioconcentration du sol ( $FBC_S$ ) se définit comme le rapport de la concentration du métal dans les pousses sec des plantes/concentration du métal dans le sol (Mattina et al., 2003; Ha et al., 2011), comme on peut déterminer le facteur de bioconcentration des métaux dans les racines des plantes ( $FBC_R$ ) se définit comme le rapport de la concentration du métal dans les racines des plantes / concentration du métal dans le sol (Malik et Biswas, 2012):

$$FBC = \frac{T_{Plante}}{T_{Sol}}$$

$T_{plante}$  : teneur en métal dans la plante ( $mg.kg^{-1}$  matière sèche)

$T_{sol}$  : teneur en métal dans le sol ( $mg.kg^{-1}$ )

Le facteur de transfert (FT), ou aussi appelé facteur de translocation (Mattina et al., 2003; Ha et al., 2011), est le rapport entre la concentration de métaux dans les pousses et les racines. Il définit l'efficacité de la plante à déplacer les métaux vers les pousses:

$$FT = \frac{T_{PA}}{T_{PR}}$$

$T_{PA}$  : teneur en métal dans les parties aériennes ( $mg.kg^{-1}$  matière sèche)

$T_{PR}$  : teneur en métal dans les parties racinaires ( $mg.kg^{-1}$  matière sèche)

#### 5. Indices de diversité

Plusieurs modèles mathématiques ont été développés pour mesurer la diversité, fournissant des informations relatives à la richesse et l'abondance des espèces, caractères ou fonctions. Parmi plusieurs indices existants, celui de Shannon est fréquemment utilisé en écologie.

La diversité fonctionnelle à partir des données Biolog<sup>®</sup> a été évaluée en calculant: Richesse (S), les indices de Shannon-Wiener (H), la régularité ( $E_H$ ), l'indice de Simpson (D) et l'activité totale selon les équations suivantes:

$$H = - \sum_{i=1}^N Pi(\ln Pi)$$

$$EH = H/Hmax = H/\ln S$$

$$D = \sum_{i=1}^S Pi^2$$

Substrat richesse = nombre moyen des puits positifs ( $DO > 0,15$ )

L'activité totale = Somme moyenne des valeurs d'absorption en triple plaques

Où  $P_i$  est le rapport de l'activité d'un substrat particulier sur la somme des activités de tous les substrats et S est la richesse du substrat (Zak et al., 1994). Les AWCD (*Average Well colour development*) ont été calculé pour chaque microplaque. L'AWCD pour chaque microplaque a été calculé:

$$AWCD = \Sigma (C - R)/n$$

Où :

C = DO de chaque substrat;

R= DO du témoin d'eau stérile;

n = nombre de substrats (31).

# CHAPITRE III.

## Résultats & Discussions

## I. Caractérisation physico-chimique et minéralogique du site étudié

### 1. Contexte et objectifs

L'exploitation minière est une activité essentielle qui fournit les matières premières pour la société. Toutefois, cette exploitation peut être accompagnée par des effets négatifs importants sur l'environnement et sur la santé humaine, si des précautions adéquates ne sont pas prises. En effet, puisque l'industrie minière est la source la plus importante des métaux lourds dans l'environnement (Adriano, 2001), la contamination par les métaux lourds a été l'un des graves problèmes dans le voisinage des sites miniers abandonnés. Ces métaux lourds ont un potentiel de contamination des sols et des eaux. Ils peuvent être dispersés et accumulés dans les plantes et les animaux, et pris en charge par les êtres humains en tant que consommateurs.

L'évaluation de la contamination des sols par les métaux lourds peut être déterminée par l'estimation de la fraction biodisponible des métaux toxiques. La mobilité de ces métaux dans les sols a été généralement évaluée en utilisant une approche chimique basée sur des extractions sélectives (Pueyo et al., 2004; Janoš et al., 2010).

La connaissance des propriétés du sol et les interactions entre elles et les métaux est importante pour évaluer la biodisponibilité de ces métaux et leurs absorptions par les plantes afin de réduire les risques de contamination de la chaîne alimentaire (Pinto et al., 2004). Les principaux objectifs de notre étude sont:

- (a) Déterminer les concentrations totales et biodisponibles du Fe et du P et d'autres métaux lourds associés (Cd, Cr, Cu, Pb et Zn) dans les sols du site étudié,
- (b) Enquêter la relation entre les propriétés du sol (pH, matière organique (MO), conductivité électrique (CE), granulométrie et azote total Kjeldahl (ATK)) et ces éléments,
- (c) Examiner la mobilité de ces métaux et du phosphore.

**Les résultats acquis, présentés ci-dessous, sont valorisés dans un article accepté dans la revue *Journal of Materials and Environmental Science*, 5(1) (2014), pp. 271-280.**

### 2. Caractérisation des sols étudiés

#### 2.1. Caractérisation physico-chimique

L'étude de l'évolution de huit paramètres chimiques conventionnels: humidité, pH,  $\Delta$ pH, CE, COT, ATK, C/N et teneur en MO a été effectuée à partir des sols de la mine d'Ait Ammar. Les résultats sont présentés dans le tableau 8. Les caractéristiques physico-chimiques des 20 échantillons du sol étudiés dans la mine et l'échantillon de référence démontrent une large gamme de propriétés physico-chimiques avec  $\text{pH}_{\text{KCl}}$ ,  $\text{pH}_{\text{Eau}}$ , conductivité, contenu de la MO, teneur en eau, COT, ATK et le ratio C/N variant de 3,99 à 7,14, 4,64 à 7,97, 32,40 à 1656,67  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ , 0,11 à 5,05 %, de 0,64 à 8,49 %, de 0,0647 à 2,929 %, 0,007 à 0,1884 % et 2,36 à 132,94, respectivement (Tableau 8).

L'étude de la granulométrie a été également effectuée. Les résultats sont présentés dans le tableau 9. La distribution des fractions granulométriques de cette étude est large. Les pourcentages varient entre 3,44 % et 37,13 % pour les graves, 27,43 % et 60,09 % pour les sables et 7,76 % et 69,08 % pour les argiles et les limons. Ces valeurs sont inférieures à celles de la référence surtout pour les argiles + limons et le contraire pour les graves. Cependant, les résultats de granulométrie montrent que l'échantillon du sol est principalement composé de sables et limons + argiles (en moyenne 47,07 % et 34,91 % respectivement). Selon le diagramme de texture (NF EN ISO 14688-2 d'avril 2005), la texture du sol est classée sable argileux/sable limoneux.



**Tableau 8.** Les caractéristiques physico-chimiques des sols de la mine d'Ait Ammar.

Echantillons	pH <sub>KCl</sub>	pH <sub>Eau</sub>	ΔpH	Conductivité μS.cm <sup>-1</sup>	MO (%)	humidité (%)	COT (%)	ATK (%)	C/N
T.1.1	6,13 ± 0,06	7,20 ± 0,10	1,08	151,77 ± 6,2	2,69	2,11	1,5593	0,0908 ± 0,0003	17,17
T.1.2	5,10 ± 0,04	7,38 ± 0,14	2,28	59,07 ± 1,9	0,85	2,83	0,4951	0,0840 ± 0,0000	5,89
T.1.3	5,29 ± 0,04	6,88 ± 0,02	1,60	82,33 ± 2,0	1,96	2,12	1,1353	0,0593 ± 0,0050	19,15
T.1.4	5,74 ± 0,02	6,99 ± 0,10	1,24	53,50 ± 1,0	0,82	1,79	0,4766	0,0105 ± 0,0049	45,39
T.1.5	5,77 ± 0,01	6,87 ± 0,20	1,10	103,17 ± 2,2	3,72	1,55	2,1579	0,0489 ± 0,0001	44,13
T.2.1	5,60 ± 0,05	6,94 ± 0,14	1,34	75,57 ± 4,4	2,68	1,51	1,5565	0,0489 ± 0,0000	31,83
T.2.2	4,89 ± 0,01	7,13 ± 0,06	<u>2,42</u>	40,27 ± 5,6	0,71	2,71	0,4117	0,0139 ± 0,0000	29,62
T.2.3	5,83 ± 0,01	6,90 ± 0,03	1,07	217,83 ± 3,4	2,22	1,56	1,2889	0,0175 ± 0,0050	73,65
T.2.4	6,21 ± 0,05	7,06 ± 0,10	0,85	100,17 ± 4,5	1,60	1,10	0,9306	<u>0,0070 ± 0,0000</u>	<u>132,94</u>
T.2.5	6,01 ± 0,03	7,41 ± 0,07	1,40	100,50 ± 5,1	0,88	6,02	0,5128	0,0839 ± 0,0001	6,11
T.3.1	5,44 ± 0,01	7,11 ± 0,06	1,67	55,37 ± 2,3	1,07	1,75	0,6216	0,0138 ± 0,0002	45,04
T.3.2	<u>3,99 ± 0,03</u>	<u>4,64 ± 0,02</u>	0,65	201,73 ± 6,8	1,28	<u>0,64</u>	0,7425	0,0417 ± 0,0001	17,81
T.3.3	5,72 ± 0,1	6,28 ± 0,09	<u>0,56</u>	<u>1656,67 ± 31,5</u>	<u>5,05</u>	1,51	<u>2,929</u>	0,1396 ± 0,0098	20,98
T.3.4	5,80 ± 0,12	6,68 ± 0,05	0,88	124,10 ± 14,8	2,21	1,67	1,2822	0,1249 ± 0,0008	10,27
T.3.5	6,33 ± 0,05	7,14 ± 0,06	0,80	200,23 ± 9,5	1,90	0,98	1,1038	0,0227 ± 0,0024	48,63
T.4.1	5,06 ± 0,06	6,84 ± 0,09	1,78	70,10 ± 2,0	0,77	2,18	0,4447	0,0140 ± 0,0000	31,76
T.4.2	4,39 ± 0,02	6,47 ± 0,03	2,08	78,13 ± 1,8	<u>0,11</u>	2,24	<u>0,0647</u>	0,0274 ± 0,0006	<u>2,36</u>
T.4.3	4,39 ± 0,01	6,63 ± 0,02	2,24	<u>32,40 ± 0,2</u>	0,99	3,12	0,5722	0,0208 ± 0,0097	27,51
T.4.4	5,79 ± 0,06	6,72 ± 0,07	0,93	95,77 ± 2,9	0,43	2,61	0,2511	0,1045 ± 0,0006	2,40
T.4.5	5,63 ± 0,01	6,54 ± 0,04	0,91	367,00 ± 8,2	2,13	5,50	1,238	0,0479 ± 0,0188	25,85
Réf.	<u>7,14 ± 0,02</u>	<u>7,97 ± 0,13</u>	0,83	161,17 ± 7,1	2,55	<u>8,49</u>	1,4798	<u>0,1884 ± 0,0203</u>	7,85

**Tableau 9.** Les caractéristiques granulométriques des sols de la mine d'Ait Ammar.

Echantillons	% Argile + Limon (< 0,063 mm)	% Sable (0,063 à 2 mm)	% grave (> 2mm)	Texture du sol
T.1.1	31,03	51,83	17,18	Sable Argileux / Sable Limoneux
T.1.2	22,67	59,06	18,21	Sable Argileux / Sable Limoneux
T.1.3	42,60	43,24	14,16	Sable Argileux / Sable Limoneux
T.1.4	25,27	55,32	19,42	Sable Argileux / Sable Limoneux
T.1.5	54,51	36,70	8,84	Limon Argilo-Sableux
T.2.1	22,81	57,63	19,54	Sable Argileux / Sable Limoneux
T.2.2	35,35	43,64	21,06	Sable Limono-Graveleux / Sable Argilo-Graveleux
T.2.3	29,55	46,63	23,84	Sable Limono-Graveleux / Sable Argilo-Graveleux
T.2.4	32,87	46,86	20,30	Sable Limono-Graveleux / Sable Argilo-Graveleux
T.2.5	61,58	29,50	8,91	Limon Argilo-Sableux
T.3.1	22,15	<u>60,09</u>	17,82	Sable Argileux / Sable Limoneux
T.3.2	<u>7,76</u>	55,14	<u>37,13</u>	Sable Graveleux
T.3.3	30,77	46,53	22,79	Sable Limono-Graveleux / Sable Argilo-Graveleux
T.3.4	44,58	44,58	10,75	Limon Argilo-Sableux
T.3.5	39,80	53,25	6,90	Sable Argileux / Sable Limoneux
T.4.1	29,76	37,92	32,34	Limon Sablo-Graveleux / Argile Sablo-Graveleux
T.4.2	22,34	52,23	25,50	Sable Limono-Graveleux / Sable Argilo-Graveleux
T.4.3	36,29	46,39	17,33	Sable Argileux / Sable Limoneux
T.4.4	37,42	42,65	19,98	Sable Argileux / Sable Limoneux
T.4.5	<u>69,08</u>	<u>27,43</u>	<u>3,44</u>	Limon Argilo-Sableux
Réf.	83,34	16,14	0,46	Limon Argileux

### 2.1.1. Les caractéristiques physico-chimiques, changeaient-elles en fonction de la distance ou de la direction par rapport au gisement?

Les tableaux 10 et 11 montrent les résultats des valeurs de R-global obtenues dans les différents tests d'ANOSIM des transepts et des rondes respectivement: les caractéristiques physico-chimiques des échantillons des transepts sont identiques (R-global = 0,131,  $p = 5,7$  %) et de même pour les échantillons des rondes (R-global = 0,24,  $p = 0,7$  %). Pour les

différents points d'échantillonnage des sols, il n'y a pas de différence significative entre les transepts et les rondes ANOSIM 2 (test de Spearman;  $\rho = 0,04$ ,  $p = 34,6\%$ ;  $\rho = 0,154$ ,  $p = 15,5\%$ , respectivement). Donc, la direction ou la distance par rapport au gisement de fer d'Ait Ammar n'ont pas d'influence significative sur les caractéristiques physico-chimiques du sol.

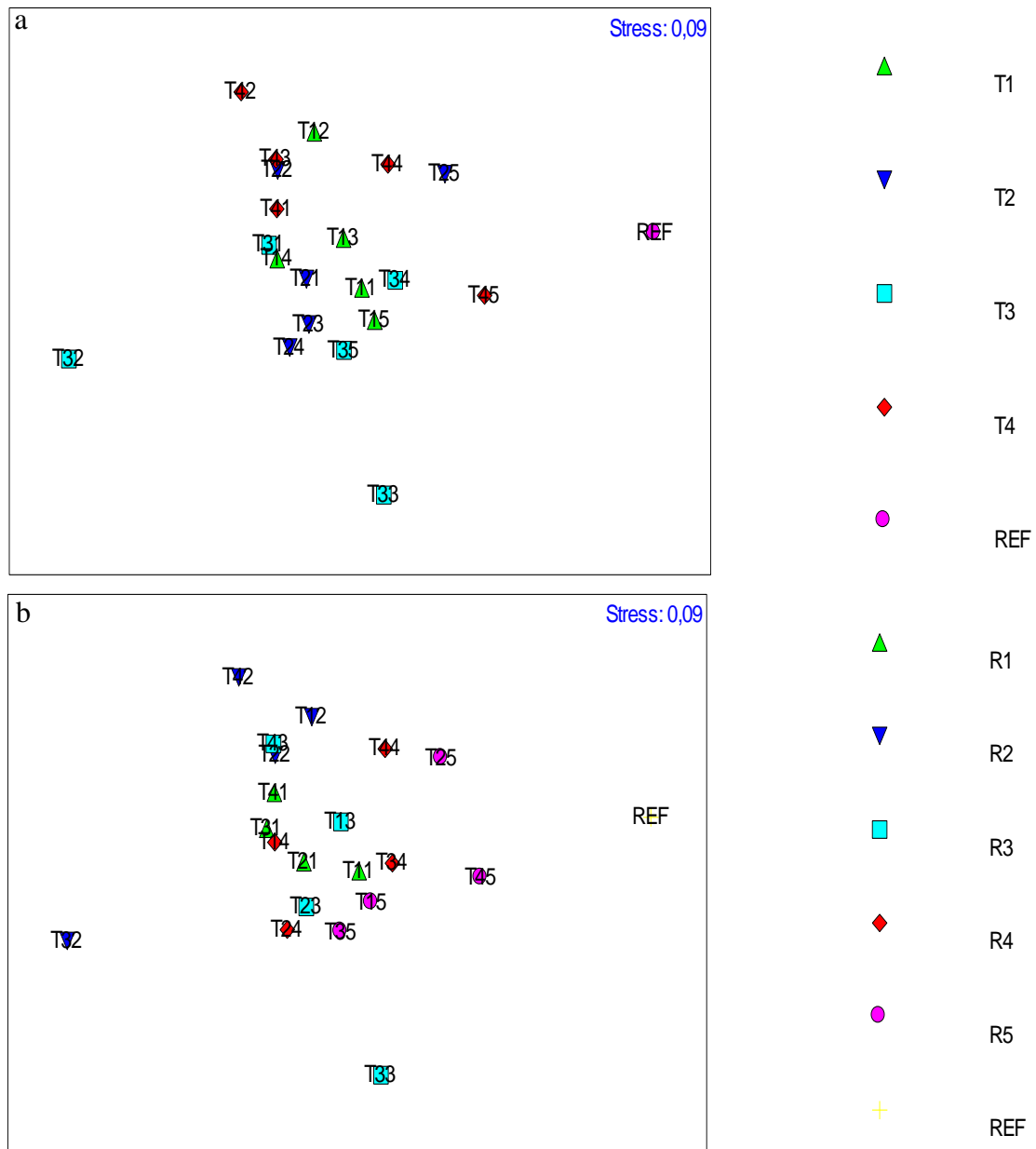
**Tableau 10.** Valeurs d'ANOSIM-R pour les différents échantillons du sol des transepts.

	<b>R-global</b>	<b>Niveau de signification %</b>
	<b>0,131</b>	<b>5,7</b>
<b>Groupes</b>	<b>R statistique</b>	<b>Niveau de signification %</b>
T.1, T.2	-0,108	81,0
T.1, T.3	-0,008	50,0
T.1, T.4	0,108	20,6
T.1, REF	1,0	16,7
T.2, T.3	0,012	42,9
T.2, T.4	0,076	27,8
T.2, REF	0,88	16,7
T.3, T.4	0,172	7,9
T.3, REF	0,8	16,7
T.4, REF	0,84	16,7

**Tableau 11.** Valeurs d'ANOSIM-R pour les différents échantillons du sol des rondes.

	<b>R-global</b>	<b>Niveau de signification %</b>
	<b>0,24</b>	<b>0,7</b>
<b>Groupes</b>	<b>R statistique</b>	<b>Niveau de signification %</b>
R.1, R.2	0,24	8,6
R.1, R.3	-0,063	60,0
R.1, R.4	0,042	34,3
R.1, R.5	0,438	2,9
R.1, REF	1,0	20,0
R.2, R.3	0,104	22,9
R.2, R.4	0,26	11,4
R.2, R.5	0,563	2,9
R.2, REF	1,0	20,0
R.3, R.4	-0,021	51,4
R.3, R.5	0,146	20,0
R.3, REF	0,917	20,0
R.4, R.5	0,094	31,4
R.4, REF	1,00	20,0
R.5, REF	0,833	20,0

Les résultats de ces tests confirment ceux des MDS (Figures 19) qui révèlent qu'il n'y a pas de différence claire entre les échantillons des transepts ou des rondes du sol étudié. Selon le niveau de stress évalué par MDS (0,09) la représentation bidimensionnelle est valide.



**Figure 19.** Analyse Multidimensionnelle non métrique (MDS) réalisée sur les résultats des caractéristiques physico-chimiques obtenus à partir de 4 transepts (T.1-T.4) avec 5 points chacun (1-5) et le sol de référence. a) par transept b) par ronde.

## 2.2. Caractérisation minéralogique

### 2.2.1. Concentrations totales des métaux dans les échantillons du sol

Les teneurs en éléments métalliques et en phosphore sont déterminées par ICP-AES après minéralisation (cf. Chap. II, § II.2.6). Les concentrations des métaux totaux ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) de six éléments d'intérêt (Cd, Cu, Cr, Fe, Pb et Zn) et un élément non métallique (P) obtenues pour 20 échantillons du sol contaminé et un sol de référence sont présentés dans le tableau 12. Ces concentrations des échantillons contaminés varient, considérablement, et vont de 14620 à 435490  $\text{mg.kg}^{-1}$  pour le Fe, de 50,96 à 222,16  $\text{mg.kg}^{-1}$  pour le Cr, de 22,25 à 153,3  $\text{mg.kg}^{-1}$  pour le Zn, de 14,35 à 99,61  $\text{mg.kg}^{-1}$  pour le Cu, de 0,62 à 34,57  $\text{mg.kg}^{-1}$  pour le Pb, de 0,37 à 20,4  $\text{mg.kg}^{-1}$  pour le Cd et de 270 à 9200  $\text{mg.kg}^{-1}$  pour le P. Leurs valeurs moyennes sont respectivement de 2,12  $\text{mg.kg}^{-1}$ , 134,58  $\text{mg.kg}^{-1}$ , 34,95  $\text{mg.kg}^{-1}$ , 90,77  $\text{mg.kg}^{-1}$ , 9,13  $\text{mg.kg}^{-1}$ , 213641,5  $\text{mg.kg}^{-1}$  et 3544,5  $\text{mg.kg}^{-1}$  pour le Cd, le Cr, le Cu, le Zn, le Pb, le Fe et le P. Les

teneurs moyennes des métaux totaux sont dans l'ordre décroissant suivant : Fe >>> P >> Cr > Zn > Cu > Pb > Cd.

La caractéristique la plus évidente des sols contaminés était la présence de niveaux relativement élevés de métaux lourds en comparaison avec le sol de référence, tels que le Cd (> 7,2 jusqu'à 397,2 %), le Cr (> 30,7 jusqu'à 133,8 %), le Cu (> 32,1 jusqu'à 222,5 %), le Zn (> 14,3 jusqu'à 98,7 %), le Pb (> 67,8 jusqu'à 3769,6 %), le Fe (> 24,5 jusqu'à 728,5 %) et, dans une moindre différence, pour le P (> 2,5 jusqu'à 83,5 %). Ces concentrations des métaux confirment bien une pollution polymétallique très importante.

**Tableau 12.** Les concentrations totales des métaux dans les sols du site minier Ait Ammar (mg.Kg<sup>-1</sup>).

Echantillons	Cd	Cr	Cu	Zn	Pb	Fe	P
T.1.1	1,370	108,376	28,776	76,237	12,457	228030,0	5530,0
T.1.2	0,972	142,368	59,522	<b>153,300</b>	28,668	<b>435490,0</b>	7910,0
T.1.3	<b>0,370</b>	<b>222,162</b>	42,717	98,394	8,945	317640,0	4530,0
T.1.4	1,325	81,210	23,130	62,360	2,853	182050,0	2840,0
T.1.5	1,179	88,018	27,702	85,071	0,982	75210,0	1150,0
T.2.1	0,911	119,737	36,194	65,559	0,911	199330,0	1540,0
T.2.2	1,533	89,042	26,054	63,755	17,471	179910,0	3430,0
T.2.3	1,655	113,335	31,022	115,610	26,679	214240,0	2660,0
T.2.4	0,556	<b>50,956</b>	<b>14,352</b>	<b>22,251</b>	12,350	<b>14620,0</b>	<b>270,0</b>
T.2.5	1,341	136,758	26,592	77,988	0,894	50490,0	450,0
T.3.1	3,057	136,966	51,974	145,323	0,815	373790,0	8240,0
T.3.2	1,927	192,272	28,905	152,876	1,071	296450,0	3710,0
T.3.3	0,711	139,099	22,561	29,490	1,421	49900,0	570,0
T.3.4	0,777	83,149	19,116	29,219	<b>0,622</b>	26220,0	390,0
T.3.5	0,808	113,314	20,691	35,077	13,740	31950,0	680,0
T.4.1	0,547	156,498	62,672	129,899	14,757	313080,0	6180,0
T.4.2	0,976	195,685	37,887	135,534	<b>34,567</b>	358810,0	<b>9200,0</b>
T.4.3	0,979	202,884	<b>99,607</b>	123,835	0,979	309560,0	5460,0
T.4.4	1,089	151,876	17,601	120,666	0,726	333280,0	3310,0
T.4.5	<b>20,399</b>	167,954	21,929	92,987	1,700	282780,0	2840,0
Réf	5,136	166,017	44,760	155,377	0,917	59780,0	11020,0

### 2.2.2. Les caractéristiques minéralogiques totales, changeaient-elles en fonction de la distance ou de la direction par rapport au gisement?

Les résultats de l'ANOSIM des transepts et des rondes montrent que les caractéristiques minéralogiques et précisément les résultats des métaux totaux des échantillons des transepts sont similaires (R-global = 0,064, p = 22,6 %) et de même pour les rondes (R-global = 0,157, p = 5,5 %) (Tableaux 13 et 14 respectivement). Même arrangement pour les différents points d'échantillonnage des sols, il n'y a pas de différence significative entre les transepts et les rondes ANOSIM 2 (test de Spearman;  $\rho = 0,211$ , p = 7,4 %;  $\rho = 0,069$ , p = 28,3 %, respectivement). Donc, selon les caractéristiques minéralogiques (concentrations métalliques totales), la direction ou la distance par rapport au gisement étudié n'ont pas d'influence significative sur les concentrations totales des métaux lourds du sol.

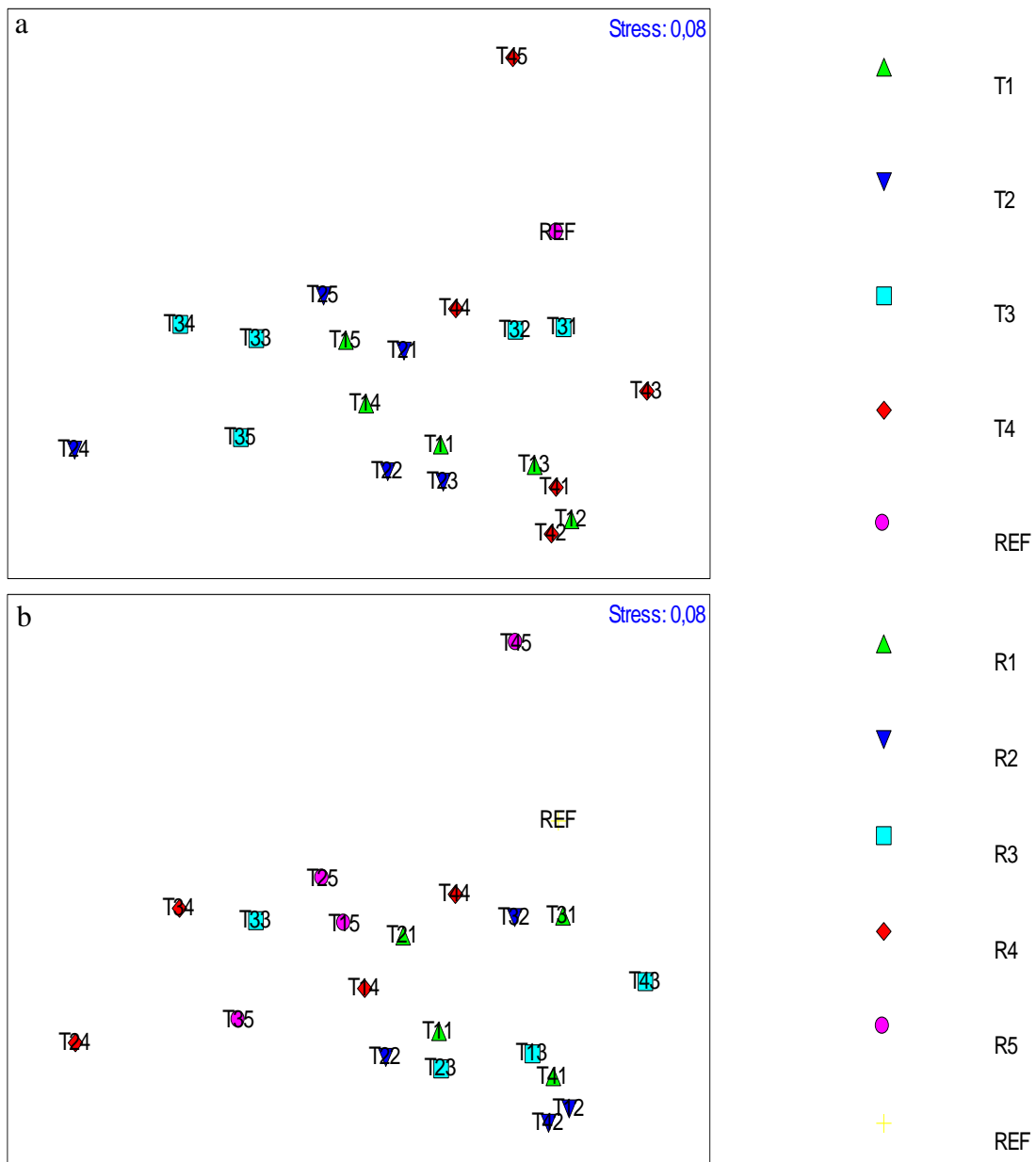
**Tableau 13.** Valeurs d'ANOSIM-R pour les différents échantillons du sol des transepts.

	<b>R-global</b>	<b>Niveau de signification %</b>
	<b>0,064</b>	<b>22,6</b>
<b>Groupes</b>	<b>R statistique</b>	<b>Niveau de signification %</b>
T.1, T.2	-0,076	70,6
T.1, T.3	0,176	14,3
T.1, T.4	0,048	26,2
T.1, REF	0,52	16,7
T.2, T.3	-0,088	63,5
T.2, T.4	0,152	11,9
T.2, REF	0,36	33,3
T.3, T.4	0,176	16,7
T.3, REF	0,16	50,0
T.4, REF	-0,2	66,7

**Tableau 14.** Valeurs d'ANOSIM-R pour les différents échantillons du sol des rondes.

	<b>R-global</b>	<b>Niveau de signification %</b>
	<b>0,157</b>	<b>5,5</b>
<b>Groupes</b>	<b>R statistique</b>	<b>Niveau de signification %</b>
R.1, R.2	-0,104	62,9
R.1, R.3	-0,167	77,1
R.1, R.4	0,271	11,4
R.1, R.5	0,323	5,7
R.1, REF	0,5	20,0
R.2, R.3	-0,135	88,6
R.2, R.4	0,469	5,7
R.2, R.5	0,427	5,7
R.2, REF	0,583	20,0
R.3, R.4	0,135	22,9
R.3, R.5	0,094	25,7
R.3, REF	-0,083	40,0
R.4, R.5	-0,115	74,3
R.4, REF	0,417	40,0
R.5, REF	0,167	60,0

Ces résultats d'ANOSIM confirment ceux des MDS (Figure 20) qui montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les échantillons des transepts ou des rondes du sol étudié. Selon le niveau de stress évalué par MDS (0,08) la représentation bidimensionnelle est valide.



**Figure 20.** Analyse Multidimensionnelle non métrique (MDS) réalisée sur les résultats des concentrations métalliques totales obtenues à partir de 4 transepts (T.1-T.4) avec 5 points chacun (1-5) et le sol de référence. a) par transept b) par ronde.

### 2.2.3. Mobilité et biodisponibilité des métaux

Les métaux biodisponibles sont extraits suivant la norme NEN 5704 (1996) et également selon la méthode décrite par Houba *et al.* (1990) (cf. Chap. II, § II.2.6). Les résultats de ces extractions montrent que les valeurs gammes des concentrations en éléments métalliques et en phosphore extractibles par 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  varient de 0,13 à 0,15  $\text{mg.kg}^{-1}$  pour le Cd, 0,04 à 3,70  $\text{mg.kg}^{-1}$  pour le Cu, 0,02 à 0,56  $\text{mg.kg}^{-1}$  pour le Fe, 0,37 à 1,05  $\text{mg.kg}^{-1}$  pour le Zn et 0,02 à 2,48  $\text{mg.kg}^{-1}$  pour le P (Tableau 15). Les concentrations extractibles (0,01 M  $\text{CaCl}_2$ ) du Cr et du Pb dans presque tous les échantillons étaient inférieures aux limites de détection. Des résultats similaires ont été obtenus pour Cr par Remon *et al.* (2005).

Le rapport entre la concentration de la fraction mobile et celle du métal total indique une mobilité relativement faible des métaux Cd (0,69-37,57 %, moyenne = 14,37 %), Cu (0,1-16,85 %, moyenne = 1,67 %), Zn (0,02-0,37 %, moyenne = 0,13 %) et une mobilité très faible pour le Fe (0,0001-0,0043 %, moyenne = 0,0007 %). Nos résultats sont en accord avec

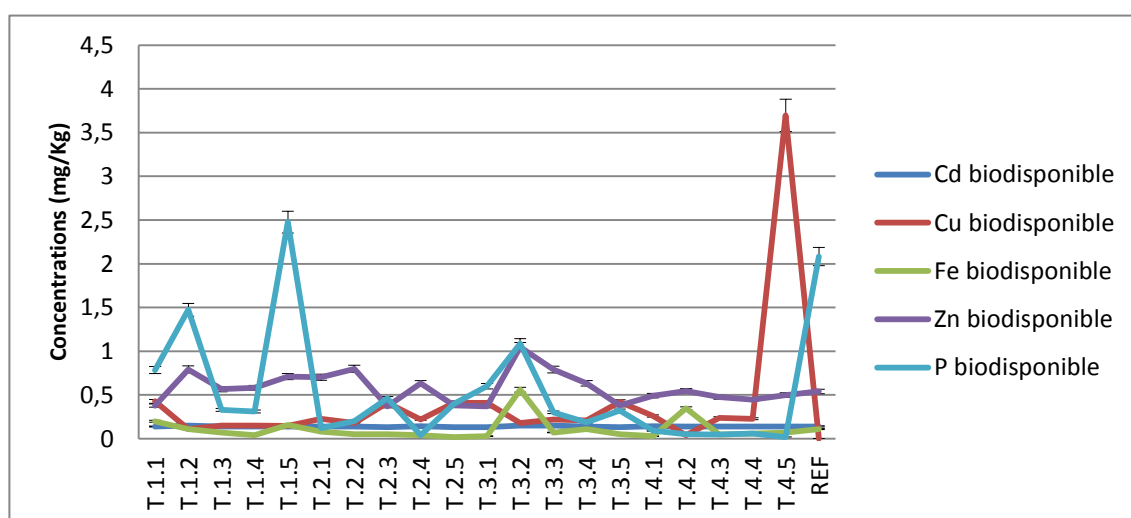
Lopareva-Pohu (2011) qui a montré que le Cd est l'élément le plus mobile et extractible avec 0,01 M CaCl<sub>2</sub>.

**Tableau 15.** Les concentrations des métaux et du phosphore biodisponibles dans les sols de site minier d'Ait Ammar.

Echantillons	Cd	Cr	Cu	Fe	Pb	Zn	P
T.1.1	0,139	Ild	0,427	0,199	Ild	0,378	0,785
T.1.2	<b>0,150</b>	Ild	0,110	0,110	Ild	0,792	1,474
T.1.3	0,139	Ild	0,149	0,070	Ild	0,566	0,328
T.1.4	0,140	Ild	0,151	0,040	Ild	0,582	0,311
T.1.5	0,138	Ild	0,148	0,158	Ild	0,710	<b>2,477</b>
T.2.1	0,139	Ild	0,228	0,079	0,089	0,702	0,119
T.2.2	0,140	Ild	0,180	0,050	Ild	0,799	0,200
T.2.3	<b>0,130</b>	Ild	0,410	0,050	Ild	0,370	0,460
T.2.4	0,141	Ild	0,221	0,040	Ild	0,632	0,040
T.2.5	0,130	Ild	0,409	<b>0,020</b>	Ild	0,379	0,399
T.3.1	0,130	Ild	0,410	0,030	Ild	<b>0,370</b>	0,600
T.3.2	<b>0,150</b>	0,020	0,180	<b>0,559</b>	Ild	<b>1,048</b>	1,088
T.3.3	<b>0,150</b>	Ild	0,220	0,070	Ild	0,791	0,301
T.3.4	0,139	Ild	0,208	0,109	Ild	0,634	0,188
T.3.5	0,131	Ild	0,422	0,050	Ild	0,382	0,321
T.4.1	0,141	Ild	0,261	0,030	Ild	0,492	0,090
T.4.2	0,139	Ild	<b>0,040</b>	0,348	Ild	0,547	0,050
T.4.3	0,138	Ild	0,237	0,049	Ild	0,474	0,049
T.4.4	0,139	Ild	0,228	0,060	Ild	0,447	0,060
T.4.5	0,140	Ild	<b>3,696</b>	0,070	Ild	0,499	<b>0,020</b>
Réf	0,140	Ild	Ild	0,110	Ild	0,540	2,081

Ild : inférieur de la limite de détection (Cr: 0,002 mg/L, Cu: 0,002 mg/L et Pb: 0,004 mg/L)

La figure 21 montre que le Fe est le moins disponible, sauf pour les échantillons T.3.2 et T.4.2 où il augmente un peu et cela peut être dû au pH (3,99, 4,39 respectivement). La disponibilité du Cu est très faible, à l'exception de l'échantillon T.4.5. De même, la disponibilité du P est faible, sauf pour les échantillons T.1.2, T.1.5, T.3.2 et Réf. Tandis que le Zn est le plus disponible.



**Figure 21.** Concentrations des métaux biodisponibles de la zone d'exploitation du fer.

2.2.4. Les caractéristiques minéralogiques biodisponibles, changeaient-elles en fonction de la distance ou de la direction par rapport au gisement?

Les tableaux 16 et 17 montrent respectivement les résultats des valeurs de R-global obtenues dans les différents tests d'ANOSIM des transepts et des rondes: les caractéristiques minéralogiques plus précisément les résultats des métaux biodisponibles des échantillons des transepts sont identiques (R-global = 0,011,  $p = 40,5\%$ ). De même, pour les rondes (R-global = 0,067,  $p = 15,6\%$ ). Même constitution, pour les différents points d'échantillonnage des sols, il n'y a pas de différence significative entre les transepts et les rondes ANOSIM 2 (test de Spearman;  $\rho = 0,017$ ,  $p = 41,2\%$ ;  $\rho = 0,073$ ,  $p = 26,9\%$ , respectivement), ils sont tous les deux identiques. D'où nous concluons que, selon les caractéristiques minéralogiques (concentrations métalliques biodisponibles), la direction ou la distance par rapport au gisement de fer n'ont pas d'influence significative sur les concentrations des métaux biodisponibles du sol.

**Tableau 16.** Valeurs d'ANOSIM-R pour les différents échantillons du sol des transepts.

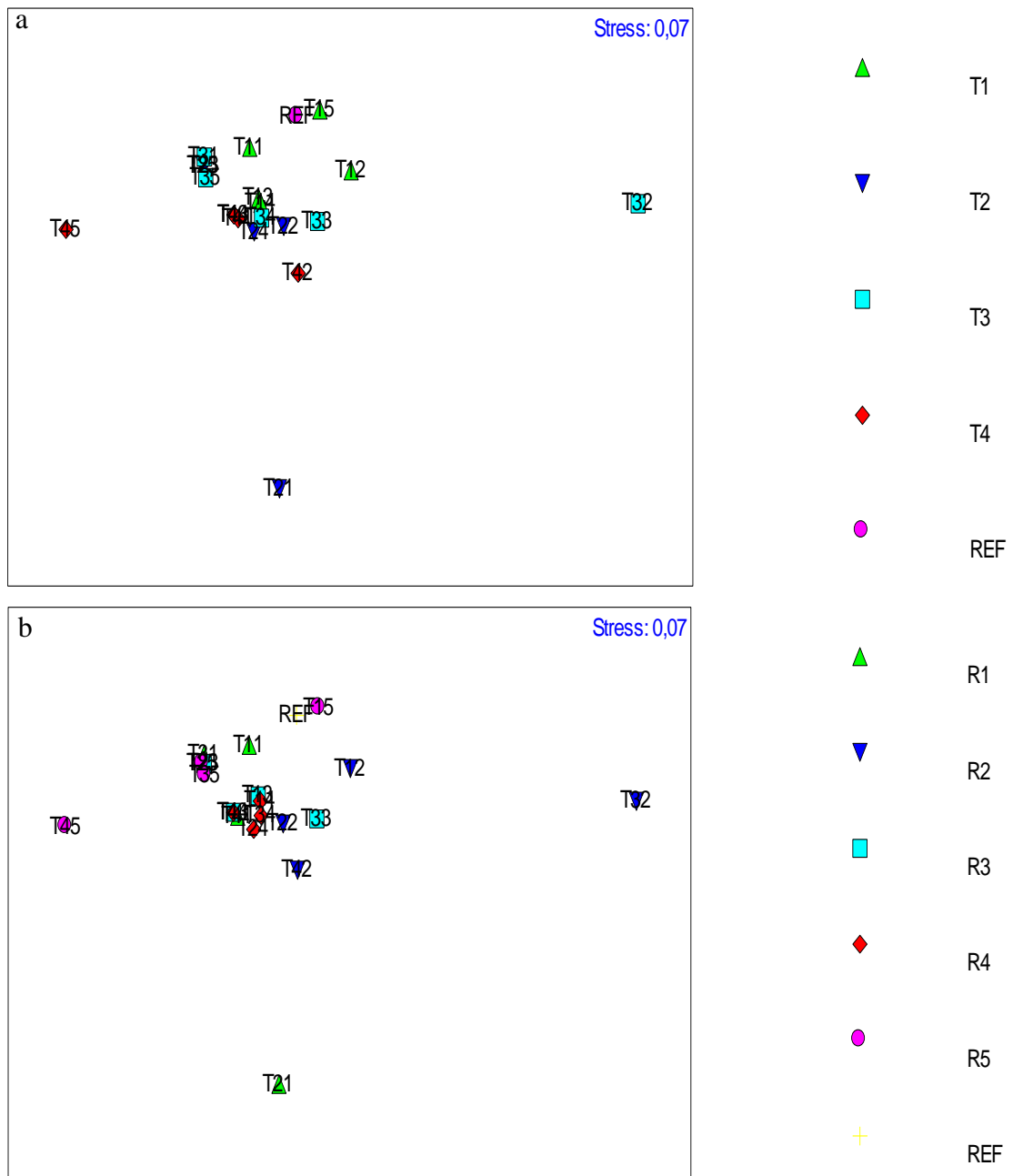
	R-global	Niveau de signification %
	0,011	40,5
Groupes	R statistique	Niveau de signification %
T.1, T.2	0,068	22,2
T.1, T.3	-0,036	58,7
T.1, T.4	0,148	5,6
T.1, REF	-0,4	100,0
T.2, T.3	-0,084	83,3
T.2, T.4	0,004	46,0
T.2, REF	0,32	33,3
T.3, T.4	-0,02	57,9
T.3, REF	-0,04	50,0
T.4, REF	0,36	33,3

**Tableau 17.** Valeurs d'ANOSIM-R pour les différents échantillons du sol des rondes.

	R-global	Niveau de signification %
	0,067	15,6
Groupes	R statistique	Niveau de signification %
R.1, R.2	0,125	8,6
R.1, R.3	-0,146	100,0
R.1, R.4	0,125	11,4
R.1, R.5	-0,135	100,0
R.1, REF	0,167	40,0
R.2, R.3	0,083	25,7
R.2, R.4	0,24	5,7
R.2, R.5	0,125	14,3
R.2, REF	-0,167	60,0
R.3, R.4	-0,031	60,0
R.3, R.5	-0,021	42,9
R.3, REF	0,583	40,0
R.4, R.5	0,333	2,9
R.4, REF	1,0	20,0
R.5, REF	-0,25	80,0



Les résultats de ces tests d'ANOSIM confirment ceux des MDS (Figures 22) qui montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les échantillons des transepts ou des rondes du sol étudiés. Selon le niveau de stress évalué par MDS (0,07) la représentation bidimensionnelle est valide.



**Figure 22.** Analyse Multidimensionnelle non métrique (MDS) réalisée sur les résultats des concentrations métalliques biodisponibles obtenues à partir de 4 transepts (T.1-T.4) avec 5 points chacun (1-5) et le sol de référence. a) par transept b) par ronde.

### 2.3. Analyses multivariées

#### 2.3.1. Les corrélations entre les propriétés chimiques

Afin d'analyser quantitativement et de confirmer les relations entre les paramètres du sol et leur teneurs en éléments métalliques, une analyse de corrélation de Pearson a été appliquée à nos données (Tableau 18). L'utilisation des graphes qui permettent de mettre en évidence les liens entre des paires de variables est souvent utile mais une quantification de ces rapports par

le calcul d'indices est nécessaire. Un paramètre couramment utilisé à cette fin est le coefficient de corrélation de Pearson (Lucho-Constantino et *al.*, 2005). Ce coefficient est calculé pour chaque paire de variables d'une base de données.

Une matrice carrée symétrique est alors construite avec une diagonale principale d'éléments = 1 et où tout élément  $r_{ij}$  (ligne  $i$ , colonne  $j$ ) est le coefficient de corrélation entre la variable  $i$  et la variable  $j$ . Les coefficients de corrélation de Pearson et leurs niveaux de signification ( $p < 0,05$  ou  $p < 0,001$  en gras) entre les différentes variables des sols sont présentés dans le tableau 18. Un coefficient de corrélation significatif et positif suggère un comportement géochimique similaire et/ou un matériau source commun des deux éléments corrélés (Burak et *al.*, 2010).

Afin d'étudier la relation entre les propriétés chimiques, l'analyse de corrélation a été réalisée (Tableau 18). La force des associations a été interprétée selon la classification de corrélation de Hopkins (2002): négligeable (0,0-0,1), faible (0,1-0,3), modérée (0,3-0,5), élevé (0,5-0,7), très élevé (0,7-0,9) et presque parfait (0,9-1,0).

Les résultats obtenus ont montré que la CE et l'ATK ne présentent aucune corrélation significative avec les métaux (Tableau 18). De même, le Zn total et le P biodisponible ne montrent pas de corrélation significative avec les propriétés physico-chimiques des sols présentées. Pour le reste, les résultats montrent une faible corrélation positive non significative entre Cd-pH<sub>KCl</sub>, Cd-MO et Cd-ATK ( $r = 0,112$ ,  $0,079$  et  $0,051$ , respectivement). Burgos et *al.* (2008) ont montré une faible corrélation positive Cd-MO ( $r = 0,148$ ) et une faible corrélation négative Cd-pH<sub>KCl</sub> ( $r = -0,090$ ).

**Tableau 18.** Les coefficients de corrélation entre les propriétés du sol et les concentrations des métaux et P (To : Total ; Bi : Biodisponible).

	pH <sub>Eau</sub>	pH <sub>KCl</sub>	ΔpH	CE	MO	ATK	C/N	Humidité	Argile Limon	Sable	grave	Cd <sub>To</sub>	Cr <sub>To</sub>	Cu <sub>To</sub>	Zn <sub>To</sub>	Pb <sub>To</sub>	Fe <sub>To</sub>	P <sub>To</sub>	Cd <sub>Bi</sub>	Cu <sub>Bi</sub>	Fe <sub>Bi</sub>	Zn <sub>Bi</sub>	P <sub>Bi</sub>	
pH <sub>Eau</sub>	1																							
pH <sub>KCl</sub>	<b>0,659**</b>	1																						
ΔpH	0,270	<b>-0,547*</b>	1																					
CE	-0,261	0,116	<b>-0,438*</b>	1																				
MO	-0,029	0,429	<b>-0,581**</b>	<b>0,694**</b>	1																			
ATK	0,189	<b>0,476*</b>	-0,399	0,400	<b>0,452*</b>	1																		
CN	0,084	0,231	-0,203	-0,062	0,101	<b>-0,544*</b>	1																	
Humidité	<b>0,479*</b>	0,386	0,039	-0,073	-0,063	<b>0,520*</b>	-0,384	1																
Argile Limon	<b>0,499*</b>	<b>0,617**</b>	-0,235	0,003	0,253	<b>0,500*</b>	-0,155	<b>0,811**</b>	1															
Sable	-0,307	<b>-0,438*</b>	0,219	-0,057	-0,178	<b>-0,464*</b>	0,166	<b>-0,802**</b>	<b>-0,908**</b>	1														
grave	<b>-0,607**</b>	<b>-0,678**</b>	0,192	0,067	-0,279	-0,413	0,101	<b>-0,607**</b>	<b>-0,850**</b>	<b>0,550**</b>	1													
Cd <sub>To</sub>	-0,045	0,112	-0,194	0,088	0,079	0,051	-0,074	<b>0,493*</b>	<b>0,499*</b>	<b>-0,451*</b>	-0,426	1												
Cr <sub>To</sub>	-0,338	<b>-0,482*</b>	0,240	0,033	-0,206	0,125	<b>-0,564**</b>	0,282	0,026	-0,142	0,126	0,183	1											
Cu <sub>To</sub>	0,086	-0,430	<b>0,646**</b>	-0,236	-0,265	-0,146	-0,200	0,154	-0,110	0,068	0,133	-0,126	<b>0,538*</b>	1										
Zn <sub>To</sub>	-0,111	-0,381	0,364	-0,334	-0,426	0,024	-0,398	0,315	-0,072	-0,064	0,223	0,114	<b>0,659**</b>	<b>0,580**</b>	1									
Pb <sub>To</sub>	0,149	-0,242	<b>0,476*</b>	-0,173	-0,338	-0,321	0,100	-0,198	-0,344	0,294	0,316	-0,202	0,015	0,090	0,193	1								
Fe <sub>To</sub>	-0,228	<b>-0,642**</b>	<b>0,568**</b>	-0,297	<b>-0,531*</b>	-0,293	-0,336	-0,097	<b>-0,448*</b>	0,368	0,429	0,114	<b>0,595**</b>	<b>0,527*</b>	<b>0,735**</b>	0,332	1							
P <sub>To</sub>	0,212	-0,176	<b>0,461*</b>	-0,277	-0,362	0,138	-0,375	0,389	0,001	-0,048	0,059	0,065	<b>0,523*</b>	<b>0,576**</b>	<b>0,807**</b>	0,326	<b>0,602**</b>	1						
Cd <sub>Bi</sub>	<b>-0,446*</b>	-0,350	-0,049	0,402	0,184	0,294	-0,224	-0,122	-0,275	0,126	0,388	-0,004	0,171	0,030	0,089	0,014	0,176	0,101	1					
Cu <sub>Bi</sub>	-0,060	0,140	-0,220	0,117	0,103	-0,023	-0,016	<b>0,574**</b>	<b>0,575**</b>	<b>-0,505*</b>	<b>-0,457*</b>	<b>0,988**</b>	0,139	-0,160	-0,009	-0,187	0,085	-0,089	-0,062	1				
Fe <sub>Bi</sub>	<b>-0,714**</b>	<b>-0,508*</b>	-0,144	-0,025	-0,061	0,031	-0,282	-0,209	-0,359	0,220	<b>0,437*</b>	-0,045	0,341	-0,084	0,360	0,129	0,229	0,218	<b>0,445*</b>	-0,121	1			
Zn <sub>Bi</sub>	<b>-0,527*</b>	<b>-0,438*</b>	-0,026	0,241	0,181	0,085	-0,084	-0,267	-0,325	0,201	0,394	-0,120	-0,006	-0,117	-0,016	-0,055	-0,011	-0,122	<b>0,807**</b>	-0,197	<b>0,535*</b>	1		
P <sub>Bi</sub>	0,159	0,245	-0,137	-0,069	0,338	0,380	-0,141	0,255	0,301	-0,247	-0,288	-0,041	-0,045	0,061	0,357	-0,091	-0,123	0,294	0,174	-0,191	0,277	0,269	1	

\* La corrélation est significative au niveau de 0,05.

\*\* La corrélation est significative au niveau de 0,01.

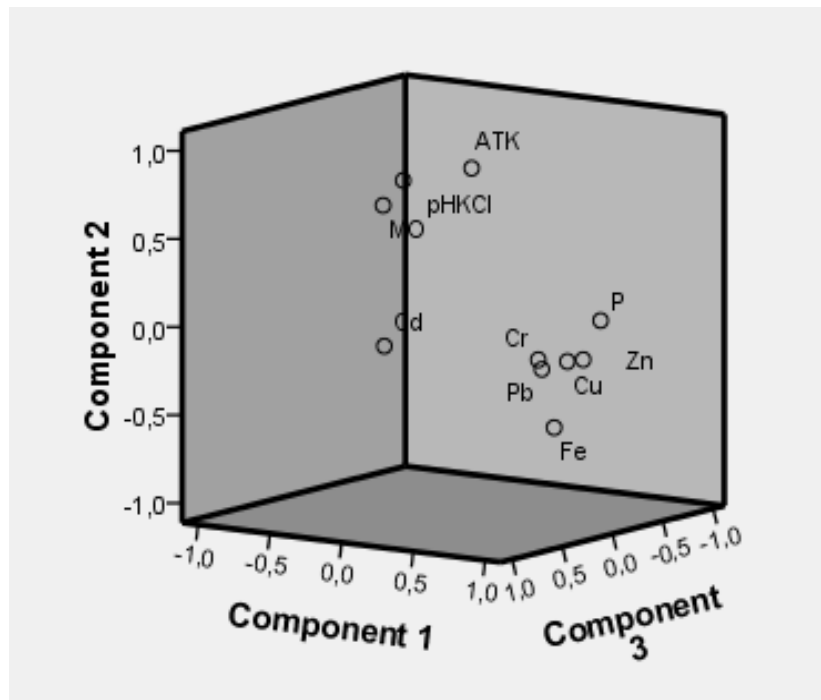
Une forte corrélation ( $p < 0,01$ ) est observée entre les concentrations des métaux totaux sauf pour le Cd et le Pb. Le Zn est le métal le plus fortement corrélé avec le P et le Fe (0,807 et 0,735 respectivement) et relativement moins corrélé avec le Cr (0,659) et Cu (0,58). De même une corrélation positive a été observée entre le Fe et le P (0,602). Ceci indique que ces

éléments sont issus d'une même source dans le sol. Le Fe a été corrélé négativement avec le  $\text{pH}_{\text{KCl}}$ , la MO et l'argile + limon et positivement corrélé ( $p < 0,01$ ) avec  $\Delta\text{pH}$ . De même MO et  $\text{pH}_{\text{KCl}}$  sont négativement corrélées avec les concentrations totales du Cr, Cu, Zn, Pb, Fe et P et positivement corrélés avec le Cd. Alvarenga et al. (2009) ont conclu que les amendements organiques étaient également efficaces pour l'immobilisation des métaux *in situ*, comme le montrent les coefficients de corrélation de Pearson négatifs obtenus. Les résultats montrent, en générale, que plus le pH diminue, plus les concentrations des métaux biodisponibles augmentent comme les montrent les coefficients de corrélation négatifs obtenus. Ces résultats sont en accord avec celles rapportées par Cao et al. (2004).

### 2.3.2. Analyse en composantes principales des paramètres mesurés pour la description du sol étudié

Afin de confirmer ou d'infirmer l'origine des métaux présents dans les sols comme supposée ci-dessus, nous avons effectué une analyse en composantes principales (ACP). Dans notre étude, les composantes principales ont été tournées en utilisant la rotation Varimax normalisée (Kaiser, 1960) qui est une rotation orthogonale permettant d'obtenir une structure plus facile à analyser par ce que le nombre des variables indépendantes corrélées avec une composante principale est maximisé. Elles peuvent par conséquent indiquer la source lithogène, anthropique ou mixte des éléments métalliques (Mico et al., 2006; Eze et al., 2010). Seules les trois premières composantes seront prises en compte. La discussion qui suit est centrée sur les résultats après la rotation de Kaiser.

Ainsi, une ACP a été appliquée aux données issues de la caractérisation physico-chimique et minéralogique du sol de la mine (notamment les concentrations totales de métaux (Cd, Cr, Cu, Zn, Pb et Fe), P et les caractéristiques chimiques ( $\text{pH}_{\text{KCl}}$ , MO et ATK)) pour déterminer leurs interrelations et leurs effets sur les sols de chaque prélèvement. La carte factorielle met en évidence trois groupes d'éléments: le premier compte les propriétés physico-chimiques (ATK, MO et  $\text{pH}_{\text{KCl}}$ ), le deuxième contient les métaux et le phosphore à l'exception du Cd qui constitue le troisième groupe (Figure 23).



**Figure 23.** Carte factorielle produite par l'ACP des données : MO,  $\text{pH}_{\text{KCl}}$ , ATK, Cr, Cu, Cd, Pb, Zn, Fe et P du sol de la mine de fer.

La variance totale présente les facteurs importants et le pourcentage de la variance expliquée par chacune des variables avant de subir une rotation est de 71,26 % de la variance totale (Tableau 19). CP 1, CP 2 et CP 3 expliquent respectivement 42,17, 18,15 % et 10,94 % de la variance totale: ces valeurs suggèrent une corrélation entre certaines caractéristiques physico-chimiques et minéralogiques du sol (Tableau 20). La procédure de classification ascendante hiérarchique, qui illustre les trois groupes, a été utilisée pour évaluer les similitudes entre les échantillons. Les trois composantes principales ont été extraites selon les critères Kaiser dans laquelle seuls les éléments dont les valeurs propres >1 ont été inclus dans l'analyse.

**Tableau 19.** Variance totale et coefficient de saturation de l'analyse en composantes principales.

Composantes	Valeurs initiales propres			Les sommes carrés des extractions			Rotation
	Total	% de Variance	Cumule %	Total	% de Variance	Cumule %	Total
<b>1</b>	4,217	42,173	42,173	4,217	42,173	42,173	3,601
<b>2</b>	1,815	18,151	60,324	1,815	18,151	60,324	2,251
<b>3</b>	1,094	10,943	71,267	1,094	10,943	71,267	1,275
<b>4</b>	0,957	9,575	80,842				
<b>5</b>	0,606	6,061	86,902				
<b>6</b>	0,520	5,196	92,099				
<b>7</b>	0,294	2,938	95,037				
<b>8</b>	0,199	1,994	97,031				
<b>9</b>	0,173	1,731	98,762				
<b>10</b>	0,124	1,238	100,000				

**Tableau 20.** Matrice des composantes de l'analyse en composantes principales.

	Composantes		
	1	2	3
<b>Zn</b>	<b>0,909</b>	-0,141	0,005
<b>P</b>	<b>0,887</b>	0,048	-0,199
<b>Cr</b>	<b>0,796</b>	-0,112	0,289
<b>Fe</b>	<b>0,727</b>	-0,541	0,035
<b>Cu</b>	<b>0,713</b>	-0,189	-0,119
<b>ATK</b>	0,198	<b>0,888</b>	0,098
<b>pH<sub>KCl</sub></b>	-0,361	<b>0,744</b>	-0,016
<b>MO</b>	-0,329	<b>0,643</b>	0,227
<b>Cd</b>	0,095	-0,028	<b>0,824</b>
<b>Pb</b>	0,175	-0,364	<b>-0,630</b>

Les résultats de l'ACP montrent que la première composante (CP 1) a le plus haut coefficient de saturation (3,601), suivi par le CP 2 et CP 3 avec une saturation de 2,251 et 1,275 respectivement (Tableau 19). Le tableau 20 montre la matrice de composantes obtenues à partir de l'extraction de l'ACP et les variables incluent dans chaque composante.

La première composante (CP 1), compte les associations les plus importantes et fortement corrélées: Zn (0,909), P (0,887), Cr (0,796), Fe (0,727) et Cu (0,713) comme il est illustré par le coefficient de saturation élevé. Les variables qui sont corrélées les unes aux autres sont combinées en facteurs qui sont censés être représentatifs des corrélations sous-jacentes (Zhang, 2006). Le Fe est l'un des éléments les plus communs présents dans le sol (Kabata-Pendias et Pendias, 2001; Zhang et al., 2008). Sainger et al. (2011) ont constaté que le Fe, le Zn, le Cr et le Cu étaient fortement corrélées avec un coefficient de corrélation de  $r =$

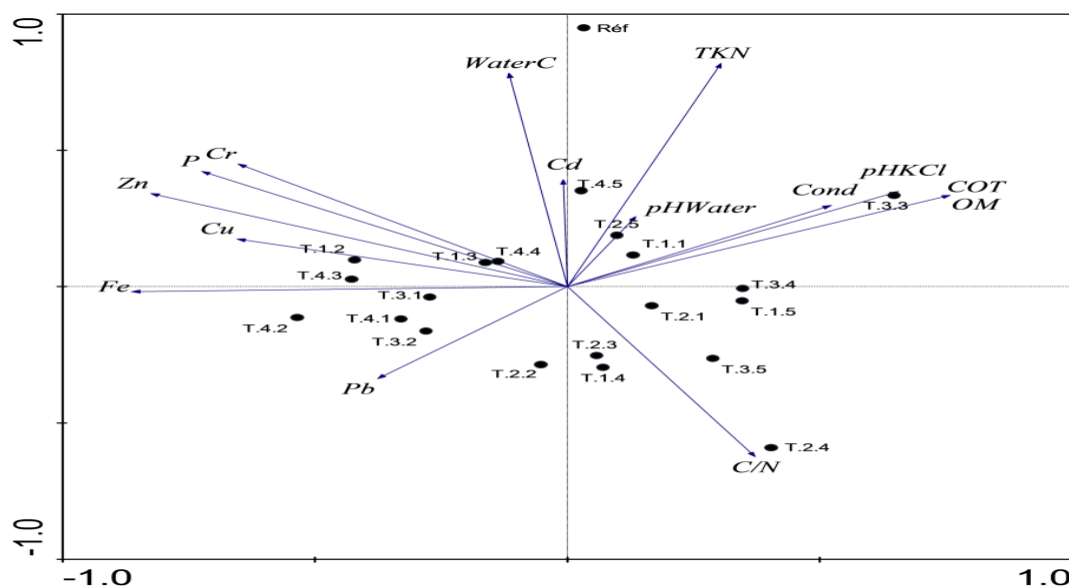
0,96. Cao et *al.* 2004 ont rapporté que le P a une forte affinité pour le Cu et le Zn. La désorption du Cu et Zn est sensible à la variation du pH, elle augmente avec la diminution du pH, tandis que la désorption du Pb a été réduite avec un acide fort. Ce changement du pH peut expliquer l'absence du Pb dans ce groupe. Les résultats indiquent également que le Zn, le P, le Cr, le Cu et le Fe proviennent de la même source géogénique d'où les fortes corrélations et interrelations entre ces éléments.

La deuxième composante (CP 2) compte surtout ATK (0,888),  $\text{pH}_{\text{KCl}}$  (0,744) et la MO (0,643) qui possède un coefficient de saturation de 2,251. Melero et *al.* (2006) et Akkajit et Tongcumpou (2010) ont rapporté que la MO est fortement corrélée avec l'ATK et le pH du sol. De même, Alvarenga et *al.* (2009) ont conclu que le pH est positivement corrélé avec la MO et l'azote total du sol ( $r = 0,87$  et  $r = 0,73$  respectivement). Des corrélations positives et plus significatives entre le pH du sol et le carbone organique et l'azote total ont été observées par Vásquez-Murrieta et *al.* (2006) et Li et *al.* (2009). Basta et Sloan (1999) ont rapporté que l'application des résidus organiques peut favoriser une augmentation du pH du sol.

Alternativement, la troisième composante (CP 3) comprend seulement le Cd (0,824) et le Pb (-0,630), ce qui peut être interprété par l'effet antagonique entre ces deux métaux lourds. Alloway (1990) a rapporté que le Pb est considéré comme ayant un effet antagonique sur l'absorption du Cd du fait qu'il est préférentiellement absorbé, laissant ainsi plus de Cd dans la solution du sol. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus dans notre étude. Plusieurs études ont montré des relations entre le Cd et le Pb (Luo et *al.*, 1995; Kabata-Pendias et Pendias, 2001; Liu et *al.*, 2003).

Sur la base de l'analyse en composante principale, trois groupes de variables peuvent être identifiés. De la même manière, l'étude des diverses variables physico-chimiques et minéralogiques a montré que (Figure 24):

- Il n'y avait aucune relation claire entre les échantillons du sol et les métaux sauf pour le Cd et l'échantillon T4.5.
- L'échantillon de référence fut mis à part du site minier, mais surtout en raison de la teneur plus élevée en eau et une concentration élevée de l'azote total.
- L'échantillon T.2.4 est remarqué par le ratio C/N très élevé.
- L'échantillon T.3.3 est caractérisé par trois paramètres qui sont CE,  $\text{pH}_{\text{KCl}}$  et MO.



**Figure 24.** Carte factorielle et corrélations produites par l'ACP des paramètres physico-chimiques des métaux et du phosphore mesurés à chaque point d'échantillonnage (CANOCO 4.5).

### 3. Discussion

#### 3.1. Caractérisation physico-chimique

Les valeurs de pH pour les échantillons des sols contaminés étaient 85 % neutres ( $6,5 < \text{pH}_{\text{Eau}} < 7,5$ ) et 10 % légèrement acides ( $5 < \text{pH}_{\text{Eau}} < 6,5$ ), à l'exception de l'échantillon T.3.2 qui était fortement acide (4,64). Par contre, l'échantillon du sol non contaminé (Réf.) était légèrement alcalin. Selon Slattery et *al.* (1999), nos résultats étaient entre la gamme du pH des régions humide et arides. De même, les valeurs du  $\text{pH}_{\text{KCl}}$  (acidité potentielle) du sol de l'exploitation minière sont, en général, au-dessous de ceux de  $\text{pH}_{\text{Eau}}$  dans les différents échantillons du sol. Ce résultat a été observé par plusieurs auteurs (Kidd et *al.*, 2005 et 2007; Díez Lázaro et *al.*, 2006; Pereira et *al.*, 2008; Mbonigaba Muhinda et *al.*, 2009). La mesure du pH dans l'eau correspond à une mesure de l'acidité réelle, c'est-à-dire qu'est directement liée à la concentration en ions  $\text{H}^+$  libres dans la solution du sol. La mesure dans une solution molaire de chlorure de potassium correspond à l'estimation de l'acidité potentielle de plus, elle est fortement corrélée à la capacité d'échange des cations du sol. En effet, les ions  $\text{K}^+$  déplacent les protons liés au complexe absorbant pour les libérer dans la solution. La mesure donne ainsi des valeurs de pH plus faibles (Bruckert et Rouiller, 1994).

Le calcul de la différence de pH dans l'eau et dans le chlorure de potassium ( $\Delta\text{pH} = \text{pH}_{\text{KCl}} - \text{pH}_{\text{Eau}}$ ) est un paramètre utile pour apprécier la réactivité du complexe adsorbant, en particulier dans les sols tropicaux à charges variables (Djondo, 1995). Tous les échantillons du sol analysés de notre étude ont un  $\Delta\text{pH}$  supérieure à 0,5. Ce qui montre une bonne capacité de rétention des cations dans le complexe argilo-humique. Une diminution de  $\Delta\text{pH}$  dans des sols aurait pour conséquence une possible augmentation de la lixiviation des cations et, portant, un appauvrissement inéluctable du sol (Djondo, 1995) et n'était pas le cas de nos échantillons que ce soit les sols contaminés ou celui de référence.

La conductivité électrique (CE) des sols varie entre 32,4  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (T.4.3) et 1656,67  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (T.3.3). Tous les échantillons analysés entrent dans la classe 1 (salinité basse) à l'exception de deux échantillons T.4.5 qui appartient à la classe 2 (salinité modéré) et T.3.3 qui fait partie à la classe 3 (salinité haute). La conductivité électrique est donc inférieure à la limite de la salinité (750  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), à l'exception de T.3.3, au-delà de laquelle il pourrait y avoir un risque de salinité pour ces sols (Atallah et *al.*, 2000).

Pour la matière organique (MO), on note que tous les échantillons des sols étudiés ont une teneur inférieure à 3 % sauf deux échantillons (T.1.5 et T.3.3) qui ont une teneur en matières organiques > 3 %. Ce résultat indique que ces deux sols sont relativement fertiles. Les mesures de la MO dans deux sites d'expérimentation à long terme appartenant à l'Institut National de Recherche Agronomique de Settat, Maroc, ont montré une teneur moyenne de carbone organique de 0,7 % (MO = 1,20 %) (Mrabet et *al.*, 2004). Tandis que ATK était, dans la plupart des sols très faibles (de 0,007 à 0,1884 %) ce qui entraîne des ratios C/N élevés (2,36 à 132,94). En ce qui concerne l'humidité du sol, tous les échantillons analysés possèdent un très faible pourcentage en teneur en eau qui ne dépasse pas 8,5 %. Ce paramètre est très influencé par les conditions climatiques, car le jour d'échantillonnage le 19 Juillet 2010, était dans une période très sèche avec des hautes températures dans la région étudiée.

La distribution des fractions granulométriques du site est large. Les pourcentages varient entre 3,44 % et 37,13 % pour les graves, 27,43 % et 60,09 % pour les sables et 7,76 % et 69,08 % pour les argiles et les limons. Ces valeurs sont inférieures à celles de la référence surtout pour les argiles + limons et le contraire pour les graves. Cependant, les résultats de granulométrie montrent que l'échantillon du sol est principalement composé de sables et limons + argiles (en moyenne 47,07 % et 34,91 % respectivement). Selon le diagramme de texture (NF EN ISO 14688-2 d'avril 2005), la texture du sol est classée sable argileux/sable limoneux. La structure, la texture et la composition d'un sol lui confèrent des caractéristiques

particulières qui influencent les phénomènes d'infiltration et de rétention des éléments traces métalliques.

### 3.2. Caractérisation minéralogique

Les métaux lourds sont des polluants environnementaux dangereux. Leur toxicité est un problème d'une importance croissante pour des raisons écologiques, évolutives, nutritionnelles et environnementales (Nagajyoti et al., 2010).

La présence des éléments métalliques dans les sols est un problème majeur. Néanmoins, les risques ne résultent pas seulement des concentrations totales mesurées dans les sols pollués mais principalement de leur fraction biodisponible (Adriano, 1986; McLaughlin et al., 2000). La mobilité de ces éléments métalliques peut être définie par leur aptitude à être transférés vers des compartiments du sol où ils sont retenus avec une moindre énergie. Un élément chimique métallique peut ainsi passer successivement dans des compartiments d'énergies de rétention décroissante et le compartiment ultime étant la phase liquide représentée par la solution du sol. Les racines des plantes peuvent extraire principalement leur nutriment de cette solution (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

La mesure de la teneur totale en élément chimique constitue une bonne approche pour évaluer le degré et l'ampleur (en concentration et en superficie) de la contamination d'un sol. Pour apporter d'avantage d'informations, la biodisponibilité et la répartition des métaux dans le sol ont été étudiées par des extractions simples à l'aide de 0,01 M CaCl<sub>2</sub>. Méthode proposée par Kabata-Pendias (2004) pour extraire les oligo-éléments biodisponibles.

Adriano (2001) a rapporté que la détermination des concentrations en oligo-éléments biodisponibles pourrait être plus utile pour la protection de l'environnement et de l'évaluation des risques écologiques. L'analyse globale peut donner des informations concernant l'enrichissement possible du sol en oligo-éléments, mais ce n'est pas suffisant pour estimer leur mobilité et leur disponibilité pour les processus écologiques. Dans notre cas on note que, les concentrations du Cu, du Fe, du Zn et du P étaient, en général, différentes entre les échantillons étudiés. Dans le cas de Cd biodisponible, on n'a observé aucune différence significative entre les échantillons. Pérez-de-Mora et al. (2006) ont rapporté que le Pb biodisponible dans tous les échantillons, était inférieur à la limite de détection. Les roches du phosphate sont capables de réduire la solubilité et également la phytodisponibilité du Pb et d'autres métaux (Chlopecka et Adriano, 1996; Laperche et al., 1997; Cao et al., 2003; Zhu et al., 2004; Chen et al., 2006). Takeuchi et Arai (1990) ont suggéré que l'immobilisation du Pb résulte de la formation d'un phosphate de plomb plus stable, tel que Ca<sub>(10-x)</sub>Pb<sub>x</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub> par l'intermédiaire d'un mécanisme d'échange d'ions où le Pb aqueuse remplace le Ca sur l'hydroxyapatite (*hydroxyapatite lattice*). Ma et al. (1995) ont proposé la dissolution de la roche du phosphate et la précipitation subséquente d'un minéral (*pyromorphite-Like mineral*) (Pb<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>X<sub>2</sub>, X=OH<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, etc.) comme mécanisme primaire. Cao et al. (2004) ont montré que la fluoropyromorphite (Pb<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>F<sub>2</sub>) est principalement responsable de l'immobilisation du Pb par le phosphate et la même chose pour d'autres métaux tels que le Cu et le Zn mais avec une affinité moindre.

Le mécanisme de la précipitation avec les phosphates est possible avec tout matériau contenant des phosphates, qu'ils soient purs ou sous forme de roche phosphatée (Figure 25). Dans le cas d'une roche phosphatée, il y a deux étapes: d'abord la dissolution du matériau pour libérer les phosphates selon l'équation suivante: Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>F<sub>2</sub> + 12H<sup>+</sup> → 10Ca<sup>2+</sup> + 6H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> + 2F<sup>-</sup>. Ensuite, la précipitation avec le Cu<sup>2+</sup>, par exemple, selon l'équation suivante: 10Cu<sup>2+</sup> + 6H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> + 2F<sup>-</sup> → Cu<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>F<sub>2</sub> + 12H<sup>+</sup> (Saxena et D'Souza 2006).

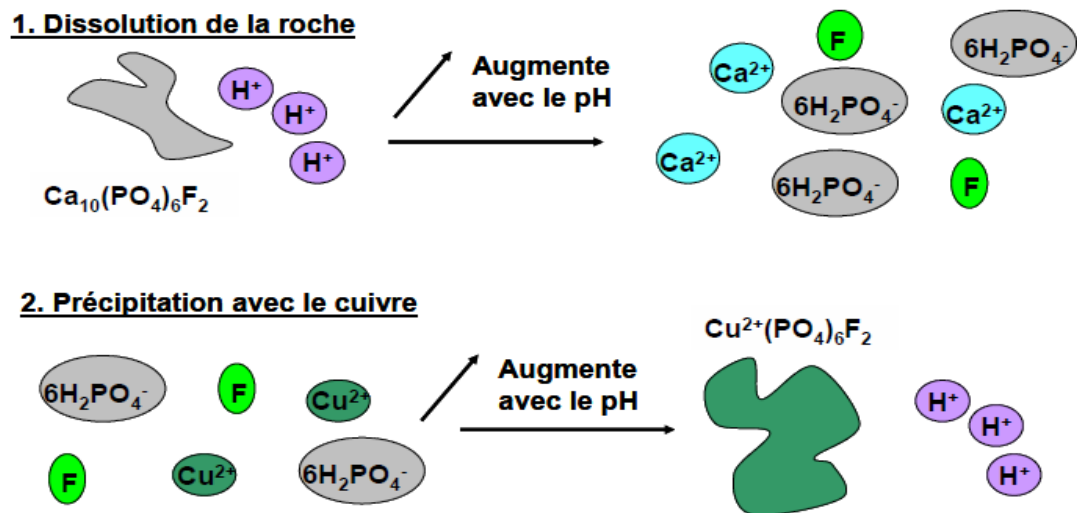


Figure 25. Précipitation du Cuivre avec les phosphates.

Al-Oud et Helal (2003) ont rapporté que le Fe a un rendement élevé à immobiliser le Pb. Martinez et McBride (1998) ont observé que les oxydes de Fe ont un taux élevé d'adsorption du Cd, Zn, Cu et Pb respectivement de 28, 58, 94 et 100 %. Le Fe a diminué considérablement le Cr (VI) en Cr (III) (Cheng et *al.*, 2009) et le précipité sous forme des hydroxydes du Cr trivalent (Mukhopadhyay et *al.*, 2007; Weng et *al.*, 2007). Ce produit peut être utilisé comme un matériau adsorbant efficace pour le Cd (II) (Namasivayam et Ranganathan, 1995). Economou-Eliopoulos et *al.* (2011) ont rapporté que le Cr dans le sol est le plus souvent organisé en chromite, Fe-chromite, Cr-palier goethite.

Comme il a été vu précédemment, le Fe, bien qu'essentiel, est paradoxalement très peu biodisponible en raison de sa très faible solubilité à pH physiologique. Sous la forme ferrique, le Fe est oxydé et précipité en hydroxydes de Fe hautement insoluble (Braun et Killmann, 1999). Ainsi, à pH 7 et dans un environnement aérobie, les concentrations en fer libre varieront de  $10^{-9}$  à  $10^{-18}$  M (Griffiths et *al.*, 1999). En revanche, l'acidification des sols conduirait à un potentiel danger écotoxicologique considérablement augmenté suite à l'augmentation de la solubilisation des métaux (Manz et *al.*, 1999; Kashem et Singh, 2001). Akkajit et Tongcumpou (2010) ont montré que la mobilité du Fe est la plus basse par rapport au Cd, Mn, Zn, Pb et Cu. Ils ont également observé que, généralement, si le P disponible augmente le Cu disponible baisse et vice versa. La roche du phosphate a une forte affinité pour le Cu (114 mmol / kg) (Cao et *al.*, 2004). En plus, Venditti et *al.*, (2000) ont révélé que les métaux lourds sont peu solubles dans l'eau lorsque le pH a été maintenu entre 6,6 et 7,6. Néanmoins, Remon et *al.* (2005) ont montré que: les métaux lourds ne sont ni lessivables ni phytodisponibles. Ceci ne veut pas dire que les polluants sont immobilisés et ne posent aucun risque pour l'environnement et la santé humaine. En fait, la forte possibilité d'étalement horizontal des particules riches en métaux est due à l'érosion mécanique et le reste des activités humaines. Dans le cas où l'assainissement est techniquement et économiquement non réalisable, le contrôle de l'érosion pourrait être assuré efficacement par la phytostabilisation, à savoir l'établissement d'une couverture végétale globale et autonome (Wong, 2003). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus au cours de notre travail de recherche.

#### 4. Conclusion

Dans cette partie, une caractérisation détaillée des sols a été réalisée afin de bien comprendre le comportement géochimique et la spéciation chimique des éléments métalliques (Cr, Cd, Pb, Cu, Zn et Fe) et un élément non métallique (P). Dans notre cas, nous avons donc,



un sol contaminé en Fe, en P et en Cr. Les teneurs des autres éléments métalliques (Zn, Pb, Cu et Pb) montrent une contamination polymétallique, ce qui peut avoir des effets néfastes sur l'environnement.

Nous avons étudié quatre transepts et cinq rondes de sols situés dans le site d'étude et un échantillon du sol non contaminé situé loin de la zone d'étude, comme référence. Les principales différences qui caractérisent l'échantillon de référence sont la teneur en eau et l'ATK. Pour les autres paramètres, nous n'avons pas déterminé des différences significatives. Pour les échantillons contaminés, ni la direction ni la distance par rapport à la mine de fer d'Ait Ammar ne possède une influence significative sur les caractéristiques physico-chimiques ou minéralogiques.

Les concentrations des métaux du sol étaient très hétérogènes entre les échantillons du site, probablement, en raison de la nature de l'exploitation minière (extraction minière, le stockage, la dispersion mécanique, la présence des terrains surchargés, le degré d'érosion des minéraux, etc.). Les métaux et le phosphore sont fortement liés au sol et sont donc très peu mobiles. Les résultats ont montré des conséquences qui renforcent mutuellement, que le Fe dans le sol a été corrélé avec le Zn, le P, le Cr et le Cu, ce qui implique que certaines interactions et/ou des relations d'affinité existaient entre ces éléments. Cependant, le Zn a une part mobilisable plus importante que les autres métaux. Par conséquent, ce métal présente un risque immédiat plus grand que les autres métaux lors d'une libération suite à des modifications des conditions physico-chimiques environnantes, car cette part mobilisable peut alors migrer et infecter la santé humaine et également les animaux herbivores.

La connaissance du niveau de contamination des métaux lourds tels que le Cd, le Cr, le Zn, le Pb et le Cu et les effets des propriétés du sol est essentielle pour fournir une base précise pour la protection supplémentaire, l'assainissement et la réduction des impacts négatifs de ces contaminations métalliques.

Ces sols se sont donc formés en l'espace d'environ une cinquantaine d'années, ce qui montre qu'il s'agit d'un temps court. Malgré un taux de contamination élevé, la végétation a pu se développer progressivement.

La contamination est susceptible d'être à l'origine de nombreuses perturbations au sein de l'écosystème et notamment au niveau de l'activité microbienne. De ce fait, notre étude a porté également sur la caractérisation des populations bactériennes et végétales.

## II. Tolérance et accumulation des métaux par la végétation spontanée des sols miniers: vers de nouvelles méthodes de bio-dépollution

### 1. Contexte et objectifs

Pour toutes les techniques de phytoremédiation, l'utilisation d'une ou plusieurs espèces végétales est nécessaire et leur choix doit être judicieux. Il faudra privilégier des espèces natives du site à remédier plutôt que des plantes hors de leur aire d'origine qui pourraient devenir des espèces invasives (Gonzalez et Gonzalez-Chavez, 2006). Les espèces choisies devraient être capables de supporter la contamination mais aussi les autres stress souvent présents comme la sécheresse ou le manque de nutriments. Elles doivent aussi avoir une croissance rapide (Pilon-Smits, 2005). Enfin, en fonction de la technique choisie, des caractéristiques supplémentaires sont nécessaires. Par exemple pour la phytodégradation, les plantes doivent posséder un important système racinaire et un fort taux d'enzymes dégradantes (Pilon-Smits, 2005). Pour la phytoextraction, elles doivent avoir un fort taux de translocation vers les parties aériennes et une forte accumulation du contaminant dans celles-ci. On appelle ces plantes des accumulatrices. Par contre, pour la phytostabilisation, la translocation doit être la plus faible possible et l'accumulation doit avoir lieu dans les racines: ces plantes sont des «excluantes» (Mench et *al.*, 2005).

Depuis quelques années, la phytoremédiation est un sujet d'intérêt public et scientifique et un sujet de nombreuses recherches (Abouddrar et *al.*, 2007; Chehregani et *al.*, 2009; Nunes da Silva et *al.*, 2014). Cette technique est une technologie rentable pour le nettoyage de l'environnement, si les plantes indigènes sont appliquées dans les zones polluées. Nous avons besoin de nouvelles plantes et variables accumulateurs pour la phytoremédiation dans des climats différents. Des nouvelles études sont encore nécessaires pour trouver de nouvelles plantes accumulateurs pour être utilisés dans des conditions différentes. Dans cette partie de notre travail, nous avons étudié les concentrations, les facteurs de translocation et de bioconcentration des métaux toxiques (Cd, Cr, Cu, Zn et Pb), du Fe et du P de 12 espèces végétales qui sont très abondantes dans le site d'Ait Ammar. Cette étude a pour objectifs:

1. obtenir une meilleure connaissance de la capacité d'accumulation du Cd, Cr, Cu, Zn, Pb, Fe et P par ces 12 espèces végétales,
2. évaluer l'utilisation potentielle de ces espèces végétales pour la phytoremédiation (phytoextraction, phytostabilization).

**Les résultats, acquis et présentés ci-dessous, sont valorisés dans un article accepté dans la revue *Environmental Research, Engineering and Management*, 2013. No 64(2):59-71.**

### 2. Interactions sol-métal-plante

Dans cette partie, nous présentons les résultats portant sur la capacité des plantes d'accumuler les métaux et également du phosphore. Les plantes qui ont été plus abondantes dans la mine ont été recueillies et identifiées par leurs noms scientifiques. Les analyses des métaux et du phosphore dans les parties aériennes et les racines des plantes sont résumées dans le tableau 21. Les résultats obtenus montrent que les teneurs varient pour les parties aériennes entre 0,827 et 0,989 mg Cd kg<sup>-1</sup>, 0,67 et 9,241 mg Cr kg<sup>-1</sup>, 12,421 et 29,19 mg Cu kg<sup>-1</sup>, 204,816 et 1522,839 mg Fe kg<sup>-1</sup>, 0,366 et 5,952 mg Pb kg<sup>-1</sup>, 33,521 et 175,347 mg Zn kg<sup>-1</sup> et 1405,066 et 4612,795 mg P kg<sup>-1</sup>. Au niveau des racines, les teneurs varient entre 0,668 et 1,271 mg Cd kg<sup>-1</sup>, 1,455 et 11,659 mg Cr kg<sup>-1</sup>, 2,456 et 45,657 mg Cu kg<sup>-1</sup>, 721,641 et 4391,65 mg Fe kg<sup>-1</sup>, 0,104 et 104,825 mg Pb kg<sup>-1</sup>, 54,458 et 215,338 mg Zn kg<sup>-1</sup> et 5,351 et 2551,12 mg P kg<sup>-1</sup>. Les concentrations du Cd dans les parties aériennes et les racines sont dans la même gamme pour les douze espèces végétales étudiées (~0,93 mg.kg<sup>-1</sup>).

L'accumulation des métaux par la végétation du site a été vérifiée en mesurant les concentrations des métaux et du phosphore dans les parties aériennes et les racines des espèces dominantes (Tableau 21). Dans les parties aériennes, les teneurs en métaux et en phosphore moyennes étaient 0,86 mg kg<sup>-1</sup> pour le Cd, 3,02 mg kg<sup>-1</sup> pour le Cr, 18,73 mg kg<sup>-1</sup> pour le Cu, 573,17 mg kg<sup>-1</sup> pour le Fe, 1,86 mg kg<sup>-1</sup> pour le Pb, 73,17 mg kg<sup>-1</sup> pour le Zn et 2431,91 mg kg<sup>-1</sup> pour le P. De même, les teneurs moyennes dans les racines étaient 0,99 mg kg<sup>-1</sup> pour le Cd, 5,71 mg kg<sup>-1</sup> pour le Cr, 24,31 mg kg<sup>-1</sup> pour le Cu, 2636,04 mg kg<sup>-1</sup> pour le Fe, 30,24 mg kg<sup>-1</sup> pour le Pb, 98,17 mg kg<sup>-1</sup> pour le Zn et 1106,32 mg kg<sup>-1</sup> pour le P.

**Tableau 21.** Concentrations en métaux (mg.kg<sup>-1</sup> poids sec) dans les parties aériennes (PA) et les racines (R) des différentes espèces étudiées.

Famille	Espèces	Organes	Cd	Cr	Cu	Fe	Pb	Zn	P
Apiaceae	<i>Eryngium ilicifolium</i> Lam.	(R)	0,675	<b>1,455</b>	6,806	1134,062	<b>0,104</b>	67,177	<b>5,351</b>
		(PA)	0,830 <sup>a</sup>	1,090 <sup>b</sup>	25,484* <sup>c</sup>	565,225	0,727	63,789	2877,509
	<i>Eryngium triquetrum</i> Vahl.	(R)	0,937	1,874	27,854	<b>721,641</b>	-	<b>54,458</b>	823,527
		(PA)	0,837 <sup>a</sup>	1,516 <sup>b</sup>	18,771	336,144	<b>0,366</b>	61,592	1788,012
	<i>Carlina acaulia subsp caulescens</i>	(R)	1,095	6,256	37,694	3002,823	43,481	64,856	1084,044
		(PA)	0,927 <sup>a</sup>	<b>0,670<sup>b</sup></b>	18,704	<b>204,816</b>	-	71,724	1470,299
<i>Carthamus lanatus</i> L.	(R)	1,182	2,456	<b>2,456</b>	2159,485	0,273	101,962	17,191	
	(PA)	0,888 <sup>a</sup>	0,940 <sup>b</sup>	20,628* <sup>c</sup>	892,077	1,044	72,956	<b>1405,066</b>	
Asteraceae	<i>Cladanthus arabicus</i> (L.) Cass.	(R)	0,889	4,601	29,960	2516,769	8,366	70,272	1584,098
		(PA)	0,878 <sup>a</sup>	<b>9,241*<sup>b</sup></b>	17,244	636,567	2,478	90,400	3728,383
	<i>Echinops spinosus</i> L.	(R)	1,152	5,341	<b>45,657</b>	2746,996	10,681	69,480	845,801
		(PA)	<b>0,989<sup>a</sup></b>	0,728 <sup>b</sup>	<b>29,190*<sup>c</sup></b>	297,778	-	<b>175,347*<sup>e</sup></b>	2622,346
	<i>Leontodon hispidulus</i> (Delile) Boiss.	(R)	0,993	4,755	29,625	2877,625	13,115	135,796	<b>2551,120</b>
		(PA)	0,835 <sup>a</sup>	2,506 <sup>b</sup>	19,005	<b>1522,839</b>	<b>5,952<sup>d</sup></b>	85,525	<b>4612,795</b>
<i>Scolymus hispanicus</i> L.	(R)	0,918	5,048	28,708	3113,491	17,286	79,189	2123,558	
	(PA)	<b>0,827<sup>a</sup></b>	2,531 <sup>b</sup>	15,601	346,005	1,085	58,322	3058,514	
Poaceae	<i>Bromus hordeaceus</i>	(R)	0,990	7,157	5,939	<b>4391,650</b>	47,817	123,350	31,218
		(PA)	0,830 <sup>a</sup>	4,514 <sup>b</sup>	14,631	417,136	1,920	39,379	2074,059
	<i>Bromus rubens</i> L.	(R)	<b>1,271</b>	10,064	36,799	3036,247	30,802	118,937	2451,017
		(PA)	0,866 <sup>a</sup>	4,583 <sup>b</sup>	15,989	357,570	1,629	58,661	2251,899
	<i>Lamarckia aurea</i> L. (Moench).	(R)	1,206	7,917	31,983	3003,610	55,945	<b>215,338</b>	1732,296
		(PA)	0,839 <sup>a</sup>	4,037 <sup>b</sup>	17,145	930,875	1,573	66,851	1697,638
<i>Stipa capensis</i> Thunb.	(R)	<b>0,668</b>	<b>11,659</b>	8,320	2928,177	<b>104,825</b>	77,245	26,707	
	(PA)	0,832 <sup>a</sup>	3,950 <sup>b</sup>	<b>12,421</b>	371,065	-	<b>33,521</b>	1596,464	
Moyenne	(R)	0,997	5,715	24,316	2636,048	30,244	98,171	1106,327	
	(PA)	0,864	3,025	18,734	573,174	1,863	73,172	2431,915	

-, Dessous de la limite de détection (Pb: 0,004 mg / L).

\* Les valeurs de la gamme des concentrations critiques pour les plantes (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

a, b, c, d, e, les valeurs sont plus élevées de la gamme normale du Cd, Cr, Cu, Pb et Zn respectivement dans les plantes (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

L'accumulation des métaux et du phosphore dans les organes des plantes est disposée dans l'ordre suivant, pour les racines: Fe > P > Zn > Pb > Cu > Cr > Cd et pour les parties aériennes: P > Fe > Zn > Cu > Cr > Pb > Cd. Toutefois, les différences entre la teneur en métal et en phosphore des racines et des parties aériennes étaient significatives (test de corrélation de Pearson, p < 0,05 quel que soit l'élément), sauf pour *E. triquetrum* Vahl, *L. hispidulus* (Delile) Boiss et *L. aurea* L. (Moench) (Tableau 22). Cela indique que, pour nos échantillons des plantes, les concentrations de métaux et de phosphore ne sont pas en équilibre entre les racines et les parties aériennes. Par conséquent, chaque élément est accumulé avec un bon contenu dans les racines (Cd, Cr, Cu, Pb, Zn et Fe) ou dans les parties aériennes (P). Les métaux (Cd, Cr, Cu, Pb, Zn et Fe) et le phosphore extraits avec une



### 3. Adéquation de la végétation spontanée étudiée pour la phytoremédiation

La présence des métaux dans les différentes parties de la plante indique qu'il y a une accumulation et une translocation vers les parties aériennes, c'est-à-dire le transport de ces éléments des racines vers les parties aériennes. L'accumulation et la translocation peuvent être évaluées par deux paramètres: le facteur de translocation et le facteur de bioaccumulation ou bioconcentration.

Le facteur de translocation (FT) est utilisé pour évaluer les capacités de phytoextraction des plantes, plus particulièrement leurs capacités à transporter les métaux des racines vers les feuilles. Le facteur de bioaccumulation (FBC) est utilisé pour évaluer les capacités des plantes à accumuler un métal en prenant en compte la quantité du métal présent dans le sol. FBC a été utilisé pour évaluer l'efficacité de l'accumulation des métaux mobilisables du sol dans les racines et les feuilles des plantes sur différents sites (Tiwari et al., 2011).

#### 3.1. Effet sur la translocation

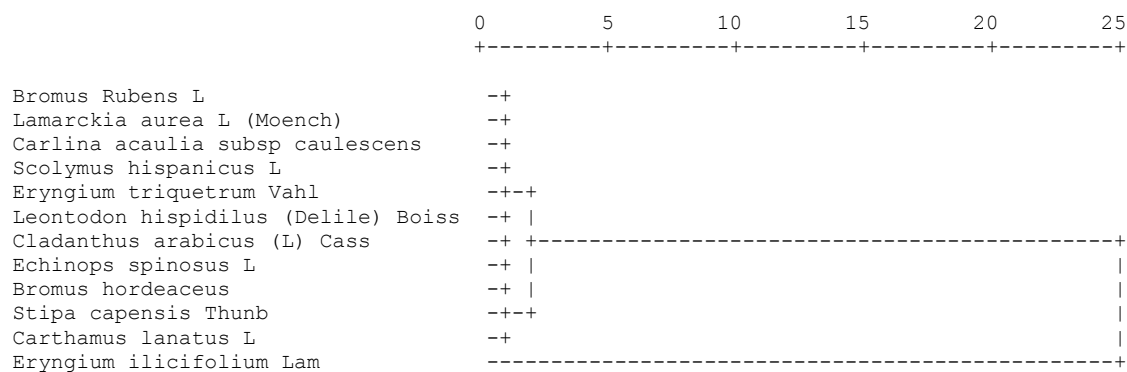
Selon Conesa et Faz (2011), les plantes tolérantes ont des valeurs FT  $\ll 1$  et hyperaccumulateurs FT  $\gg 1$ . Dans notre cas, *E. ilicifolium* Lam avait quatre valeurs de FT  $> 1$ : 1,23, 3,74, 6,99 et 537,72 pour le Cd, le Cu, le Pb et le P respectivement, et une proche de 1 (0,95) pour le Zn. *C. lanatus* L., *C. arabicus* (L.) Cass et *S. capensis* Thunb avaient trois valeurs de FT  $> 1$  pour le Cu, le Pb et le P; le Cr, le Zn et le P et le Cd, le Cu et le P, respectivement. *E. triquetrum* Vahl, *C. acaulia subsp caulescens*, *E. spinosus* et *B. hordeaceus* ont deux valeurs de FT  $> 1$  pour le Zn et le P sauf pour la dernière espèce qui possède deux valeurs de FT  $> 1$  pour le Cu et le P. *L. hispidulus* (Delile) Boiss et *S. hispanicus* L. n'avait qu'une seule valeur de FT  $> 1$  pour le P. Cependant pour les autres plantes *B. rubens* L. et *L. aurea* L. (Moench) toutes les valeurs de FT sont  $< 1$  (Tableau 24). Ce résultat montre que *E. ilicifolium* Lam a été le plus efficace pour la translocation des métaux vers les parties aériennes (Figure 26).

**Tableau 24.** Facteur de translocation du Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn et P par les différentes espèces étudiées.

Famille	Espèces	FT						
		Cd	Cr	Cu	Fe	Pb	Zn	P
Apiaceae	<i>Eryngium ilicifolium</i> Lam.	<b>1,230</b>	0,749	<b>3,744</b>	0,498	<b>6,993</b>	0,950	<b>537,720</b>
	<i>Eryngium triquetrum</i> Vahl.	0,893	0,809	0,674	0,466	-	<b>1,131</b>	<b>2,171</b>
Asteraceae	<i>Carlina acaulia subsp caulescens</i>	0,847	0,107	0,496	0,068	-	<b>1,106</b>	<b>1,356</b>
	<i>Carthamus lanatus</i> L.	0,751	0,383	<b>8,400</b>	0,413	<b>3,828</b>	0,716	<b>81,734</b>
	<i>Cladanthus arabicus</i> (L.) Cass.	0,987	<b>2,008</b>	0,576	0,253	0,296	<b>1,286</b>	<b>2,354</b>
	<i>Echinops spinosus</i> L.	0,858	0,136	0,639	0,108	-	<b>2,524</b>	<b>3,100</b>
	<i>Leontodon hispidulus</i> (Delile) Boiss.	0,842	0,527	0,642	0,529	0,454	0,630	<b>1,808</b>
	<i>Scolymus hispanicus</i> L.	0,901	0,501	0,543	0,111	0,063	0,736	<b>1,440</b>
Poaceae	<i>Bromus hordeaceus</i>	0,839	0,631	<b>2,463</b>	0,095	0,040	0,319	<b>66,437</b>
	<i>Bromus rubens</i> L.	0,681	0,455	0,435	0,118	0,053	0,493	0,919
	<i>Lamarckia aurea</i> L. (Moench).	0,696	0,510	0,536	0,310	0,028	0,310	0,980
	<i>Stipa capensis</i> Thunb.	<b>1,245</b>	0,339	<b>1,493</b>	0,127	-	0,434	<b>59,777</b>

L'analyse typologique de l'efficacité de la plante à déplacer les métaux et le phosphore vers les parties aériennes a indiqué que toutes les espèces végétales étudiées ont été étroitement alignées (à la distance euclidienne au carré de 3) et dissemblables de *E. ilicifolium*

*Lam*, ayant une capacité beaucoup plus élevée de translocation des métaux à partir des racines vers les parties aériennes (Figure 26). Une meilleure translocation est avantageuse pour la phytoextraction, car elle peut réduire les concentrations des métaux et donc réduire le potentiel de toxicité dans les racines. La translocation des métaux est l'un des mécanismes de résistance aux fortes concentrations des métaux (Ghosh et Singh, 2005a, b).



**Figure 26.** Dendrogramme de classification des plantes sur la base de FT par la méthode de classification hiérarchique de Ward.

### 3.2. Effet sur la bioaccumulation

L'accumulation des métaux par les plantes est souvent exprimée en FBC. McGrath et Zhao (2003) ont estimé que  $FBC < 0,2$  comme normal pour les plantes qui poussent sur des sols pollués. Dans notre étude, le FBC a été calculé séparément pour les parties aériennes ( $FBC_S$ ) (Tableau 25) et pour les racines ( $FBC_R$ ) (Tableau 26).

Les données présentées dans notre étude indiquent que les niveaux d'accumulation des métaux ont été obtenus uniquement pour *Echinops spinosus L.* pour le Zn (1,68), ce qui reflète la capacité de cette espèce végétale à accumuler ce métal à partir du sol et de le transporter vers les racines et les parties aériennes. Toutes les autres espèces végétales ont un  $FBC_S$  inférieur à 1 (Tableau 25).

L'analyse typologique selon  $FBC_S$  a révélé que les trois espèces végétales (*B. Rubens L.*, *L. aurea L (Moench)*, et *B. hordeaceus*) ont présenté une accumulation des métaux strictement reliés entre eux à une distance euclidienne au carré faible de 2 et ils sont reliés avec *E. ilicifolium Lam.*, *S. hispanicus L.*, *E. triquetrum Vahl*, *C. acaulia subsp caulescens*, *C. lanatus L* et *S. capensis Thunb* à distance euclidienne au carré de 4 et avec *C. arabicus (L) Cass* et *L. hispidilus (Delile Boiss)* à distance euclidienne au carré de 16. Toutefois, *E. spinosus L* était nettement différente et présente une capacité d'accumulation à une distance euclidienne au carré considérablement plus élevé (Figure 27).

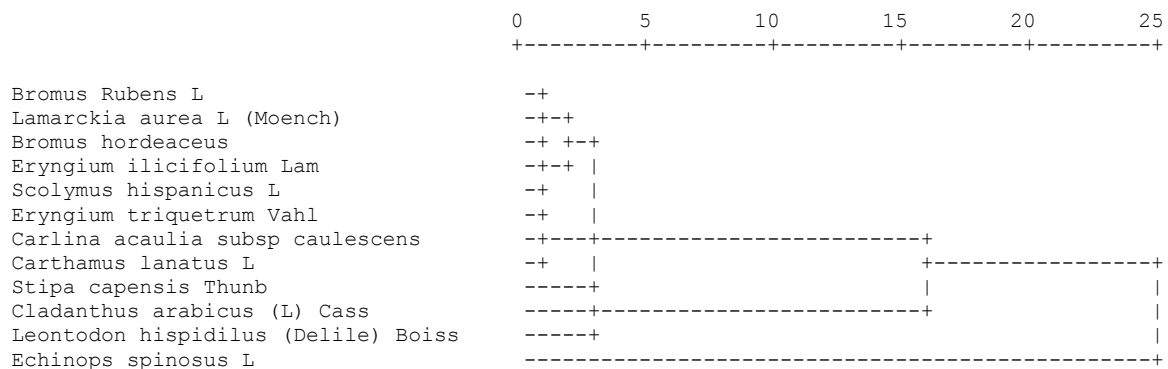
Les espèces végétales excluantes de Pb sont *C. acaulia subsp caulescens*, *C. arabicus (L.) Cass*, *E. spinosus L.*, *L. hispidilus (Delile) Boiss*, *S. hispanicus L.*, *B. hordeaceus*, *B. rubens L.*, *L. aurea L. (Moench)* et *S. capensis Thunb*. Par contre, les espèces excluantes du Zn sont: *L. hispidilus (Delile) Boiss*, *B. hordeaceus*, *B. rubens L.* et *L. aurea L. (Moench)*. Enfin, *E. spinosus L* est excluante du Cu (Tableau 26). Ces plantes ont un faible potentiel d'extraction des métaux mais peuvent être efficaces pour la phytostabilisation.

La classification hiérarchique des plantes sur la base  $FBC_R$  montre deux clusters (Figure 28). Les trois plantes: *C. lanatus L.*, *E. ilicifolium Lam* et *E. triquetrum Vahl* ont présenté des profils liés ensemble à une distance euclidienne au carré bas de 1 et ils sont reliés avec les autres plantes à distance euclidienne au carré très élevée. La deuxième classe est composée des plantes qui peuvent être efficaces pour la phytostabilité. Cette compartimentation en deux branches distinctes correspond à une séparation entre les plantes plus ou moins

phytostabilisatrices (Figure 28). Toutefois, *S. capensis* Thunb était différente des autres plantes phytostabilisatrices et présente une capacité d'accumulation à une distance euclidienne au carré de 11 (Figure 28).

**Tableau 25.** Facteur de bioaccumulation de Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn et P dans les parties aériennes des différentes espèces étudiées.

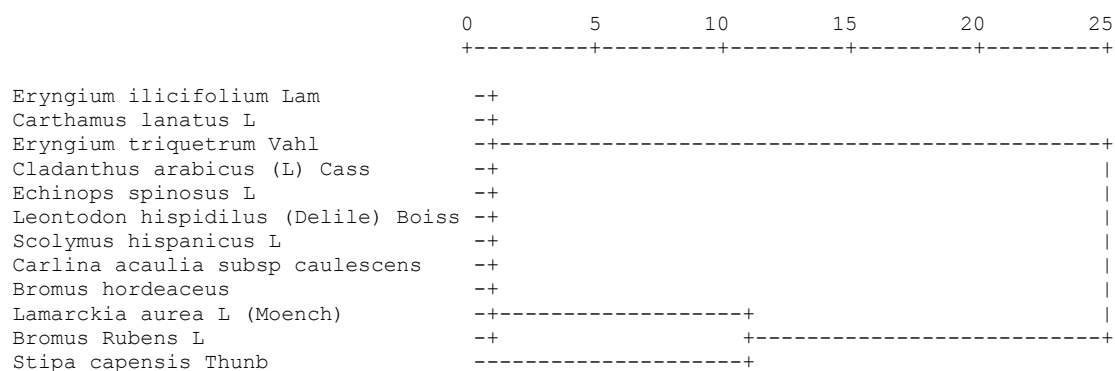
Famille	Espèces	FBC <sub>s</sub>						
		Cd	Cr	Cu	Fe	Pb	Zn	P
Apiaceae	<i>Eryngium ilicifolium</i> Lam.	0,564	0,008	0,568	0,002	0,100	0,612	0,536
	<i>Eryngium triquetrum</i> Vahl.	0,569	0,012	0,418	0,001	0,051	0,591	0,333
Asteraceae	<i>Carlina acaulia</i> subsp caulescens	0,630	0,005	0,417	0,001	-	0,688	0,274
	<i>Carthamus lanatus</i> L.	0,603	0,007	0,459	0,003	0,144	0,700	0,262
	<i>Cladanthus arabicus</i> (L.) Cass.	0,597	0,071	0,384	0,002	0,343	0,867	0,694
	<i>Echinops spinosus</i> L.	0,672	0,006	0,650	0,001	-	<b>1,682</b>	0,488
	<i>Leontodon hispidilus</i> (Delile) Boiss.	0,568	0,019	0,423	0,005	0,823	0,820	0,859
	<i>Scolymus hispanicus</i> L.	0,562	0,019	0,347	0,001	0,150	0,559	0,569
Poaceae	<i>Bromus hordeaceus</i>	0,564	0,035	0,326	0,001	0,265	0,378	0,386
	<i>Bromus rubens</i> L.	0,588	0,035	0,356	0,001	0,225	0,563	0,419
	<i>Lamarckia aurea</i> L. (Moench).	0,570	0,031	0,382	0,003	0,217	0,641	0,316
	<i>Stipa capensis</i> Thunb.	0,565	0,030	0,277	0,001	-	0,322	0,297



**Figure 27.** Dendrogramme hiérarchique des plantes sur la base de FBC<sub>s</sub> obtenues par la méthode de classification hiérarchique de Ward.

**Tableau 26.** Facteur de bioaccumulation de Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn et P dans les racines des différentes espèces étudiées.

Famille	Espèces	FBC <sub>R</sub>						
		Cd	Cr	Cu	Fe	Pb	Zn	P
Apiaceae	<i>Eryngium ilicifolium</i> Lam.	0,459	0,011	0,152	0,004	0,014	0,644	0,001
	<i>Eryngium triquetrum</i> Vahl.	0,637	0,014	0,620	0,003	-	0,522	0,153
Asteraceae	<i>Carlina acaulia subsp caulescens</i>	0,744	0,048	0,839	0,011	<b>6,010</b>	0,622	0,202
	<i>Carthamus lanatus</i> L.	0,804	0,019	0,055	0,008	0,038	0,978	0,003
	<i>Cladanthus arabicus</i> (L.) Cass.	0,604	0,035	0,667	0,009	<b>1,156</b>	0,674	0,295
	<i>Echinops spinosus</i> L.	0,783	0,041	<b>1,017</b>	0,010	<b>1,476</b>	0,666	0,157
	<i>Leontodon hispidilus</i> (Delile) Boiss.	0,675	0,036	0,660	0,010	<b>1,813</b>	<b>1,303</b>	0,475
	<i>Scolymus hispanicus</i> L.	0,624	0,039	0,639	0,011	<b>2,389</b>	0,760	0,395
Poaceae	<i>Bromus hordeaceus</i>	0,673	0,055	0,132	0,016	<b>6,609</b>	<b>1,183</b>	0,006
	<i>Bromus rubens</i> L.	0,864	0,077	0,820	0,011	<b>4,257</b>	<b>1,141</b>	0,456
	<i>Lamarckia aurea</i> L. (Moench).	0,820	0,061	0,712	0,011	<b>7,733</b>	<b>2,065</b>	0,322
	<i>Stipa capensis</i> Thunb.	0,454	0,089	0,185	0,011	<b>14,489</b>	0,741	0,005

**Figure 28.** Dendrogramme hiérarchique des plantes sur la base de FBC<sub>R</sub> obtenues par la méthode de classification hiérarchique de Ward.

En général, les valeurs du FBC<sub>R</sub> sont supérieures à celles du FBC<sub>S</sub>. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Arshad (2009). Schwartz et al. (1999) ont montré que pour la majorité des espèces végétales, les éléments prélevés restent dans les racines (90 %); seule une fraction est transférée vers les parties aériennes et les teneurs dans les espèces cultivées ne dépassent pas 0,005-0,05 % de la matière sèche.

## 4. Discussion

### 4.1. Interactions sol-métal-plante

Selon Kabata-Pendias et Pendias (2001), les concentrations normales et toxiques des métaux lourds pour les plantes (mg.kg<sup>-1</sup>) sont respectivement: 0,1-0,5 et 5-30 pour le Cr, 5-30 et 20-100 pour le Cu, 27-150 et 100-400 pour le Zn, 0,05-0,2 et 5-30 pour les le Cd, et 5-10 et 30-300 pour le Pb.

Toutes les espèces végétales étudiées montrent des concentrations supérieures à ces niveaux normaux pour le Cd et le Cr. En ce qui concerne le Pb, seulement *L. hispidilus* (Delile) Boiss montre des concentrations plus élevées que la normale. Cela montre que ces plantes ont une forte capacité à tolérer ces métaux lourds.



En comparant les valeurs obtenues au cours de ce travail avec les concentrations critiques ci-dessous, dont les effets de toxicité sont possibles, nous avons constaté que les niveaux critiques dans cette gamme sont: Cr pour *C. arabicus* (L) Cass, Cu pour *E. ilicifolium* Lam., *C. lanatus* L, *E. spinosus* L. et Zn pour *E. spinosus* L. Pour le Zn, il a été montré qu'une concentration de 100 mg.kg<sup>-1</sup> dans le fourrage est considérée être chroniquement toxique pour les animaux (Dudka et al., 1995).

Pour les plantes indigènes qui poussent sur un site contaminé, Yoon et al. (2006) ont signalé des concentrations (mg.kg<sup>-1</sup>) variant de l'indéetectable à 1183, du 6 à 460 et du 17 à 598 pour le Pb, le Cu et le Zn, respectivement. De même, dans les parties aériennes des plantes qui poussent dans une zone entourant un site minier, Moreno-Jimenez et al. (2009) ont obtenu des concentrations (mg.kg<sup>-1</sup>) variant pour le Cu, le Zn, le Cd de 2,68 à 70,2, de 9,5 à 1048, et d'indéetectable à 22.04, respectivement. Stoltz et Greger (2002) ont noté des concentrations du Cu, Zn, Cd, Pb qui varient de 6,4 à 160, de 68 à 1630, de 0,1 à 12,5 et de 3,4 à 920 mg kg<sup>-1</sup>, respectivement chez les espèces végétales des milieux humides qui poussent sur les résidus miniers. Rio et al. (2002) ont signalé des concentrations (mg.kg<sup>-1</sup>) du Pb, Zn, Cu et Cd qui varient de non détectable à 450, de 13 à 1138, de 1,2 à 152 et d'indéetectables à 9,7 respectivement, dans la végétation sauvage dans une région de la rivière après un déversement des produits toxiques sur un site minier. Dans une analyse des espèces végétales des zones humides recueillies à partir des résidus miniers, Deng et al. (2008) ont noté des concentrations allant jusqu'à 11116, 1249, et 1090 mg.kg<sup>-1</sup> pour le Zn, le Pb et le Cd respectivement, dans *Sedum alfredii* poussée sur les résidus d'une mine Pb-Zn. Chehregani et al. (2009) ont signalé des concentrations (mg.kg<sup>-1</sup>) variant de non détectable à 14,6, de 9,60 à 84,0, de 4,00 à 1485, et de 20,0 à 1987 pour le Cd, le Cu, le Pb et le Zn, respectivement, dans les parties aériennes et les feuilles des plantes collectées dans une mine du Pb-Zn.

Dans la présente étude, les concentrations du Pb, Cu, Zn et Cd sont en accord avec les résultats obtenus par Yoon et al. (2006), Moreno-Jimenez et al. (2009), Stoltz et Greger (2002), Rio et al. (2002) et Chehregani et al. (2009). Cependant, les concentrations du Zn, Pb et Cd sont inférieures aux celles obtenues par Deng et al. (2008). Par contre, les concentrations obtenues dans notre étude pour le Zn, le Cu, le Pb et le Cr sont plus élevées que celles déterminées par Remon et al. (2005). D'autre part, les concentrations de Fe sont conformes à celles rapportées par Lorestani et al. (2011) (mg.kg<sup>-1</sup>) 349,6 à 22645,3 dans les racines et 309,6 à 10604,9 dans les parties aériennes.

Comme une tendance générale, les concentrations des métaux dans les racines étaient légèrement plus élevées, pour tous les éléments, que celles dans les parties aériennes, avec une moyenne de 0,99 mg kg<sup>-1</sup> pour le Cd, 5,71 mg kg<sup>-1</sup> pour le Cr, 24,31 mg kg<sup>-1</sup> pour le Cu, 2636,05 mg kg<sup>-1</sup> pour le Fe, 30,24 mg kg<sup>-1</sup> pour le Pb et 98,17 mg kg<sup>-1</sup> pour le Zn. Cependant, pour le P on note que ce sont les concentrations dans les parties aériennes qui sont les plus élevées (1106,33 mg kg<sup>-1</sup> en moyenne). Remon et al. (2005) ont remarqué également la même tendance pour le Zn, le Cu, le Pb et le Cr. En effet, les plantes Excluantes accumulent les métaux dans leurs racines mais limitent leur transport et leur entrée dans leurs parties aériennes (Malik et Biswas, 2012). Ces plantes ont un faible potentiel d'extraction des métaux mais peuvent être efficace pour la phytostabilisation (Lasat, 2002).

La raison d'une telle teneur en P plus élevé dans les parties aériennes que dans les racines, pourrait être due à la distribution et la dynamique du P dans les processus du sol, la rhizosphère et les végétaux associés avec le sol. La transformation, la mobilisation et l'acquisition du P pourraient suggérer la morphologie, l'architecture et la physiologie des racines; les transporteurs Pi localisées dans les membranes plasmiques des racines et l'activité mycorhizienne et microbienne (Schachtman et al., 1998; Raghothama et Karthikeyan, 2005; Shen et al., 2011).

L'absorption décroissante du Cd par les racines est fournie avec l'augmentation de la concentration en Zn trouvé pour l'espèce *A. halleri* hyperaccumulateur du Cd/Zn, et dans la plupart des écotypes de *T. caeruleus*, ce qui démontre clairement que l'afflux de Cd est dû, en grande partie, à des transporteurs du Zn, avec une forte préférence pour le Zn sur le Cd (Zhao et al., 2002).

L'accumulation des métaux et du phosphore dans les organes des plantes est disposée dans l'ordre suivant: Fe > P > Zn > Pb > Cu > Cr > Cd pour les racines et P > Fe > Zn > Cu > Cr > Pb > Cd pour les parties aériennes. Nos résultats sont en accord avec ceux montrés par Kisku et al. (2011) qui ont trouvé des plantes comme le blé, l'anis et le *Datura* qui ont absorbé plus du Zn que du Pb et du Cu. Les métaux (Cd, Cr, Cu, Pb, Zn et Fe) et le phosphore extraits avec une solution de CaCl<sub>2</sub> 0,01 M, qui représentent la fraction soluble et facilement échangeable dans le sol, n'ont pas été corrélés avec leur contenu dans les plantes. Ce fait confirme que les concentrations des métaux et du phosphore dans les plantes ne peuvent pas être considérées comme un bon indicateur de la disponibilité de ces éléments dans le sol. Des résultats similaires ont été obtenus par Alvarenga et al. (2009), pour le Cu, le Pb et le Zn en utilisant l'espèce végétale: *Lolium perenne* L.

Cependant, nos résultats suggèrent également que, indépendamment de la teneur en métaux et en phosphore des sols, les différentes espèces végétales, présentées sur le site, ont les mêmes capacités à absorber et accumuler les métaux (Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ ) en utilisant les données des parties aériennes et des racines ( $r = 1$  et  $0,86$ , respectivement). Ces résultats statistiques sont différents de ceux de Remon et al. (2005) pour le Cu, le Cr, le Pb et le Zn, qui ont indiqué que les différentes espèces végétales ont différentes capacités à relever et à accumuler les métaux. Cela peut être dû, d'abord à l'origine de la contamination du sol (naturel ou anthropique), ensuite aux espèces végétales utilisées. Aucune des plantes étudiées ne possède des teneurs qui dépassent celles proposés par Baker et Brooks (1989) pour être acceptées comme hyperaccumulateurs.

Il est important de mentionner que, bien que la biodisponibilité d'un métal soit souvent liée à sa toxicité, une certaine fraction biodisponible de quelques métaux (Cu, Zn, Fe, etc.) est essentielle au bon fonctionnement des cellules. Cette fraction métallique vitale est transportée à l'intérieur des cellules par des ligands spécialisés excrétés par certains organismes vivants (c.-à-d. les métallophores ou sidérophores). Ces métallophores contrôlent l'acquisition des métaux essentiels à l'interface membranaire des cellules mais leurs mécanismes restent à ce jour peu connus (Deicke et al., 2013).

#### **4.2. Adéquation de la végétation spontanée étudiée pour la phytoremédiation**

L'accumulation des métaux dans les tissus de la plante varie en fonction de plusieurs facteurs tels que la matière organique, le pH, la capacité d'échange cationique du sol, la spéciation et la disponibilité des métaux (Kos et al., 2003; Cui et al., 2004; Sharma et al., 2008). L'absorption des éléments métalliques ainsi que leur translocation vers les parties aériennes varient à la fois entre les éléments et entre les espèces végétales (Prasad, 2004). Par conséquent, une évaluation plus précise des données a été réalisée par la détermination des facteurs de bioconcentration et de translocation.

La phytoextraction est l'utilisation des végétaux (hyper)accumulateurs qui vont absorber les métaux ou les métalloïdes du sol et les accumuler dans les organes faciles à récolter (Puschenreiter et Wenzel, 2005; Remon, 2006). Parmi les 12 espèces collectées dans la zone d'étude, *E. spinosus* L. semble être une plante phytoextractrice du Zn. Cette plante a accumulé mieux ce métal par rapport aux espèces analysées. Cependant, *E. ilicifolium* Lam apparaît comme une espèce utile dans la translocation des métaux lourds à partir des racines vers les pousses, du fait que ses valeurs de FT sont supérieures à 1 pour le Cd, le Cu, le Pb, le P et une valeur proche de 1 a été obtenue pour le Zn (Tableau 24).

Au niveau de la racine, les éléments métalliques peuvent être transportés par voie symplastique (à l'intérieur de la cellule) et apoplastique (à l'extérieur de la cellule) (Benavides *et al.*, 2005). L'absorption est bien réelle car les métaux se trouvent alors dans le milieu interne de la cellule. Cette absorption peut être passive (le long d'un gradient électrochimique) ou active avec dépense d'énergie (*via* un transporteur). Le Cd serait absorbé de manière passive dans 30 % des cas (Prasad, 2004).

Il existe des mécanismes de tolérance aux métaux dans les plantes tels que l'exclusion et l'accumulation. Selon Malik et Biswas (2012), l'exclusion des métaux permet à la plante de concentrer ces derniers dans les racines et de limiter ainsi la translocation vers les parties aériennes. La distribution des métaux dans les différents organes de la plante est généralement décrite selon l'ordre suivant: racine > feuille > tige > fleur > graine (Seregin et Ivanov, 2001). Pour les arbres, la séquence d'accumulation est en général: racine > feuille > écorce > bois (Laureysens *et al.*, 2004; Mertens *et al.*, 2006; Prasad *et al.*, 2006).

Enfin, le processus de phytoextraction a été évalué selon l'efficacité d'extraction des métaux à partir du sol. Nos résultats montrent que le Zn est le plus biodisponible par rapport aux autres métaux, ce qui a permis une amélioration pour *E. spinosus L.* à accumuler ce métal et, par conséquent, une phytoextraction plus élevée de ce métal du sol contaminé. Ainsi, cela peut être considéré comme un outil biotechnologique pour la remédiation des sols pollués. De plus, les plantes avec les valeurs du FBC<sub>s</sub> inférieur à 1 peuvent être adaptées à la phytostabilisation.

## 5. Conclusion

Depuis la fin de l'activité minière, soit une cinquantaine d'années, et malgré une forte contamination en métaux, un couvert végétal s'est développé sur l'ensemble du site du gisement. Cette végétation peut être relativement très dense. Les résultats montrent clairement la capacité d'adaptation des plantes colonisatrices malgré la teneur élevée en contaminants et le faible potentiel agronomique de ces sols (faibles teneurs en éléments nutritifs entre autres). De plus, quelles que soient les espèces végétales étudiées, les facteurs de transfert ou de bioaccumulation sont, en général, très faibles.

Sur la base des conclusions expérimentales de ce travail, nous pouvons dire que:

1. L'accumulation des métaux et du phosphore dépend des espèces végétales;
2. Parmi les douze espèces étudiées, *E. spinosus L.* s'est montré comme phytoextracteur du Zn, car (i) elle a accumulé le métal dans les tissus aériens, et (ii) a possédé un facteur de translocation supérieur à 1;
3. Certaines métallophytes concentrent 1,522 mg Fe kg<sup>-1</sup> et plus de 4612 mg P kg<sup>-1</sup> dans les parties aériennes (*L. hispidulus (Delile) Boiss*);
4. Onze plantes excluantes, représentent potentiellement des candidats pour phytostabilisation;

Pour la phytorextraction du Zn, nous proposons une native plante, *E. spinosus L.*, en raison de son efficacité pour éliminer le Zn. Cependant, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes précis par lesquels cette espèce extrait le zinc à partir du sol. D'autres travaux pourraient être effectués pour valider l'impact des métaux sur la croissance et le métabolisme des céréales qui poussent autour de la mine et d'étudier l'entrée des métaux dans la chaîne alimentaire. Ainsi, on souligne l'intérêt d'exploiter le potentiel hyperaccumulateur (plantes ou bactéries) comme ressource génétique riche pour développer des plantes phytoextractrices à forte biomasse.

### **III. Diversité structurelle et fonctionnelle des communautés bactériennes isolées des sols de mine d'Ait Ammar**

#### **1. Contexte et objectifs**

L'impact écologique des métaux lourds sur les communautés bactériennes telluriques a fait l'objet de très nombreuses études dans ces vingt dernières années. Il est généralement admis que les micro-organismes sont plus sensibles aux métaux lourds que les plantes ou les animaux vivant dans les sols pollués (Giller *et al.*, 1998). Les impacts des métaux lourds sur les communautés microbiennes peuvent être abordés de diverses façons: la densité (colonie forming units, CFU), la taille, la structure des communautés (génétique et fonctionnelle) et également l'activité enzymatique.

L'importance fonctionnelle de la biodiversité n'est plus discutable, 4 rôles lui sont attribués par le «*Millenium Ecosystems Assessment MA 2005*»: (i) un rôle de support qui considère la biodiversité comme le pilier d'un écosystème (diversité structurelle et fonctionnelle), (ii) un rôle de régulateur par l'influence que joue la biodiversité sur la productivité, la stabilité et la résilience des écosystèmes, (iii) un rôle culturel touchant à l'ensemble des bénéfices non matériels et (iv) un rôle de ressource par la production directe ou indirecte de nourriture.

Notre travail se positionne dans cette problématique d'inventaire de la diversité microbienne des sols et pousse son ambition sur des sols pollués par des métaux lourds dans la mine de fer d'Ait Ammar. Nos stratégies d'étude sont basées sur deux piliers expérimentaux, l'un fonctionnel et l'autre structural. L'approche fonctionnelle se base sur l'étude de la diversité métabolique potentielle des bactéries cultivables du sol.

L'objectif principal de cette partie de notre étude est d'obtenir des informations sur la diversité microbienne et sur la toxicité potentielle des sols pollués par des métaux lourds en présence des concentrations très importantes du fer et du phosphore.

**Les résultats acquis et présentés ci-dessous sont soumis pour publication dans la revue *International Journal of Mining, Reclamation and Environment*.**

#### **2. Interactions sol-métal-bactérie**

Afin de savoir s'il existe une variabilité de l'abondance, de l'activité et de la composition de la communauté bactérienne en fonction de la distance par rapport à la mine, nous avons réalisé des analyses écotoxicologique (Microtox), des mesures de l'activité métabolique (Biolog) et une analyse de la structure génétique de la communauté bactérienne totale par PCR-DGGE. La corrélation entre ces deux dernières approches a été le sujet de nombreux travaux de recherches (Xue *et al.*, 2008; Cycoń *et al.*, 2013; Mulling *et al.*, 2014).

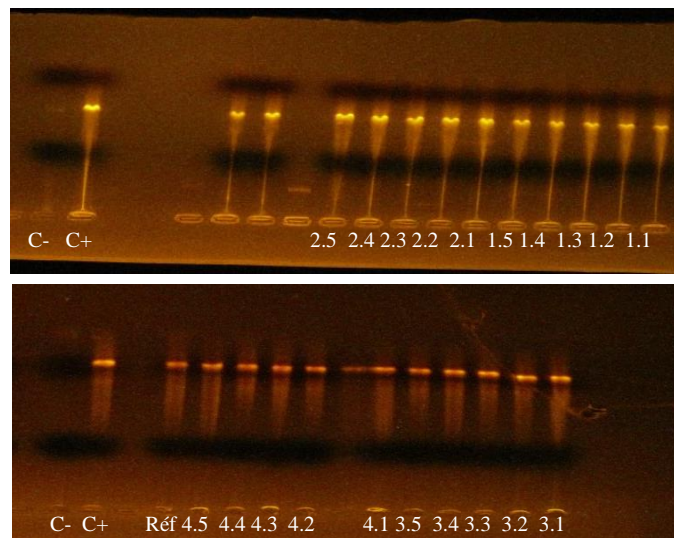
##### **2.1. Diversité structurelle**

De nombreuses méthodes d'empreintes moléculaires récemment développées permettent de prendre en compte les micro-organismes du sol cultivables et non cultivables. Ces techniques font appel à des méthodes d'extraction, de quantification et d'identification de molécules du sol qui sont spécifiques de certains micro-organismes ou groupes de micro-organismes (Hill *et al.*, 2000). La plupart d'entre elles sont basées sur l'analyse du gène codant la petite sous unité ribosomale (ADNr) ou sur l'analyse d'un marqueur biochimique d'un groupe fonctionnel ou d'une communauté (acide gras phospholipidiques par exemple). Dans cette étude, nous avons choisis d'utiliser la méthode de PCR-DGGE pour comparer la structure des communautés bactériennes.

Nous avons réalisé des empreintes génétiques de la communauté bactérienne par DGGE sur les échantillons du sol aux différents lieux étudiés pour répondre aux questions suivantes:

- Existe-t-il une variabilité spatiale de la composition de la communauté bactérienne au cours de la contamination?
- Y-a-t-il un lien entre les paramètres physico-chimiques et la communauté bactérienne?

Dans notre travail, la méthode de PCR-DGGE a été utilisée pour étudier les changements dans la structure de la communauté microbienne dans vingt échantillons contaminés par des métaux (Fe, Cd, Pb, Cr, Cu et Zn) et du phosphore, à différentes distances de la mine de fer abandonnée et un échantillon non contaminé comme référence. Les profils de DGGE bactériennes, générés par *nested* PCR en utilisant les amorces bactériennes universelles (F984 et R1378) (Figure 29), ont révélés la composition structurelle des communautés dans des échantillons du sol (Figure 30).



**Figure 29.** Amplification par *Nested* PCR du gène 16S ADNr à partir de l'ADN total extraits des 21 échantillons des sols. C-: Contrôle négatif, C+: Contrôle positif.

La figure 29 représente les produits d'amplification du gène 16S ADNr à partir d'ADN total des 21 échantillons, la quantité des produits de *nested* PCR est assez important pour réaliser la DGGE.

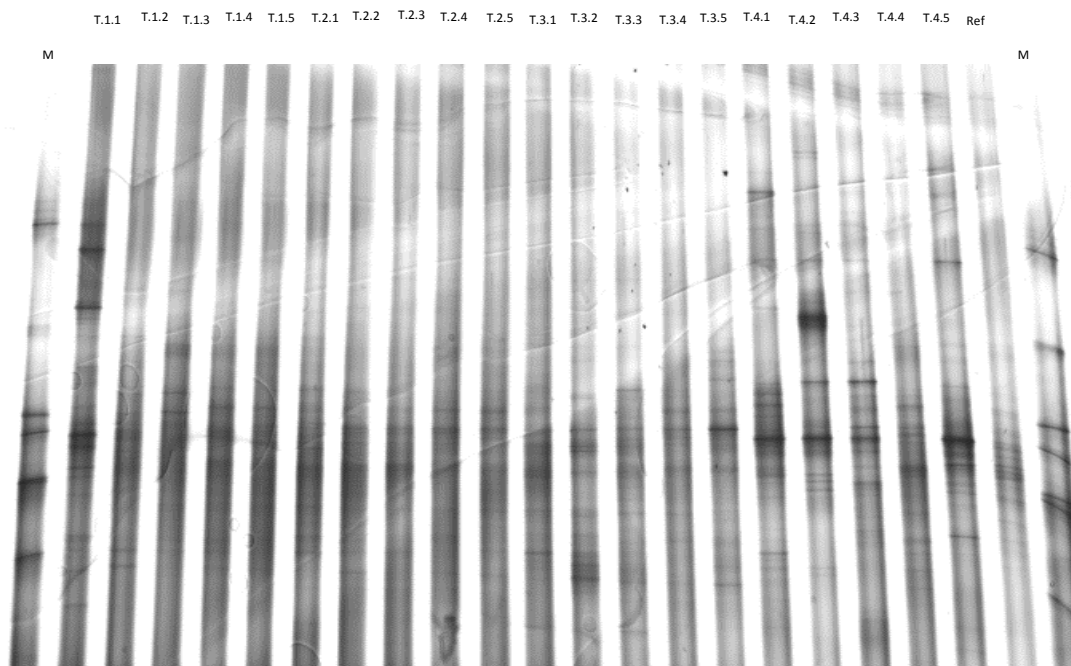
Les résultats de la DGGE ont été obtenus avec un gradient de dénaturation de 32-72 % (Figure 30) et un pourcentage d'acrylamide de 8 %. Pour chaque échantillon, 2 répétitions ont été effectuées sur 2 gels différents. Les profils DGGE ont été ensuite analysés par le logiciel GelCompar.

L'analyse visuelle des profils obtenus par DGGE dans les échantillons du sol montre que les profils issus de la même ronde (ex: T.1.1, T.2.1, T.3.1 et T.4.1), ainsi que, les profils du même transept (ex: T.1.1, T.1.2, T.1.3, T.1.4 et T.1.5) sont peu différents.

Les bandes DGGE ont révélé un total de 58 OTUs. Le nombre d'OTU par échantillon est de 22, 16, 21, 12, 19, 24, 20, 16, 22, 25, 26, 22, 27, 22, 22, 26, 19, 25, 23, 20 et 23 pour les échantillons T.1.1, T.1.2, T.1.3, T.1.4, T.1.5, T.2.1, T.2.2, T.2.3, T.2.4, T.2.5, T.3.1, T.3.2, T.3.3, T.3.4, T.3.5, T.4.1, T.4.2, T.4.3, T.4.4, T.4.5 et Référence, respectivement.

Le tableau 27 montre que les transepts sont identiques ( $R$ -global = 0,162,  $p$  = 0,049). Ceci montre bien que la direction ne possède aucune influence sur la population microbienne de la mine. Le tableau 28 montre que les rondes sont également identiques ( $R$ -global = -0,027,  $p$  = 0,625). Donc la distance de la mine n'influence pas sur la population microbienne du sol.

De ce fait la contamination du sol n'a aucune influence significative sur la population microbienne.



**Figure 30.** Profils DGGE des produits de PCR obtenus à partir de l'ADNr 16S extraits de l'ADN total du sol des échantillons étudiés. M correspond au marqueur bactérien.

**Tableau 27.** Les analyses statistiques ANOSIM des mesures de similarité de Bray-Curtis (R) des transepts.

	<b>R-global</b>	<b>Niveau de signification %</b>
	<b>0,162</b>	<b>4,9</b>
<b>Groupes</b>	<b>R statistique</b>	<b>Niveau de signification %</b>
<b>T.1, T.2</b>	<b>0,056</b>	<b>31,7</b>
<b>T.1, T.3</b>	<b>-0,012</b>	<b>47,6</b>
<b>T.1, T.4</b>	<b>0,32</b>	<b>3,2</b>
<b>T.1, REF</b>	<b>0,12</b>	<b>50,0</b>
<b>T.2, T.3</b>	<b>0,108</b>	<b>16,7</b>
<b>T.2, T.4</b>	<b>0,528</b>	<b>1,6</b>
<b>T.2, REF</b>	<b>0,6</b>	<b>16,7</b>
<b>T.3, T.4</b>	<b>0,084</b>	<b>25,4</b>
<b>T.3, REF</b>	<b>-0,08</b>	<b>50,0</b>
<b>T.4, REF</b>	<b>0,24</b>	<b>50,0</b>

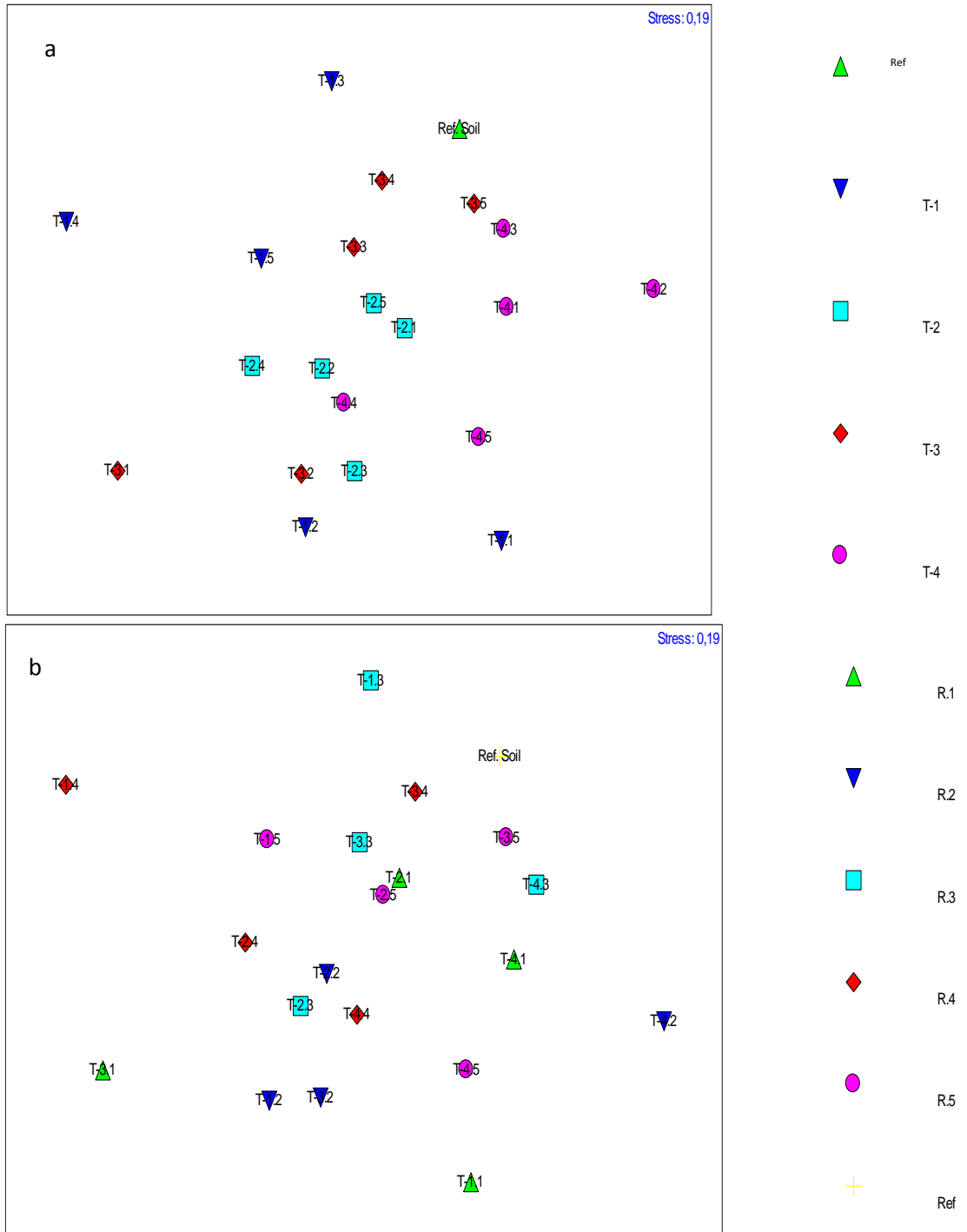
**Tableau 28.** Les analyses statistiques ANOSIM des mesures de similarité de Bray-Curtis (R) des rondes.

	<b>R-global</b>	<b>Niveau de signification %</b>
	<b>-0,027</b>	<b>62,5</b>
<b>Groupes</b>	<b>R statistique</b>	<b>Niveau de signification %</b>
<b>R.1, R.2</b>	<b>-0,135</b>	<b>82,9</b>
<b>R.1, R.3</b>	<b>-0,042</b>	<b>62,0</b>
<b>R.1, R.4</b>	<b>0,031</b>	<b>31,4</b>
<b>R.1, R.5</b>	<b>-0,177</b>	<b>88,6</b>
<b>R.1, REF</b>	<b>-0,25</b>	<b>60,0</b>
<b>R.2, R.3</b>	<b>0,115</b>	<b>25,7</b>
<b>R.2, R.4</b>	<b>0,052</b>	<b>34,3</b>
<b>R.2, R.5</b>	<b>0,156</b>	<b>22,9</b>
<b>R.2, REF</b>	<b>0,417</b>	<b>40,0</b>
<b>R.3, R.4</b>	<b>-0,146</b>	<b>85,7</b>
<b>R.3, R.5</b>	<b>-0,281</b>	<b>91,4</b>
<b>R.3, REF</b>	<b>-0,583</b>	<b>100,0</b>
<b>R.4, R.5</b>	<b>0,031</b>	<b>40,0</b>
<b>R.4, REF</b>	<b>0,167</b>	<b>40,0</b>
<b>R.5, REF</b>	<b>0,167</b>	<b>60,0</b>

L'analyse en (MDS) a permis de représenter les rangs de similarité entre les profils DGGE de tous les échantillons (Figure 31). Le tracé des analyses MDS des profils DGGE corroborent parfaitement avec les résultats ANOSIM, ce qui indique que cette méthode d'analyse ne montre aucune séparation claire entre les échantillons du sol (Figure 31 a, b). Pour cette étude, le niveau de stress évalué par MDS est de 0,19 ce qui indique que la représentation bidimensionnelle est valide. En fait, ces résultats suggèrent que la direction (Transept, Figure 31 a) et la distance (Ronde, Figure 31 b) n'ont aucun effet significatif sur la communauté microbienne.

L'indice de Shannon-Wiener (H) a été utilisé pour estimer la diversité de la population bactérienne dans chaque échantillon. Le tableau 29 montre que la diversité des bactéries est élevée, indiquant un peuplement diversifié dans chaque échantillon. D'autre part, le test de student a montré qu'il n'existe pas de différence significative entre les échantillons ( $t = 0,069$ ,  $p = 0,946$ ).

Les analyses de la biodiversité structurale ont beaucoup de potentiel dans les domaines environnementaux surtout si elles sont combinées à d'autres indicateurs de santé des écosystèmes. Cependant, un changement structurel de la communauté microbienne n'implique pas nécessairement l'altération de l'intégrité fonctionnelle de la communauté. Ainsi, une autre forme de diversité, la diversité dite fonctionnelle, serait plus adéquate pour étudier l'impact toxique des métaux (Epelde et al., 2012).



**Figure 31.** Analyse Multidimensionnelle non métrique réalisé sur les profils DGGE obtenus pour l'ensemble des échantillons étudiés. a: par transect; b: par ronde.



**Tableau 29.** Indice de Shannon-Wiener (H) de la population bactérienne dans chaque échantillon.

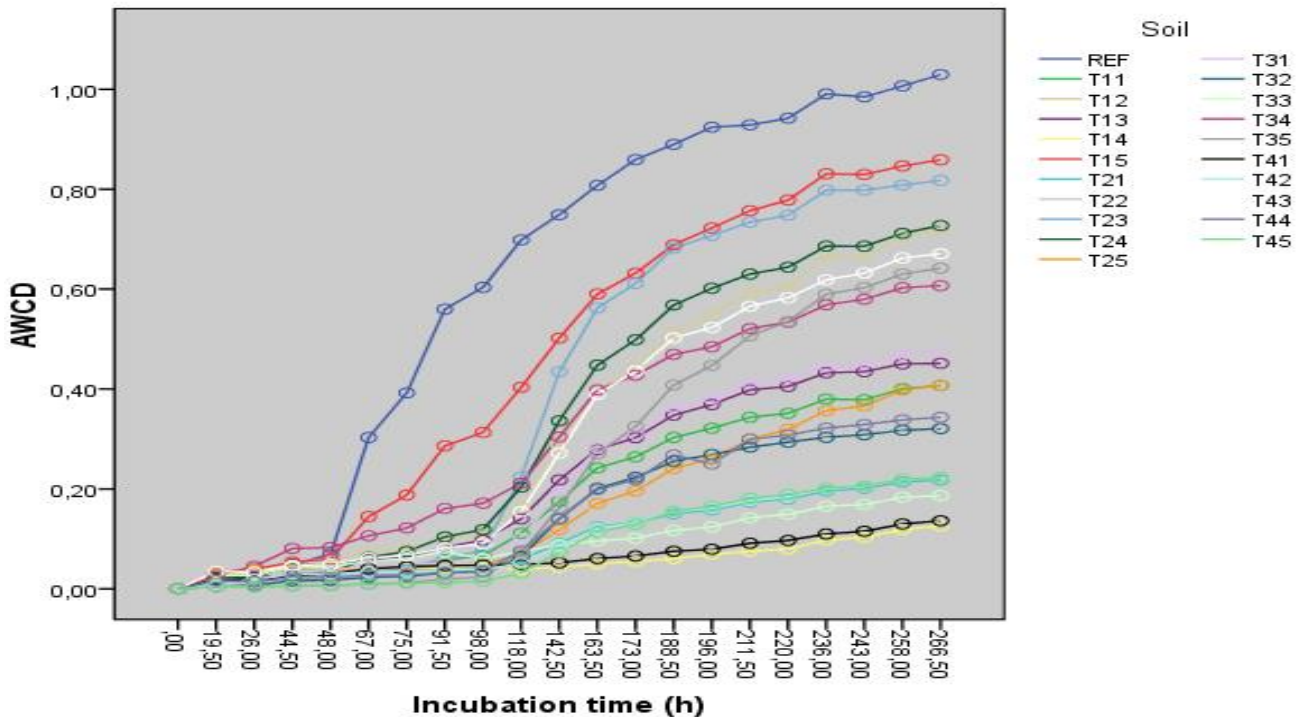
Echantillons	H
T.1.1	4,310
T.1.2	3,843
T.1.3	4,319
T.1.4	3,525
T.1.5	4,178
T.2.1	4,420
T.2.2	4,228
T.2.3	3,835
T.2.4	4,317
T.2.5	4,557
T.3.1	4,445
T.3.2	4,191
T.3.3	4,566
T.3.4	4,247
T.3.5	4,339
T.4.1	4,439
T.4.2	3,975
T.4.3	4,477
T.4.4	4,398
T.4.5	4,196
Réf.	4,317

## 2.2. Diversité métabolique

Nos premiers résultats ont montré que la contamination polymétallique n'a aucun effet significatif sur la structure de ces communautés bactériennes. Il est possible que la contamination agisse sur la diversité fonctionnelle mais non sur la diversité taxonomique. C'est ce que nous avons voulu déterminer en nous intéressons à la détermination des activités métaboliques des souches microbiennes présentes dans les sols pollués. Dans ce but, une méthode d'étude des profils métaboliques a été utilisée: la technique des microplaques Biolog<sup>TM</sup>. L'analyse des profils physiologiques au sein de la communauté bactérienne (*Community Level Physiological Profiles ou CLPP*) est basée sur la capacité des micro-organismes à utiliser différents substrats carbonés (Mondini et Insam, 2003).

### 2.2.1. Evolution des valeurs d'AWCD en fonction du temps d'inoculation

Nous avons suivi l'évolution de la coloration moyenne des plaques au cours du temps, toutes les 12 h pendant 12 jours (Figure 32). L'AWCD calculée sur la courbe moyenne de croissance est utilisée pour déterminer la diversité fonctionnelle de chaque échantillon. Le développement de la couleur a suivi une courbe sigmoïde avec le temps d'incubation, comme l'ont constaté Garland et Mills (1991). La relation entre AWCD et le temps d'incubation est montré dans la figure 32.



**Figure 32.** Evolution des valeurs d'AWCD en fonction du temps d'incubation des prélèvements traités.

Le développement de la couleur varie selon les puits qui sont répondus, au début, pendant les premières 48 heures d'incubation, les valeurs d'AWCD ont très peu changé, mais plus tard elles sont fortement augmentées (98 heures) surtout pour les valeurs de référence et de T.1.5. Les autres valeurs d'AWCD restent très faibles jusqu'à 118 heures. La valeur d'AWCD du sol de référence était la plus haute par rapport aux valeurs des autres échantillons de la zone d'exploitation minière. Parmi tous les échantillons analysés, seuls quelques puits n'ont montré aucune réaction importante de la couleur après 266,5 heures d'incubation. L'AWCD du sol de T.1.5 a augmenté progressivement et était plus élevé que celui des autres sols contaminés jusqu'à la dernière étape de l'incubation. Après 98 heures, l'AWCD de T.2.3 a considérablement augmenté et il a atteint T.1.5 à 188,5 heures. Cela peut être lié à la forte teneur en carbone organique dans T.2.3 qui peut fournir une source de carbone de plus longue durée pour les micro-organismes du sol. Après 142,5 et 211,5 heures, le nombre de puits positifs a augmenté dans presque toutes les plaques mais les différences entre les échantillons ont été maintenues.

Compte tenu du fait qu'à 163,5 h nous sommes dans la partie exponentielle de la courbe pour tous les échantillons, c'est ce temps que nous avons retenu pour les analyses comparatives ultérieures. Les valeurs obtenues à 163,5 h sont données dans le tableau 1 en annexe.

### 2.2.2. Activité totale et AWCD

L'activité métabolique globale mesurée apparaît plus élevée dans les échantillons provenant des sols de référence (397,871), suivi par T.1.5 (296,284) et T.2.3 (255,184). Tandis que les échantillons possédant des activités plus faibles sont T.1.4 (38,381) et T.4.1 (41,355) (Tableau 30), mais elle n'existe pas de différence significative entre les échantillons ( $t = 0,00$ ,  $p = 1,00$ ). L'AWCD conduit aux mêmes observations à savoir une activité plus élevée dans les échantillons Réf, T.1.5 et T.2.3 (Figure 32).

### 2.2.3. Capacités de dégradation et les indices de diversité

La capacité d'utilisation des différents substrats par les communautés bactériennes des échantillons a été estimée par le nombre de puits positifs par plaque alors que la diversité a été estimée à partir de la valeur relative des absorptions pour chaque substrat.

La capacité de dégradation de chaque échantillon (richesse) est également déterminée, elle permet d'estimer la proportion de sources de C non utilisées par les communautés microbiennes. Enfin, l'indice de Shannon est un indicateur de diversité des communautés bactériennes (Krista et al., 2001). L'indice de régularité ( $E_H$ ) est un élément important de la diversité, donc le maximum de diversité sera atteint quand les espèces auront une répartition très régulière. La richesse de substrat (S), l'indice de Shannon (H) et l'indice de régularité ( $E_H$ ) pour les différents échantillons du sol sont présentés dans le tableau 30. L'indice de diversité de Shannon est plus faible pour le sol T.1.4 et plus grand pour le sol T.3.4 et il varie selon l'ordre suivant: T.3.4 > REF > T.1.5 > T.4.3 > T.3.5 > T.2.3 > T.2.4 > T.1.2 > T.3.1 > T.4.4 > T.1.3 > T.2.2 > T.1.1 > T.3.2 > T.2.5 > T.4.5 > T.2.1 > T.4.2 > T.4.1 > T.3.3 > T.1.4. La population microbienne du sol T.3.4 a montré le plus haut indice de richesse suivie par les sols T.1.5, T.4.3 et de référence (Tableau 30). Selon Lexerad et Eid (2006), des valeurs de l'indice de régularité supérieures à 0.7 correspondent aux structures les plus irrégulières se comportant sous la forme dite «uniforme». Donc, sur la base de cette conclusion, on note que la structure de tous les échantillons analysés est très irrégulière.

Les indices de richesse, de Shannon, de régularité et l'activité totale n'ont été pas affectés de manière significative par la distance de la mine ou par la direction et donc ils sont identiques pour tous les échantillons analysés, selon le test de student: S ( $t = -0,003$ ,  $p = 0,998$ ), H ( $t = -0,042$ ,  $p = 0,967$ ),  $E_H$  ( $t = 0,224$ ,  $p = 0,825$ ) et activité totale ( $t = 0,00$ ,  $p = 1,00$ ).

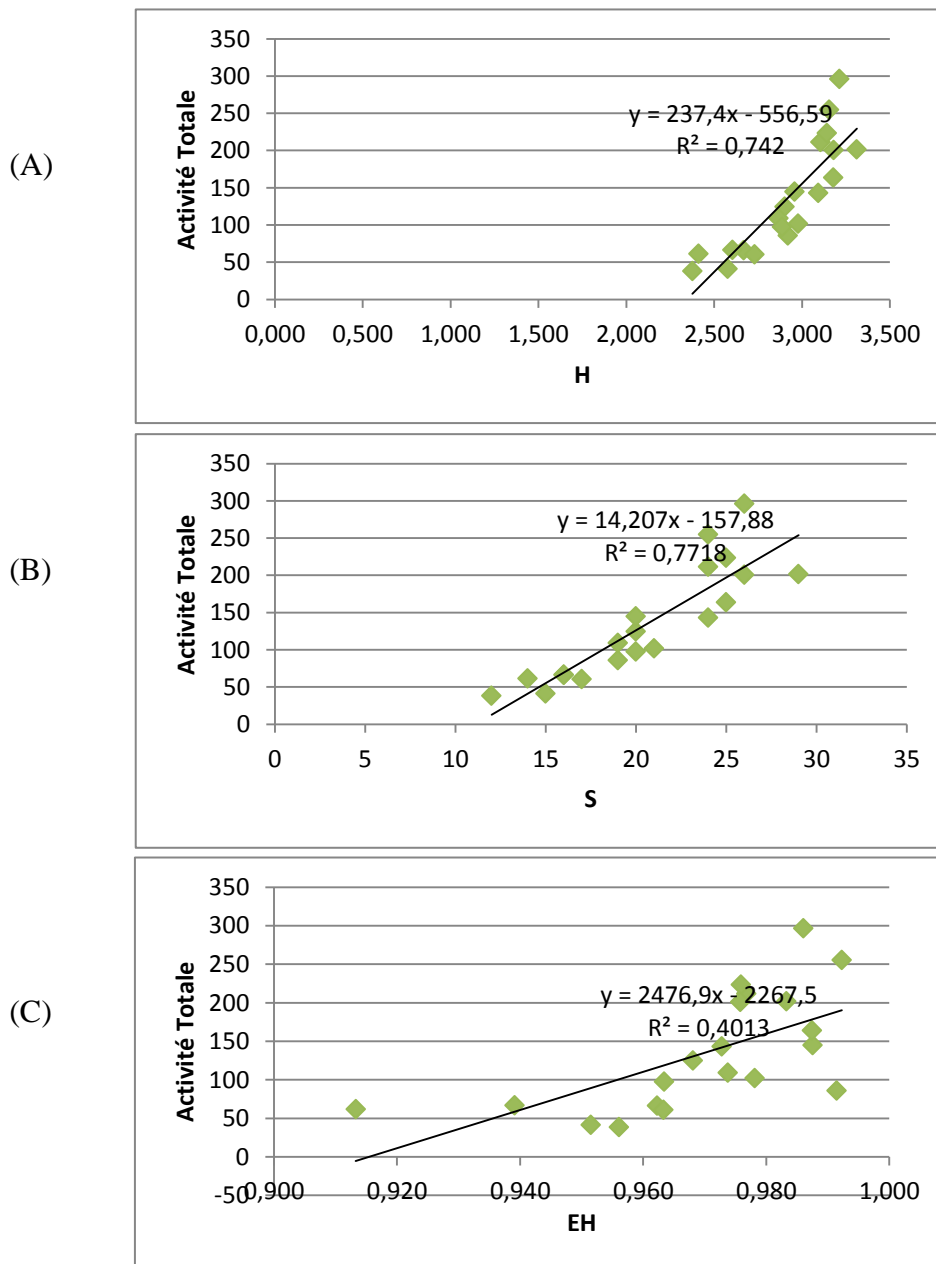
**Tableau 30.** Indices de richesse (S), de Shannon (H), de régularité ( $E_H$ ) et l'activité totale de la communauté microbienne des différents échantillons étudiés.

Sol	H	S	$E_H$	Activité Totale	Capacité d'utilisation des substrats (%)
T.1.1	2,900	20	0,968	124,928	64,52
T.1.2	3,104	24	0,977	211,654	77,42
T.1.3	2,958	20	0,988	144,753	64,52
T.1.4	<b><u>2,376</u></b>	<b><u>12</u></b>	0,956	<b><u>38,381</u></b>	<b><u>38,71</u></b>
T.1.5	3,213	26	0,986	296,284	83,87
T.2.1	2,668	16	0,962	66,268	51,61
T.2.2	2,919	19	0,991	85,95	61,29
T.2.3	3,154	24	0,992	255,184	77,42
T.2.4	3,141	25	0,976	223,45	80,65
T.2.5	2,867	19	0,974	109,258	61,29
T.3.1	3,091	24	0,973	143,247	77,42
T.3.2	2,886	20	0,963	97,471	64,52
T.3.3	2,410	14	0,913	61,742	45,16
T.3.4	<b><u>3,311</u></b>	<b><u>29</u></b>	0,983	201,65	<b><u>93,55</u></b>
T.3.5	3,178	25	0,987	163,709	80,65
T.4.1	2,577	15	0,952	<b><u>41,355</u></b>	48,39
T.4.2	2,604	16	0,939	66,601	51,61
T.4.3	3,179	26	0,976	200,752	83,87
T.4.4	2,978	21	0,978	102,036	67,74
T.4.5	2,729	17	0,963	60,832	54,84
REF	3,234	26	0,993	397,871	83,87

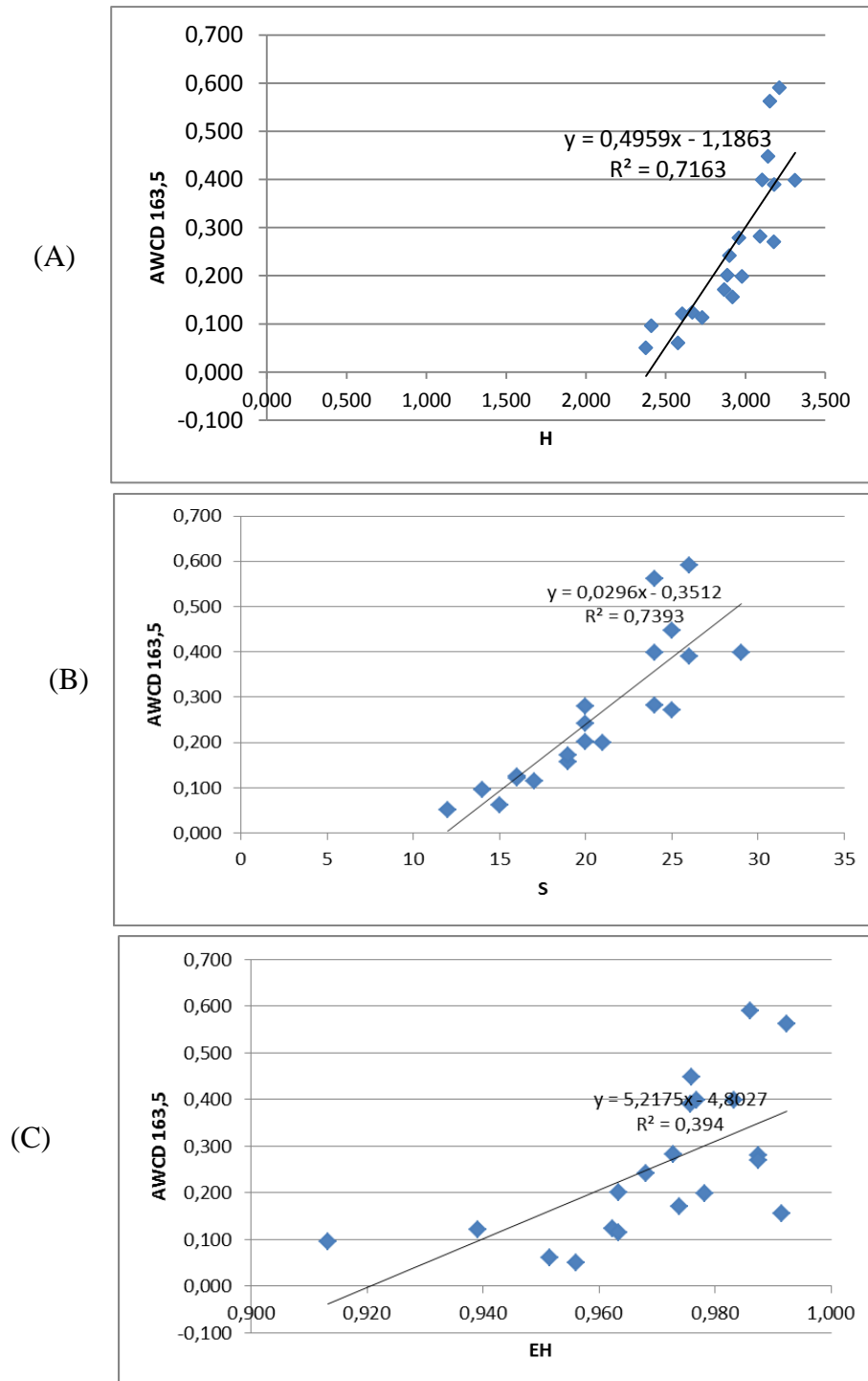
Le tableau 30 montre que la capacité d'utilisation des différents substrats ( $S/31 \times 100$ ) varie de 93,55 % à 38,71 %. Les échantillons T.3.4, Réf, T.1.5 et T.4.3 présentent plus d'activités métaboliques diverses, mais le niveau de pollution ne modifie pas la richesse des échantillons (sont identiques selon test t).

Les valeurs de l'indice de Shannon confirment bien les résultats précédents. Une plus grande diversité des activités dans les échantillons (intra), avec un indice de Shannon plus élevé pour les échantillons T.3.4, Réf, T.1.5 et T.4.3, et pas de diversité significative entre les différents échantillons (inter) (Test t).

De plus, les résultats obtenus montrent que l'activité totale et l'indice de diversité de Shannon, l'indice de richesse et l'indice de régularité sont corrélés positivement pour la quasi-totalité des prélèvements (Figure 33). Ainsi, elle existe une corrélation entre l' $AWCD_{163,5}$  et ces indices (Figure 34).



**Figure 33.** Corrélation entre l'activité totale et les Indices de diversité de Shannon (A), de richesse (B) et de régularité (C), calculés à partir de substrats dégradés dans les plaques Biolog<sup>®</sup> EcoPlaque, pour les différents échantillons des sols contaminés.



**Figure 34.** Corrélation entre l'AWCD<sub>163,5</sub> et les Indices de diversité de Shannon (A), de richesse (B) et de régularité (C), calculés à partir de substrats dégradés dans les plaques Biolog<sup>®</sup> EcoPlaque, pour les différents échantillons des sols contaminés.

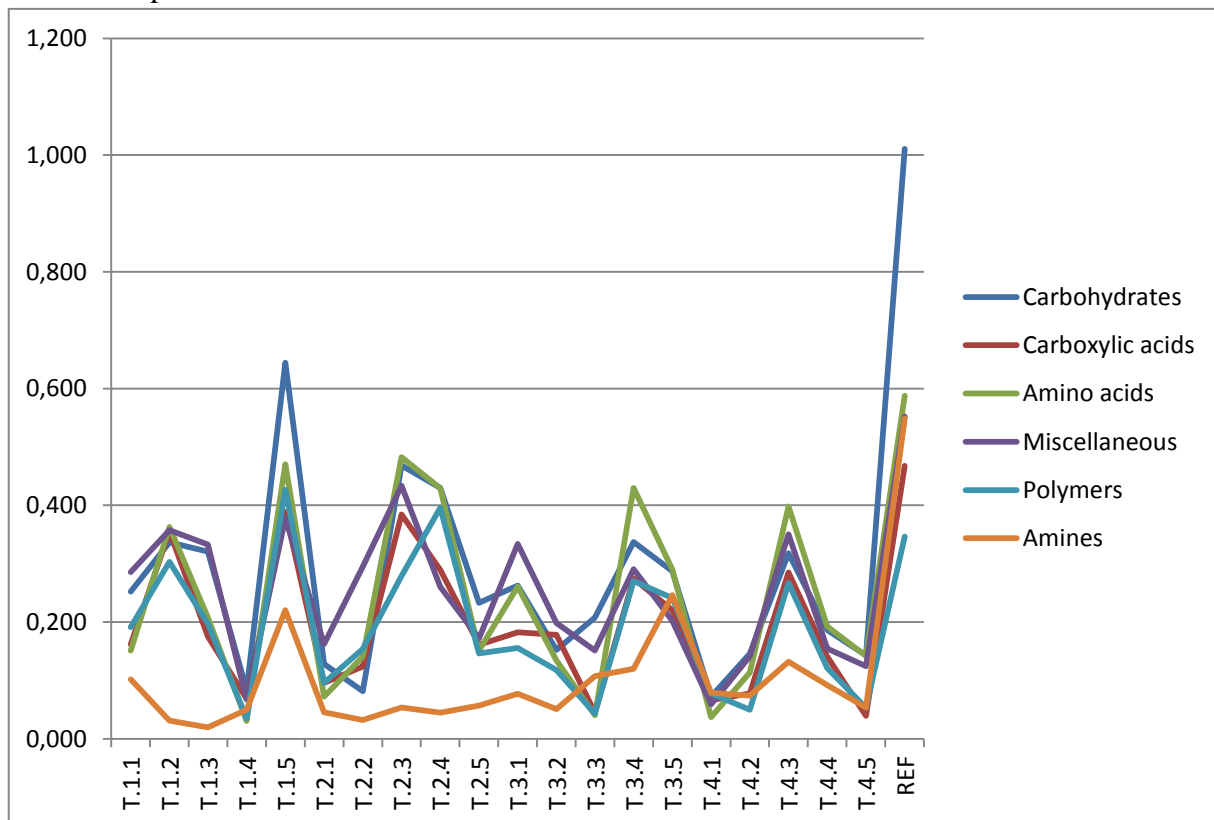
Dans ce site d'Ait Ammar, l'activité totale et l'AWCD<sub>163,5</sub> est corrélée dans la majorité des prélèvements avec des variations des indices de diversité, de richesse et de régularité.

#### 2.2.4. Activités par catégories biochimiques

Pour réduire le nombre de variables dans les analyses de données, les sources de carbone sont classées selon Zak et al. (1994) en 6 groupes biochimiques: polymères, amines et amides,

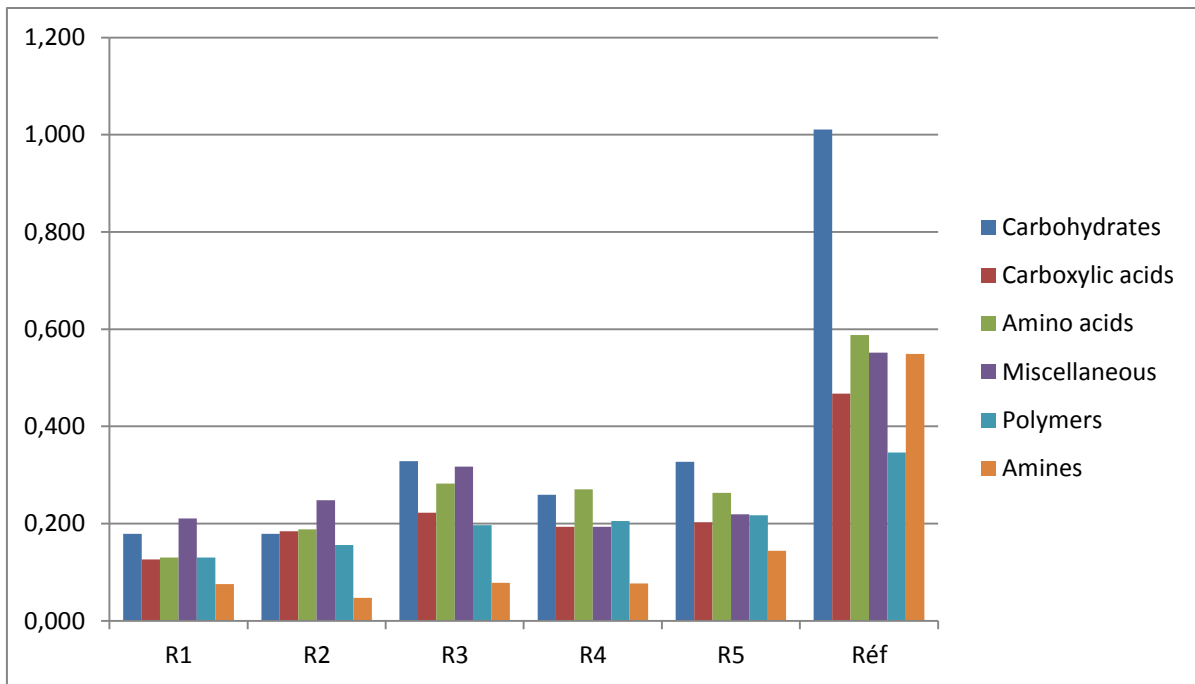
carbohydrates, acides organiques, acides aminés, et divers contenants notamment des alcools et des bases nucléiques (cf. Tableau 2 en annexe).

Les utilisations des substrats carbonés par les micro-organismes en fonction de la contamination des sols pour les données Biolog sont présentées dans la figure 35 à partir du développement coloré pour chaque substrat ou «*well colour development*» (WCD). Leur utilisation est très difficile à expliquer par le fait que les substrats entrent souvent dans plusieurs cycles métaboliques. A nos connaissances, aucune étude dans la littérature n'a tenté d'expliquer leur utilisation dans les sols contaminés. Cependant, des hypothèses ont été formulées pour nos données.



**Figure 35.** Evolution des valeurs de WCD en fonction du lieu des prélèvements.

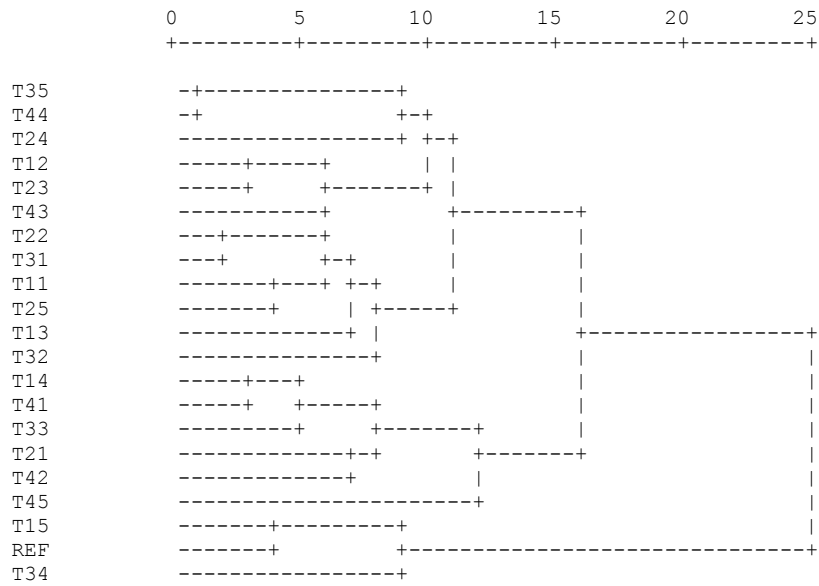
L'utilisation des six principaux substrats pour les données Biolog EcoPlaques permet de distinguer deux types de substrats (Figure 35). Le premier type composé des amines est caractérisé par l'utilisation très faible par les micro-organismes du sol. L'hypothèse formulée d'après ces résultats montre que ce composé est plus difficilement dégradé par ces micro-organismes. Le deuxième concerne les autres substrats qui sont sans doute adaptés aux micro-organismes du sol minier et sont plus facilement dégradables. Mais, en général, plus on s'éloigne de la mine, on remarque une augmentation très faible de l'utilisation des substrats par les micro-organismes du sol de la mine de fer (Figure 36).



**Figure 36.** Evolution des valeurs de WCD en fonction de la distance de la mine.

#### 2.2.5. Classification des sols suivant leur AWCD

La première analyse multivariée pratiquée est une classification hiérarchique des phénotypes bactériens en utilisant les distances euclidiennes. Cette technique permet d'obtenir des dendrogrammes compartimentant les sols en fonction des phénotypes des communautés bactériennes *i.e.* la valeur d'AWCD pour chaque substrat. Les résultats obtenus pour les prélèvements des sols sont présentés dans la figure 37. Le dendrogramme obtenu montre deux groupes mais non clairement séparés (distances euclidiennes très élevées). Les deux échantillons de sol (T.1.5 et Réf) ont présenté des profils microbiens liés ensemble à une distance euclidienne bas de 4 et ils sont reliés avec T.3.4 à distance euclidienne de 8,5. Cependant, ces échantillons de sol étaient différents des autres échantillons ayant des profils microbiens à une distance euclidienne considérablement plus élevée. Cette compartimentation en deux groupes distincts correspond, peut-être, à une séparation entre les sols plus ou moins contaminés. En effet, un premier groupe englobe presque tous les prélèvements sauf la Réf, T.1.5 et T.3.4. L'analyse des CLPP par classification ne révèle pas donc une diversité significative des profils métaboliques des micro-organismes en fonction de leur contamination. De nombreux auteurs ont utilisé cette méthode dans le cadre de l'étude de communautés microbiennes, à partir des données issues de microplaques Biolog® (Zak *et al.*, 1994; Xue *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2013 et Kenarova *et al.*, 2014). Néanmoins, un aspect défavorable dans l'analyse par classification est l'absence d'informations sur l'influence de la nature des substrats carbonés sur le processus de classification.



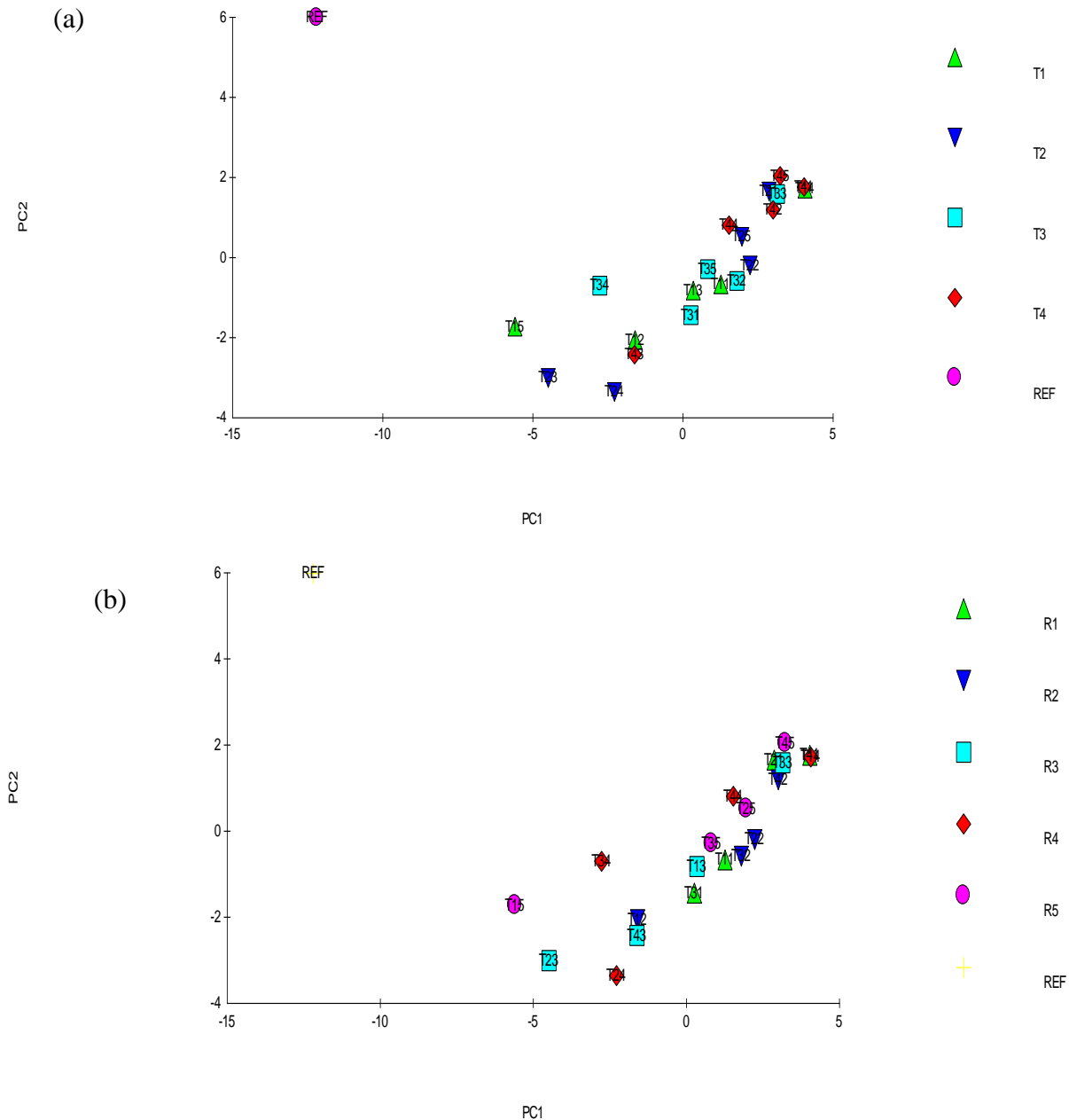
**Figure 37.** Classification hiérarchique des profils physiologiques des échantillons étudiés.

*2.2.6. Analyse en composante principale des CLPP*

L'application de l'ACP sur les mêmes données a été effectuée dans le but de pallier au manque d'information de l'analyse par classification. La figure 38 présente la carte factorielle en fonction des valeurs d'WCD de chacun des prélèvements. Les sols sont ordonnés en fonction de leur contamination. En effet, aucune séparation claire n'est visible entre les prélèvements du site d'Ait Ammar. Par contre l'échantillon non contaminé est séparé des autres échantillons du site minier.

Pour de plus amples détermination des communautés microbiennes dans les différents sols, les résultats du Biolog après 266,5 heures (AWCD) ont été soumis à l'ACP. Les résultats montrent une seule composante avec 97,02 % de la variation, inclus tous les échantillons de sol qui sont fortement corrélés et n'ont indiqué aucune différence dans les activités métaboliques des communautés microbiennes du sol en fonction de la distance de la mine (Tableau 31). L'ACP, en utilisant toutes les 31 sources de carbone à 163,5 heures, n'a pas révélée une séparation des échantillons du site, ce qui montre des capacités semblables d'utilisation potentiel du carbone et les communautés microbiennes sont comparables avec une faible différence pour l'échantillon non contaminé.





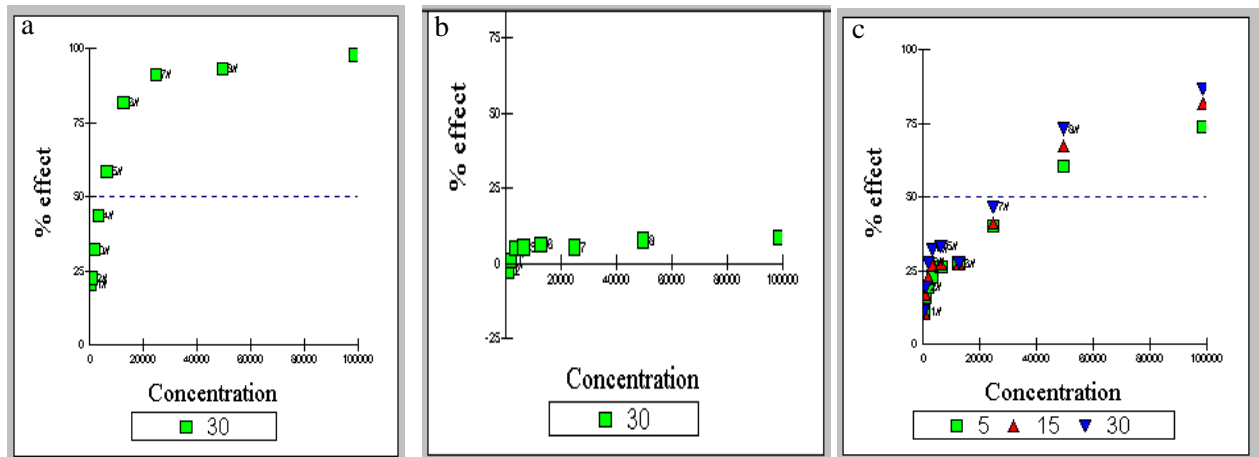
**Figure 38.** Carte factorielle de l'ACP des sols de la mine d'Ait Ammar en fonction des données WCD de chaque substrat des microplaques EcoPlaques à 163,5 heures d'incubation. a) par transept b) par ronde. (Primer 5)

**Tableau 31.** Variance totale et coefficient de saturation d'ACP des valeurs d'AWCD.

Composantes	Valeurs initiales propres			Les sommes carrés des extractions		
	Total	% de Variance	Cumule %	Total	% de Variance	Cumule %
1	20,374	97,020	97,020	97,374	97,020	97,020
2	0,352	1,678	98,698			
3	0,242	1,150	99,848			
4	0,015	0,073	99,921			
5	0,006	0,028	99,949			

### 2.3. Test de toxicité Microtox®

L'inhibition de la luminescence de la bactérie marine *Vibrio fischeri* est utilisée depuis de nombreuses années pour la mesure de la toxicité des composés chimiques et de diverses matrices environnementales (Blaise *et al.*, 1994). Les effets aigus sur la bactérie marine *V. fischeri* (inhibition de la bioluminescence) ont été mesurés chaque minute pendant 30 min (Figure 39).



**Figure 39.** Relations dose-réponse des surnageants des sols de quelques échantillons de la mine: a) T.4.3, b) T.4.4 et c) T.3.2 et l'émission de lumière de *V. fischeri* (MicrotoxOmni logiciel).

L'évaluation de l'écotoxicité peut fournir des informations raffinées sur les changements de la qualité du sol. Dans cette étude, le test Microtox® a été réalisé pour étudier les niveaux de toxicité du sol. Les résultats toxicologiques exprimés en  $CE_{50}$  (concentration efficace du sol provoquant 50 % d'inhibition de la bioluminescence de *V. fischeri*) sont présentés dans le tableau 32. L' $EC_{50}$  est un paramètre couramment utilisé pour l'évaluation comparative des résultats de toxicité. La détermination du seuil  $EC_{50}$  constitue l'une des valeurs les plus couramment utilisées pour les essais d'écotoxicité (Isnard *et al.*, 2001). Sur la base des valeurs de  $CE_{50}$ , le niveau de toxicité des échantillons analysés est négligeable ou non toxique pour tous les échantillons, sauf T.4.3 qui était faible.

Tous les résultats du  $CE_{50}$  étaient bien en dessous des limites supposées de la toxicité des sédiments (exprimée en unités de poids sec):  $1000 \text{ mg.L}^{-1}$  (*Canadian Standards in Environment Canada*, 2002) et  $750 \text{ mg.L}^{-1}$  (Casado-Martínez *et al.*, 2006). Les résultats indiquent que tous les sols testés ne présentaient aucune toxicité aiguë.

**Tableau 32.** Les résultats de toxicité selon le test de Microtox<sup>®</sup>.

Sols	EC <sub>50</sub> (%)	Score de Toxicité	Niveau de Toxicité
T.1.1	6,99	0	in <sup>b</sup>
T.1.2	nt <sup>a</sup>	-	-
T.1.3	2,13	0	in
T.1.4	nt	-	-
T.1.5	nt	-	-
T.2.1	713,9	0	in
T.2.2	18,21	0	in
T.2.3	nt	-	-
T.2.4	nt	-	-
T.2.5	20,37	0	in
T.3.1	nt	-	-
T.3.2	1,14	0	in
T.3.3	9,65	0	in
T.3.4	nt	-	-
T.3.5	nt	-	-
T.4.1	nt	-	-
T.4.2	nt	-	-
T.4.3	0,66	1	Faible
T.4.4	nt	-	-
T.4.5	128,8	0	in
REF	nt	-	-

<sup>a</sup> nt: non toxique; <sup>b</sup> in: insignifiant

### 3. Les métaux lourds, dans notre cas le Cd, Cr, Cu, Zn et Pb en présence du fer et du phosphore, ont-ils une influence sur la population bactérienne bioremédiatrice?

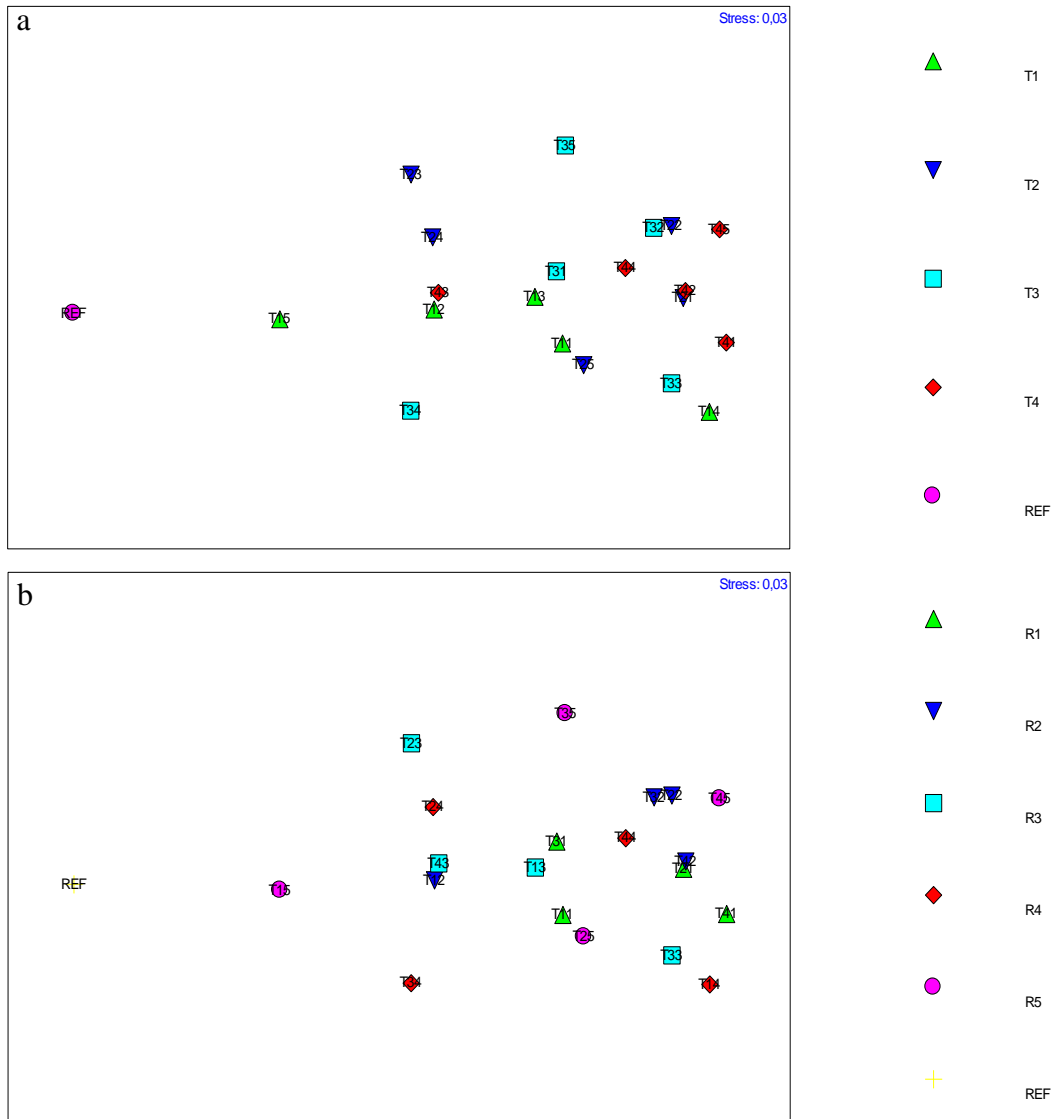
Ce volet de notre travail visait, par une approche moléculaire, à sonder la diversité structurale et métabolique des bactéries capables de survivre dans les sols contaminés et également de caractériser et identifier les bactéries capables de croître dans et/ou sur les racines des plantes sauvages du gisement de fer d'Ait Ammar.

Nos résultats montrent que la biomasse des bactéries des sols ne peut pas mettre en évidence de différences structurales ou fonctionnelles de nos communautés bactériennes par les analyses en «*finger print*» et l'analyse des profils physiologiques par plaques BIOLOG.

Une analyse de corrélation entre ces indices calculés à partir des profils métaboliques Biolog<sup>®</sup> et les caractéristiques physico-chimiques et minéralogiques (test de Spearman), a été déterminée. Cette analyse montre une corrélation négative significative ( $p\text{-value} < 0,05$ ;  $\rho = -0,468$ ,  $\rho = -0,481$ ) entre les graves et l'indice de Shannon et l'indice de richesse respectivement. De même, des corrélations positives significatives entre l'indice de régularité et l'argile + limon ( $p\text{-value} < 0,05$ ;  $\rho = 0,494$ ), entre l'activité totale et le pH<sub>KCl</sub> ( $p\text{-value} < 0,05$ ;  $\rho = 0,434$ ) et entre les niveaux de P biodisponible et l'activité totale ( $p\text{-value} < 0,05$ ;  $\rho = 0,453$ ) ont été obtenus.

Les tableaux 33 et 34 montrent les résultats des valeurs de R-global obtenues dans les différents tests d'ANOSIM des transepts et des rondes respectivement. Les résultats de ces tests confirment ceux des MDS (Figure 40): les caractéristiques fonctionnelles des bactéries des échantillons des transepts et des rondes sont identiques (R-global = 0,086,  $p = 16,2$  %) (R-global = 0,023,  $p = 34,8$  %), respectivement. De même, entre les différents points d'échantillonnage des sols il n'y pas de différence significative entre les transepts et les rondes ANOSIM 2 (test de Spearman;  $\rho = 0,034$ ,  $p = 36,6$  %,  $\rho = 0,121$ ,  $p = 18,6$  %, respectivement). Donc, selon les caractéristiques fonctionnelles des bactéries, la direction ou la distance par rapport au gisement de fer n'ont pas d'influence significative sur la population bactérienne du

sol. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par les caractéristiques structurales des bactéries des échantillons (Figure 31).



**Figure 40.** Analyse Multidimensionnelle non métrique (MDS) réalisée sur les résultats de Biolog (AWCD) obtenus à partir de 4 transects (T.1-T.4) avec 5 points chacun (1-5) et le sol de référence. a) par transect b) par ronde.

**Tableau 33.** Valeurs d'ANOSIM-R pour les différents échantillons du sol des transepts.

	<b>R-global</b>	<b>Niveau de signification %</b>
	<b>0,086</b>	<b>16,2</b>
<b>Groupes</b>	<b>R statistique</b>	<b>Niveau de signification %</b>
T.1, T.2	-0,072	63,5
T.1, T.3	-0,06	61,9
T.1, T.4	0,144	16,7
T.1, REF	0,8	16,7
T.2, T.3	-0,116	79,4
T.2, T.4	-0,048	51,6
T.2, REF	1,0	16,7
T.3, T.4	-0,028	55,6
T.3, REF	1,0	16,7
T.4, REF	1,0	16,7

**Tableau 34.** Valeurs d'ANOSIM-R pour les différents échantillons du sol des rondes.

	<b>R-global</b>	<b>Niveau de signification %</b>
	<b>0,023</b>	<b>34,8</b>
<b>Groupes</b>	<b>R statistique</b>	<b>Niveau de signification %</b>
R.1, R.2	-0,021	37,1
R.1, R.3	-0,01	45,7
R.1, R.4	-0,104	68,6
R.1, R.5	-0,052	51,4
R.1, REF	1,0	20,0
R.2, R.3	0,156	20,0
R.2, R.4	-0,021	34,3
R.2, R.5	-0,167	97,1
R.2, REF	1,0	20,0
R.3, R.4	-0,271	100,0
R.3, R.5	-0,115	68,6
R.3, REF	1,0	20,0
R.4, R.5	-0,313	100,0
R.4, REF	1,0	20,0
R.5, REF	0,75	20,0

#### 4. Discussion

##### 4.1. Diversité métabolique

L'analyse Biolog<sup>®</sup> permet d'évaluer la diversité fonctionnelle de la communauté microbienne du sol. Bien qu'elle soit relativement facile à utiliser, elle est reproductible et peut produire une grande quantité de données reflétant les caractéristiques métaboliques des communautés microbiennes de la rhizosphère (Zak et al., 1994; Grayston et al., 1998; Baudoin et al., 2001; Söderberg et al., 2004) et elle présente de plusieurs inconvénients. Seules quelques bactéries métaboliquement actives et cultivables peuvent être détectées, alors que les champignons du sol et les bactéries à croissance lente ne peuvent pas être évaluées

(Garland et Mills, 1991; Yao et *al.*, 2000). Les profils métaboliques obtenus par Biolog ne reflètent pas la diversité fonctionnelle réelle (Lindstrom et *al.*, 1998) et ne mesurent pas le potentiel fonctionnel des bactéries numériquement dominantes mais plutôt celui des bactéries à croissance rapide (Smalla et *al.*, 1998). La technique est sensible à la densité de l'inoculum (Garland, 1996) et peut ne pas refléter la diversité métabolique potentielle *in situ* (Garland et Mills, 1991). En outre, les sources de carbone et le pH du milieu dans les plaques Biolog<sup>®</sup> peuvent ne pas être représentatifs de celles présentes dans le sol (Yao et *al.*, 2000).

La plaque EcoPlaque de Biolog a été utilisée pour déterminer l'effet toxique des métaux sur le fonctionnement biologique du sol et contrôler son impact sur la phytoextraction (Epelde et *al.*, 2008). Comme il a déjà été montré dans des études précédentes, les capacités de dégradation potentielle de la communauté microbienne sont les plus souvent considérablement réduites dans des sols contaminés par les métaux lourds (Knight et *al.*, 1997; Kelly et Tate, 1998; Ellis et *al.*, 2001). La contamination des sols par des métaux lourds peut avoir un effet négatif sur l'activité et la fonction microbienne et diminue la respiration du sol et de la biomasse microbienne (Bååth, 1989). De nombreuses études ont montré que même de petites quantités de métaux lourds dans l'environnement ont des effets néfastes sur tous les organismes vivants et diminuent la décomposition de la litière et les cycles des éléments nutritifs par la suite dans l'ensemble de l'écosystème (Akmel et *al.*, 2005; Niklińska et *al.*, 2005; Li et *al.*, 2006; Zhu et *al.*, 2013).

Dans notre cas, En tant que sous-produit de 27 années d'activité minière, les sols entourant la mine de fer d'Ait Ammar sont contaminés par des métaux tels que le Fe, le Cu, le Zn, le Pb, le Cd et le Cr et du P. La pollution n'affecte pas significativement la diversité métabolique des bactéries, car en présence de plante, le nombre de substrats utilisés est plus élevé que sans plante ce qui suggère un effet stimulant de la plante probablement en raison des exsudats racinaires comme été rapporté par Heinonsalo et *al.* (2000) et Epelde et *al.* (2008). Nous avons aussi constaté que les indices de Shannon, de richesse et de régularité évoluent dans le même sens.

Néanmoins, la méthode Biolog<sup>®</sup> est utile dans l'étude de la diversité fonctionnelle d'une communauté microbienne et est un outil précieux, surtout lorsqu'elle est utilisée en conjonction avec d'autres méthodes.

#### 4.2. Etude de la toxicité aiguë

Le test de bioluminescence bactérienne a été considéré dans cette étude, car il s'agit d'une méthode rapide, robuste et très sensible. En outre, ce test a une application et une standardisation à des fins réglementaires (Volpi Ghirardini et *al.*, 2009). Il est préférable à d'autres techniques de dépistage des bactéries et il est l'un des tests les plus appropriés pour l'évaluation de la toxicité des sols et des sédiments (Doherty, 2001). Le test Microtox<sup>®</sup> «*Basic solid-phase Test (BSPT)*» est maintenant couramment utilisé pour évaluer la toxicité des sols ou des sédiments contaminés (Guerra et *al.*, 2007). Ce test a montré que, dans la plupart des cas, la réduction de la luminescence n'était pas significative (Tableau 32).

#### 4.3. Diversité structurelle

L'un des plus grands enjeux en écologie microbienne est de déterminer la diversité bactérienne ou la structure de la communauté bactérienne présente dans un environnement donné. Il est important de comprendre les changements qui peuvent survenir dans la diversité ou la structure d'une communauté au cours du temps ou sous l'influence d'une perturbation. Dans ce travail, nous avons étudié les variations de la communauté bactérienne en fonction de la distance de la mine et également en fonction de la direction, autrement dit en fonction de la contamination métallique.

L'analyse DGGE reflète la diversité génétique d'une communauté microbienne et possède plusieurs avantages. Un dépistage reproductible, rapide et fiable, ce qui permet d'analyser multiples échantillons (Nakatsu et *al.*, 2000). Il y a, cependant, quelques inconvénients associés à l'analyse DGGE, y compris l'effet de l'efficacité variable de l'extraction d'ADN sur les profils DGGE (Theron et Cloete, 2000), les similitudes dans les caractéristiques de mobilité du gel de polyacrylamide des fragments d'ADN de différentes séquences (Maarit-Niemi et *al.*, 2001) et de la dépendance des profils DGGE du type de sol à l'essai et le choix des amorces (Nakatsu et *al.*, 2000).

Konopka et *al.* (1999) ont signalé que la présence des métaux lourds diminuait la biomasse microbienne soit directement soit en inhibant certaines propriétés biochimiques du sol indispensables à leur survie. Cependant, l'action des métaux est souvent spécifique. Certains micro-organismes résistants peuvent survivre à un stress environnemental alors que d'autres plus sensibles disparaissent en présence de ce stress (Giller et *al.*, 1998). Ainsi, un certain nombre d'études n'ont pas mis en évidence la diminution de la biomasse microbienne en présence de métaux lourds (Knight et *al.*, 1997; Fritze et *al.*, 2000; Landi et *al.*, 2000). Par ailleurs, les communautés bactériennes peuvent être influencées par de nombreux autres facteurs environnementaux tels que le pH, la température, la teneur en nutriments et la nature des exsudats racinaires. Ainsi, des variations dans la biomasse bactérienne ne sont pas systématiquement et directement imputables à la présence du métal (Bååth et *al.*, 1998). Par exemple, si la contamination d'un sol affecte le développement des plantes, la réduction de la biomasse bactérienne observée n'est pas nécessairement due à un effet direct de la toxicité du métal sur les bactéries mais peut-être au manque de matière organique d'origine végétale (Konopka et *al.*, 1999). La biomasse microbienne augmente en effet en présence de plantes, les exsudats racinaires servant de source de carbone et d'énergie pour les micro-organismes du sol (Butenschoen et *al.*, 2008).

Dans cette étude, les sols contaminés échantillonnés autour de la mine de fer avaient été soumis à la pollution au cours d'une longue période de temps. Les changements dans la structure de la communauté microbienne autour de la mine de fer ne pouvaient pas montrer des réels changements dans les communautés de ces organismes microbiens du sol contaminés par le Fe, le P, le Cu, le Zn et le Cr. Aucun changement dans la diversité structurelle de la communauté microbienne n'a été trouvé. Les mêmes résultats ont été trouvés en utilisant les méthodes de Biolog<sup>®</sup> et Microtox<sup>®</sup>. Les changements dans la structure de la communauté bactérienne plus les effets environnementaux et les interactions écologiques ont des effets directs sur la diversité métabolique et l'activité biologique des sols (Zak et *al.*, 1994). Toutefois, cela n'est pas surprenant puisque durant les dernières décennies, les oxydes de Fe ont été utilisés dans le développement de nouvelles technologies d'assainissement en raison de leur caractère de sorption et de réactivité (Xu et *al.*, 2012). Les méthodes de traitement d'assainissement *in situ* en utilisant le Fe sont potentiellement rentables (Cundy et *al.*, 2008). Les oxydes de fer sont utilisés pour le retrait et la diminution des effets néfastes de certains métaux lourds tels que le Cr (Scherer et *al.*, 2000), le Pb, le Cu, le Cr et le Cd (Xu et *al.*, 2012).

Mamindy-Pajany et *al.* (2013) ont montré que l'hématite et le fer zéro-valent a permis de réduire le lessivage des métaux de 50 % et une diminution de la toxicité des sédiments marins pollués. Ces traitements «d'assainissements naturelles assistés» diminuent les concentrations des métaux dans les lixiviats des sols et de l'eau du sol et réduire la toxicité microbienne (Cundy et *al.*, 2008). Par conséquent, plusieurs technologies d'assainissement à base de fer sont encore en stade d'expérimentation et il est nécessaire de vérifier leur application effective sur le terrain à grande échelle (Cundy et *al.*, 2008). En plus que le Fe réduit la solubilité des métaux, les enrichissements en phosphate sont également efficaces dans la réduction phytodisponibilité de Pb et d'autres métaux. En outre, l'association avec la matière organique,

la substitution de  $Fe^{3+}$  avec d'autres ions et les défauts structurels notamment les nanoparticules d'oxyde de Fe naturel réduit la cristallinité des métaux et augmente la disponibilité microbienne (Braunschweig et *al.*, 2013). He et *al.* (2011) ont rapporté que l'analyse a révélé que l'ajout de nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer pourrait stimuler une croissance bactérienne et changer la structure de la communauté bactérienne du sol, bien que l'abondance des bactéries ne change pas. Par conséquent, le fonctionnement normal d'une communauté microbienne dans les sols autour de la mine de fer n'aurait pas été affaibli. Cependant, il est possible d'acquérir la tolérance aux métaux lourds dans l'environnement parce que les gènes contrôlant la résistance aux métaux sont présents dans les plasmides de la plupart des organismes.

En outre, il a été démontré que les bactéries rhizosphériques et endophytes ont le potentiel pour éliminer les contaminants du sol par l'amélioration de la phytoremédiation et peuvent jouer un rôle dans la fertilité des sols par solubilisation du phosphate et de la fixation d'azote (Ryan et *al.*, 2008). Il y a un intérêt croissant pour le développement des applications biotechnologiques potentielles d'endophytes pour améliorer la phytoremédiation et la production durable des cultures non alimentaires et la production de biocarburants.

## 5. Conclusion

Dans cette partie de notre travail, nous n'avons pas observé des effets des différents métaux et du phosphore de sols sur la population bactérienne. La structure de la communauté bactérienne n'a pas été significativement affectée par les métaux lourds. L'analyse PCR-DGGE des gènes 16S ADNr a montré qu'il n'y avait pas de différences significatives dans la structure de la communauté microbienne entre les échantillons du sol. De même, pour l'approche basée sur l'étude des variations de la diversité fonctionnelle des populations bactériennes a montré qu'il n'y avait pas de différences significatives dans l'utilisation des substrats par la communauté microbienne des échantillons du sol. L'analyse des similitudes (ANOSIM) des profils DGGE et l'analyse en composantes principales (ACP) des données Biolog ont montré que ni la direction, ni la distance à partir de la mine n'ont pas d'affection significative sur la diversité fonctionnelle et structurelle de la communauté bactérienne du sol. En effet, la toxicité des métaux dans les sols fortement contaminés par le Fe et le P n'a aucune incidence sur la quantité des populations microbiennes et aucun changement significatif dans la diversité microbienne des sols contaminés.

Les méthodes PCR-DGGE et BIOLOG<sup>®</sup> peuvent fournir des informations plus détaillées sur l'évolution et la diversité dans la structure et le fonctionnement de la communauté microbienne dans l'environnement du sol.

Pourtant, des questions subsistent quant à la capacité pour les métaux de modéliser les communautés microbiennes dans les sols et l'uniformité de leurs réponses au stress métallique à travers les types de sols. Dans cette étude, le site de référence non affecté, a soutenu une communauté bactérienne presque similaire à celle du site minier du point de vue de l'activité et de la biomasse.



## **IV. Isolement et identification des bactéries tolérantes (rhizoplanes et endophytes): rôle possible dans la bioremédiation**

### **1. Contexte et objectifs**

Pour aller plus en avant dans la description de l'écosystème microbien, il est nécessaire d'identifier précisément les micro-organismes présents. Différentes techniques sont disponibles (amplification PCR puis clonage/séquençage, pyroséquençage, etc.). On peut choisir de s'intéresser uniquement aux séquences d'ADNr 16S, afin d'avoir la carte d'identité moléculaire des espèces suffisante pour identifier les micro-organismes. A partir de ces données, des arbres phylogénétiques peuvent ensuite être construits afin de classer les micro-organismes selon la parenté évolutive de leurs séquences de 16S.

Diverses méthodes génétiques sont, actuellement, utilisées pour identifier et classer les bactéries endophytes et rhizoplanes. Chacune permet une classification phylogénétique à un niveau précis allant du genre, espèce, sous-espèce et biovar jusqu'à la souche spécifique. Cependant, chaque méthode a ses avantages et ses inconvénients qui se manifestent au niveau de la résolution. Ainsi, une panoplie d'analyse moléculaire des acides nucléiques (ADN et ARN) permet d'évaluer les similarités et les dissemblances entre les bactéries isolées, à des degrés phylogénétiques différents (Vandamme et *al.*, 1996). La recombinaison de plusieurs techniques permet de révéler à la fois des divergences au niveau des gènes bactériens considérés auparavant comme homogènes, et des relations taxonomiques entre des groupes très éloignés.

Au cours de ce travail, nous avons utilisé une stratégie pour comparer simultanément les caractéristiques structurales basées sur les séquences d'un grand nombre d'échantillons de la communauté bactérienne. ERIC-PCR ou BOX-PCR ont été utilisées pour déterminer les empreintes génétiques de la communauté bactérienne développée dans les échantillons analysés. L'objectif de notre travail est l'isolement et l'identification des bactéries endophytes et rhizoplanes à partir des racines des plantes sauvages poussées dans la zone étudiée. Les étapes suivies pour effectuer ce travail sont:

1. Extraction de l'ADN à partir de l'ensemble de la communauté bactérienne,
2. Amplification et séquençage des séquences d'ADNr des bactéries,
3. Analyse et comparaison des ADN séquencés pour l'identification phylogénétique des micro-organismes,
4. Vérification si la diversité microbienne révélée par analyse de l'ADN est représentative de la communauté microbienne à l'origine échantillonnée.

**Les résultats acquis et présentés ci-dessous sont également valorisés dans un article en préparation pour soumissionner à un Journal international.**

### **2. Approches d'études des bactéries rhizoplanes et endophytes**

#### **2.1. Les approches phénotypiques**

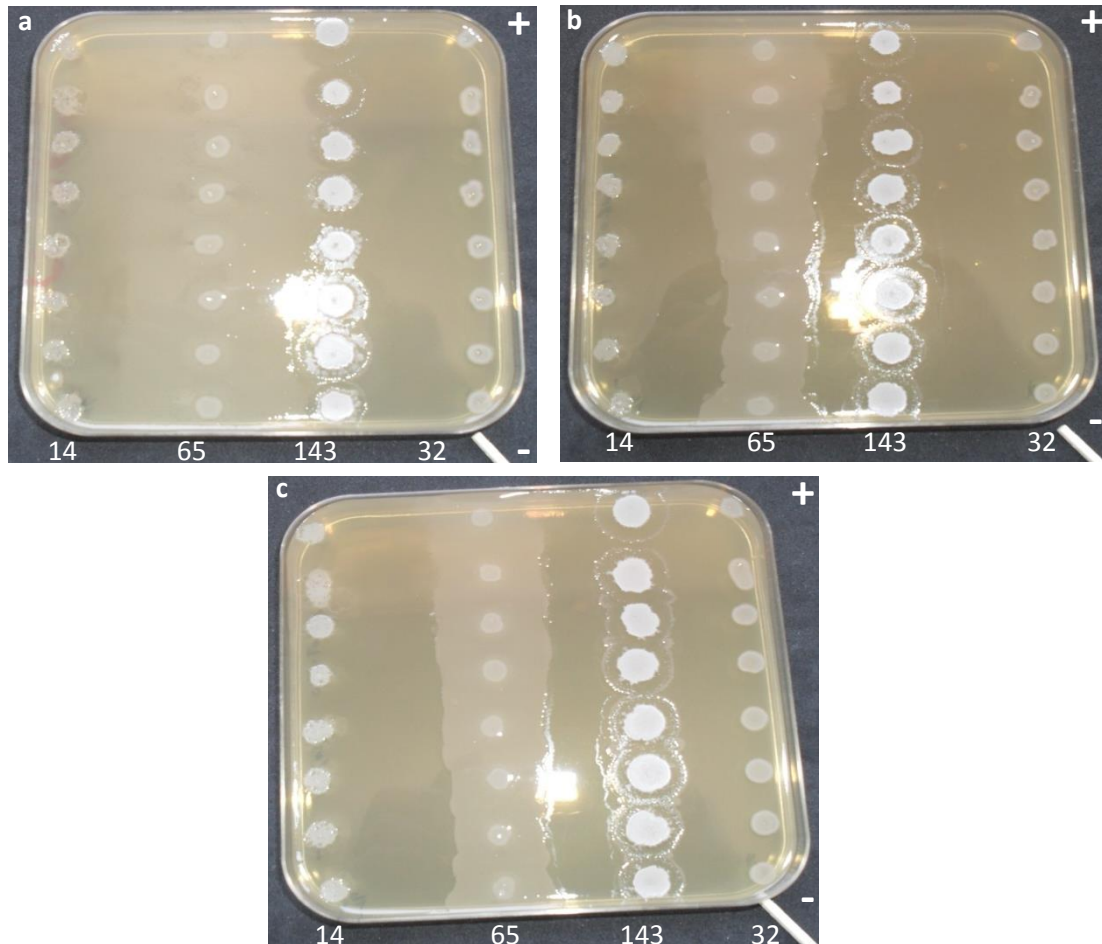
La caractérisation phénotypique traditionnelle est toujours admise comme étape primordiale pour l'identification et la séparation des bactéries nouvellement isolées. Par ailleurs, elle a été beaucoup exploitée chez les bactéries endophytes associatives pour la séparation des espèces (Baldani et Baldani, 2005).

Dans cette étude, nous nous intéressons essentiellement de vérifier si les souches isolées sont capables de résister à des concentrations deux fois plus élevées aux concentrations totales, les plus élevées des échantillons du sol (Annexe), des métaux lourds les plus dangereux (Cd, Cr et Cu) parmi les sept éléments analysés précédemment.

### 2.1.1. Résistance intrinsèque aux métaux lourds

La toxicité des métaux lourds dépend de leur concentration dans le sol, de leur nature, de la présence d'autres métaux et du type d'organisme qu'ils affectent. La sélection de souches résistantes aux métaux lourds serait d'une importance capitale pour l'inoculation au champ.

Les résultats obtenus au cours de ce travail montrent que toutes les bactéries endophytes et rhizoplanes associatives d'*Eryngium ilicifolium* Lam et d'*Eryngium triquetrum* Vahl ont une grande résistance aux métaux lourds testés (Figure 41).



**Figure 41.** Photos montrant la croissance de certaines bactéries en présence des métaux lourds. a: Cd, b: Cr, c: Cu, + : concentration élevé et - : concentration faible

## 2.2. Les approches moléculaires

### 2.2.1. La PCR des séquences répétées

Une nouvelle technique plus pointue et performante a vu le jour grâce aux travaux de nombreux auteurs qui ont découvert des familles de séquences inter-géniques (De Bruijn, 1992). Ces familles contiennent, en plusieurs copies dans le génome de la plupart des bactéries gram- et quelques gram+, des séquences répétées inter-géniques courtes et hautement conservées dans l'espèce (Luspki et Weinstok, 1992). Trois familles des séquences répétées ont été identifiées et largement étudiées, comprenant la séquence répétée extra-génétique palindromique (REP) de 35 à 40pb, la séquence inter-génique répétée consensus (ERIC) de 124 à 127pb, et l'élément Box de 154pb contenant trois unités: BoxA, BoxB et BoxC (Versalovic 1991; 1994).

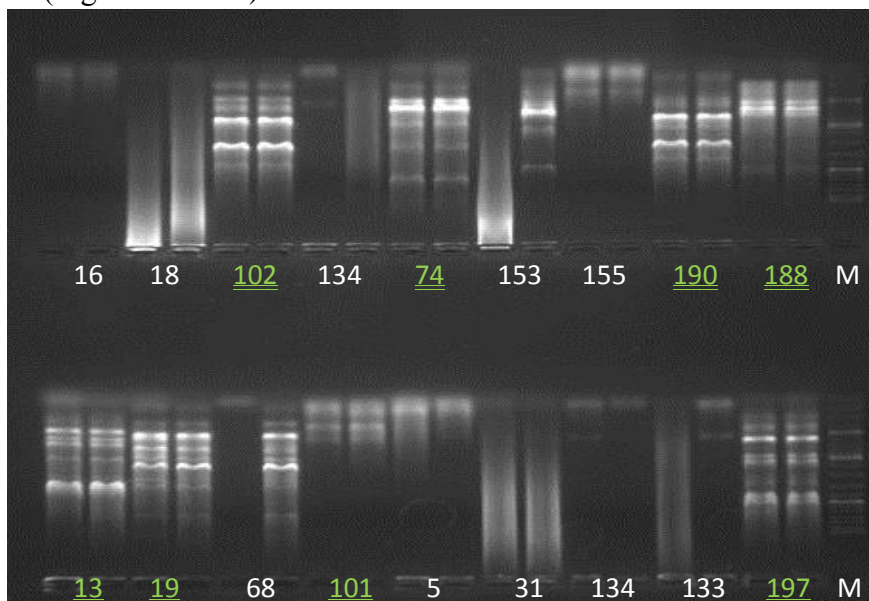
Les produits de l'ERIC-PCR utilisant l'ADN comme matrice et des amorces spécifiques montrent, après migration sur gel d'agarose, des bandes très caractéristiques (De Bruijn, 1992). Depuis, ces PCR sont considérés comme des méthodes efficaces pour établir des

empreintes génétiques des bactéries. Du fait que ces séquences sont hautement conservées chez les *Rhizobiaceae*, leur amplification est utilisée pour le typage et la phylogénie des rhizobiums (De Bruijn 1992).

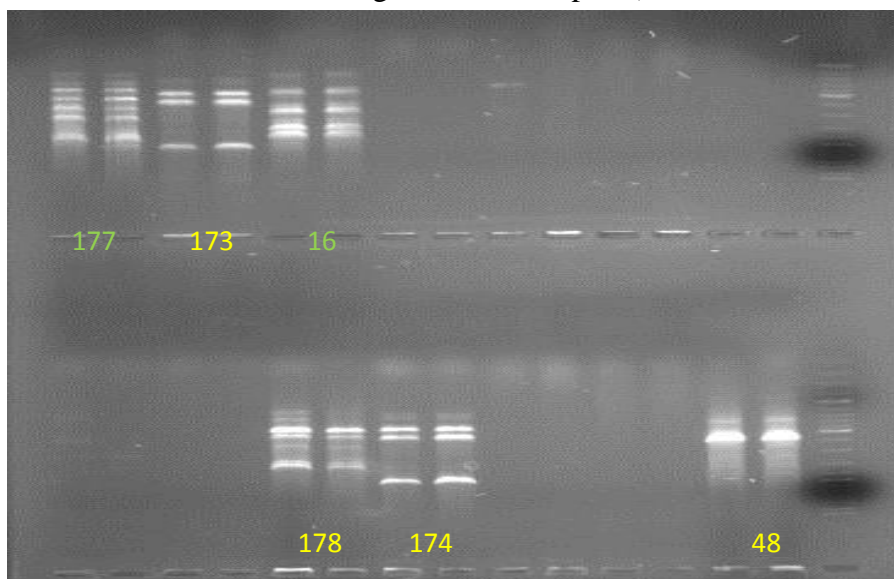
### 2.2.2. Diversité génétique des isolats endophytes et rhizoplanes via ERIC-PCR et BOX-PCR

Afin d'évaluer leur diversité génétique, 73 isolats ont fait l'objet d'une caractérisation moléculaire par ERIC-PCR. L'amplification de l'ADN génomique a été positive pour 58 isolats racinaires, tandis que les autres souches (15 isolats) ont été amplifiées par BOX-PCR.

L'amplification des séquences répétitives de l'ADN utilisant les amorces spécifiques ERIC 1R, ERIC 2R et BOX A1R, a abouti à l'obtention des bandes d'ADN distinctes dont la taille est variable au sein du même groupe de souches et entre les groupes de différentes origines. Nous avons constaté, en outre, une grande variation dans le nombre de bandes de l'ADN amplifié (Figure 42 et 43).

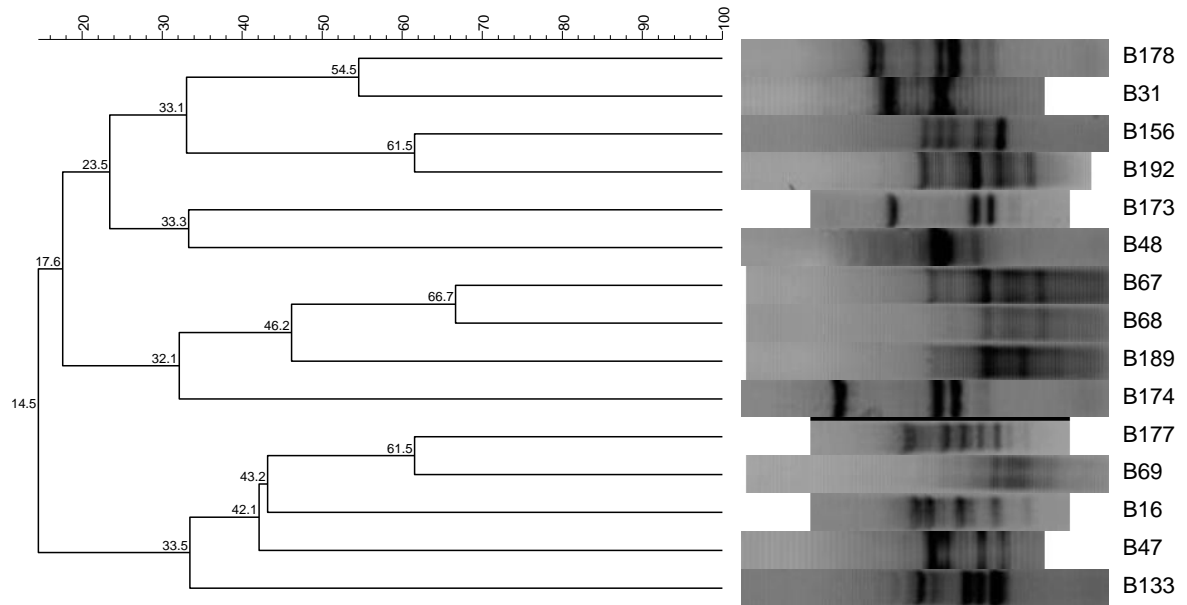


**Figure 42.** Empreinte génomique ERIC-PCR de certains isolats racinaires. (Les OTUs soulignées sont acceptées)



**Figure 43.** Empreinte génomique BOX-PCR de certains isolats racinaires.

Par ailleurs, l'analyse des empreintes génomiques BOX-PCR et ERIC-PCR par la méthode UPGMA a permis l'obtention des regroupements des OTUs d'*Eryngium ilicifolium* Lam et d'*Eryngium triquetrum* Vahl en fonction de leur niveau de similarité. Le dendrogramme de regroupement des souches bactériennes a révélé une large diversité intra et intergroupes (Figure 44 et 45).



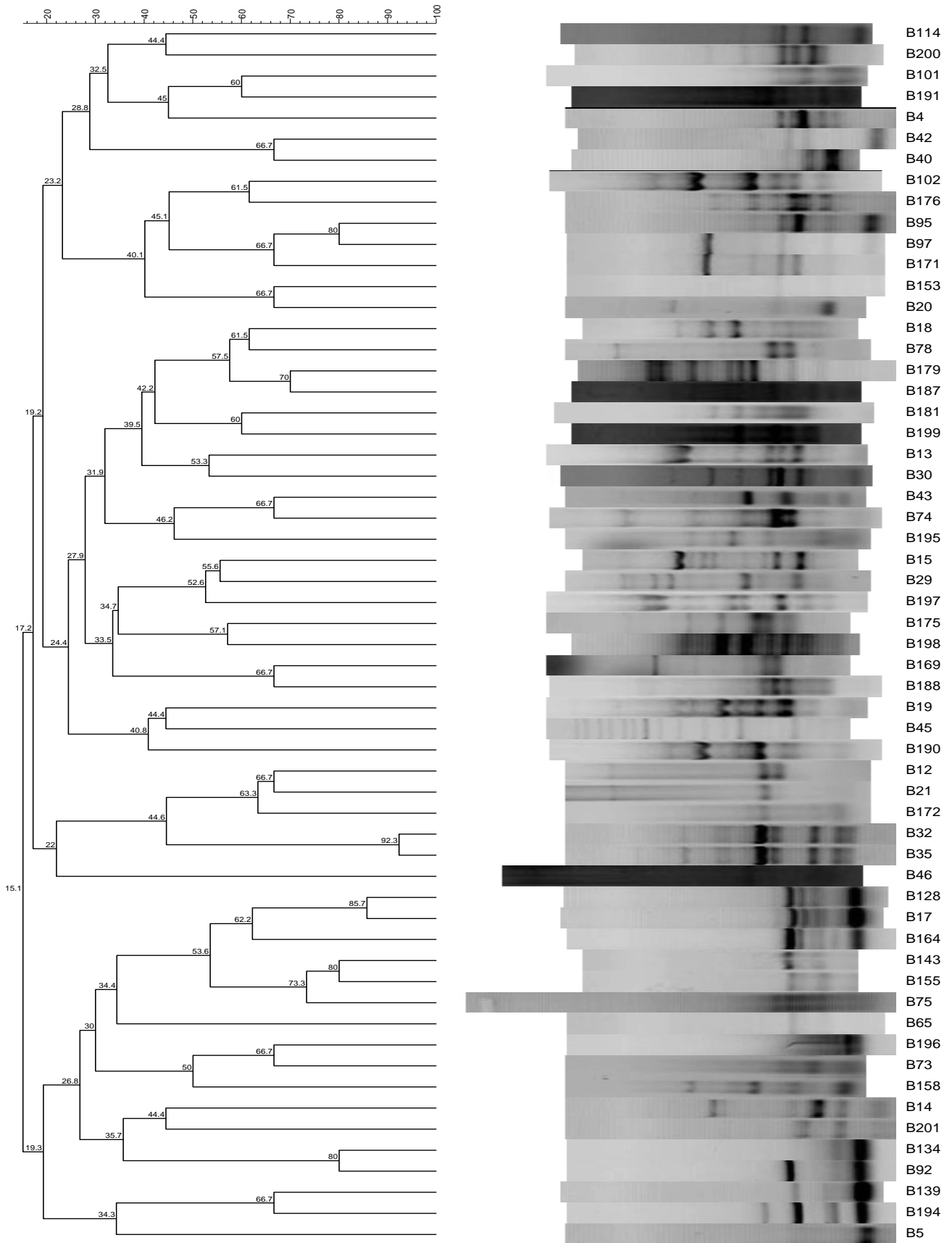
**Figure 44.** Dendrogramme de classification des souches d'*Eryngium ilicifolium* Lam et d'*Eryngium triquetrum* Vahl obtenu à partir des empreintes génétiques BOX.

Toutes les 71 isolats bactériens (coefficient de similarité  $\leq 80\%$ ) ont été considérés pour le séquençage du gène ARNr 16S. Les isolats bactériens ont été identifiés par l'amplification du gène l'ADNr 16S par l'utilisation des amorces D1f et D1r.

#### 3.2.4. Identification des espèces bactériennes par séquençage

Les différents micro-organismes isolés au cours de nos travaux ont été identifiés par des méthodes moléculaires. L'identification des espèces procaryotes est réalisée à partir de l'amplification de la région 16S de l'ADNr utilisant les amorces universelles D1f et D1r, parce que, la région D1/D2 étant plus informative pour la distinction des espèces au sein d'un même genre (Kurtzman et Robnett, 1998). Un avantage majeur lié à l'utilisation de l'ADNr 16S est la possibilité d'utiliser les autres séquences disponibles dans des bases de données bioinformatiques telles que Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>), EMBL Nucleotide Sequence Database (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>).

Nos échantillons bactériens sont maintenant en étape de séquençage dans un laboratoire au Portugal.



**Figure 45.** Dendrogramme de classification des souches d'*Eryngium ilicifolium* Lam et d'*Eryngium triquetrum* Vahl obtenu à partir des empreintes génétiques ERIC.

### 3. Conclusion

Pour caractériser les communautés bactériennes rhizoplantes et endophytes, nous avons développé dans cette partie de travail, différentes approches et/ou marqueurs: typage 16S ADN puis séquençage des OTUs. La démarche couplant le typage et le séquençage des OTUs, fut la plus satisfaisante car elle nous a permis d'arriver quasiment à l'unité taxonomique élémentaire: l'espèce, mais cette démarche est lourde à mettre en œuvre. Dans ce travail, nous avons cherché à isoler et caractériser des communautés bactériennes rhizoplantes et endophytes à partir des plantes natives qui poussent dans le site étudié (*Eryngium ilicifolium* Lam. et *Eryngium triquetrum* Vahl.), puis à identifier ces communautés bactériennes en utilisant des techniques moléculaires tels que ERIC-PCR, BOX-PCR, 16 S PCR et séquençage, sans tenir compte de l'abondance relative de chaque taxa. Notre choix a été de travailler à l'échelle des communautés, une échelle écologique adaptée au cas des bactéries, car chez ces organismes la notion d'espèce reste difficile à manipuler. La technique de typage que nous avons utilisée, avec le marqueur 16S ADNr. Néanmoins, il serait intéressant d'attribuer à nos séquences une identité spécifique sur la base de leur similarité, afin de déterminer si les changements des communautés qui ont lieu dans des groupes phylogénétiques précis et mieux comprendre la relation entre la structure de ces communautés et la contamination.

# Conclusions Générales & Perspectives

## I. CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Si l'activité minière est indispensable pour le développement économique des sociétés, elle a aussi des conséquences sur l'environnement. Cette activité minière est à la base de la production des minerais sur lesquels le développement technologique s'appuie, en particulier de nos jours pour les composés électroniques. Cependant, les activités minières s'accompagnent inévitablement de la production de déchets riches en éléments métalliques potentiellement toxiques (EPTs) et dont le stockage se fait, en général, à proximité des exploitations.

Dans le cadre de cette étude, l'extraction du Fe de l'ancienne mine d'Ait Ammar dans la région d'Oued Zem, fut productrice d'un matériau contaminé en divers éléments chimiques dont le Zinc (Zn), le cuivre (Cu), le chrome (Cr), le cadmium (Cd) et le plomb (Pb). Ce site est l'exemple type d'un site où une réhabilitation n'a pas été opérée. Dans ce cadre, l'objectif de notre travail de thèse était d'évaluer une possibilité de revalorisation de ce site par des plantes et des bactéries, en étudiant la capacité d'adaptation de ces êtres vivants sur ces sols.

Dans la première partie de notre travail, nous nous sommes intéressés à une caractérisation physico-chimique et minéralogique des sols étudiés. Les concentrations des métaux (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb et Zn) et du phosphore dans 20 échantillons du sol prélevés autour de cette ancienne mine de fer ont été déterminées par plasma spectrométrie d'émission atomique à couplage inductif (ICP- AES). Les résultats ont montré des concentrations très élevées pour le Fe ( $43,55 \cdot 10^4 \text{ mg kg}^{-1}$ ), le P ( $0,92 \cdot 10^4 \text{ mg kg}^{-1}$ ), le Cr ( $222,16 \text{ mg kg}^{-1}$ ) et le Zn ( $153,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ). De même, les résultats obtenus ont montré un pH relativement élevé ( $\text{pH}_{\text{KCl}} = 6,13$ ,  $\text{pH}_{\text{eau}} = 7,41$ ), une teneur élevée en carbone organique (2,93 %). Cependant, le niveau d'azote est faible (0,06 %) et donc un rapport C/N élevé. Les gammes des valeurs des concentrations en éléments traces extractibles dans le 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  sont de 0,13 à 0,15 mg Cd  $\text{kg}^{-1}$ , de 0,04 à 3,70 mg Cu  $\text{kg}^{-1}$ , de 0,02 à 0,56 mg Fe  $\text{kg}^{-1}$ , de 0,37 à 1,05 mg Zn  $\text{kg}^{-1}$  et de 0,02 à 2,48 mg P  $\text{kg}^{-1}$ .

Selon ces résultats, nous avons donc un sol contaminé en Fe, en P et en Cr. Les teneurs des autres éléments métalliques (Zn, Pb, Cu et Pb) montrent une contamination polymétallique, ce qui peut avoir des effets néfastes sur l'environnement. Les concentrations de métaux du sol étaient très hétérogènes entre les échantillons du site, probablement en raison de la nature de l'exploitation minière (l'extraction minière, le stockage, la dispersion mécanique, la présence des terrains surchargés, le degré d'érosion des minéraux, etc.). Dans ces échantillons du sol, les métaux et le phosphore sont fortement liés au sol et sont donc très peu mobiles. Les résultats ont montré des conséquences renforçant mutuellement que le Fe dans le sol a été corrélé avec le Zn, le P, le Cr et le Cu, ce qui implique que certaines interactions et/ou des relations d'affinité existaient entre ces éléments. Cependant, le Zn a une part mobilisable plus importante que les autres métaux. Par conséquent, le Zn présente un grand risque que les autres métaux lors d'une libération suite à des modifications des conditions physico-chimiques environnantes, car cette part mobilisable peut alors migrer et infecter la santé humaine et également les animaux herbivores. La connaissance du niveau de contamination par les métaux lourds tels que le Cd, le Cr, le Zn, le Pb et le Cu et les effets des propriétés du sol est essentiel pour fournir une base précise pour la protection supplémentaire, l'assainissement et la réduction des impacts négatifs de ces contaminations métalliques.

D'après l'analyse en composantes principales (ACP), les résultats indiquent également que le Zn, le P, le Cr, le Cu et le Fe proviennent de la même source géogénique d'où les fortes corrélations et interrelations entre ces éléments. Les analyses du positionnement multidimensionnel (MDS) montrent que pour les échantillons contaminés, ni la direction ni la distance par rapport de la mine de fer ne possède une influence significative sur les caractéristiques physico-chimiques ou minéralogiques.



Dans la deuxième partie, des plantes indigènes et spontanées (appartenant à 12 espèces) ont été analysées pour étudier l'accumulation de Cd, Cr, Cu, Zn, Pb, Fe et P dans les parties aériennes et dans les racines. Les différentes espèces collectées présentent des grandes différences de l'accumulation des métaux dans les pousses et les racines. Pour les 12 espèces étudiées, *Echinops spinosus* L apparaît comme le plus grand accumulateur du Cd, Cu, Zn (0,989, 29,190 et 175,347 mg.kg<sup>-1</sup>, respectivement). Par contre l'espèce *Cladanthus arabicus* (L) cass est le plus grand accumulateur du Cr (9,241 mg.kg<sup>-1</sup>). Enfin, l'espèce *Leontodon hispidulus* (Delile) Boiss est le plus grand accumulateur du Pb, Fe et P (5,952, 1522,839 et 4612,795 mg.kg<sup>-1</sup>, respectivement). D'autre part, le facteur de bioconcentration (FBC) le plus élevé a été enregistré pour *E. spinosus* L pour le Zn (1,68). De même, le facteur le plus élevé de transfert sol-plante (FT) du Cd était 1,24 (*Stipa Capensis* pousse), du Cr était de 2,01 (*C. arabicus* (L) cass.), du Cu était 8,40 (*Carthamus lanatus* L), du Zn était de 2,52 (*E. spinosus* L), du Pb était 7,00 (*Eryngium ilicifolium* Lam), du P était 537.72 (*E. ilicifolium* Lam) et du Fe était de 0,52 (*L. hispidulus* (Delile) Boiss). Donc, *E. spinosus* L. a montré la plus grande capacité de la phytoextraction du Zn et les autres espèces poussent bien dans le sol contaminé et absorbent des concentrations faibles des métaux sont donc des bons candidats pour la phytostabilisation. D'après ces résultats, nous proposons cette espèce pour la phytoextraction du Zn, en raison de son efficacité pour éliminer ce métal. Cependant, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes précis par lesquels *E. spinosus* L. extrait le zinc à partir du sol.

Toutefois, l'implantation de telles cultures de plantes nécessite de se soucier du devenir des polluants, tant en terme de dispersion de la matière végétale face aux aléas climatiques qu'en terme de traitement de la matière végétale récoltée. En effet, il est nécessaire d'introduire des filières prenant en charge la matière végétale produite et les polluants qui leur sont associés, par exemple une valorisation des métaux après calcination de la matière végétale.

Finalement, les résultats acquis tout au long de ce travail enrichissent la connaissance de tolérance et/ou résistance des plantes capables de se développer sur des sols pollués par les ETM et s'intègrent dans la conception et le développement de nouveaux moyens de préservation biologique de notre environnement. En effet, le concept de phytoremédiation est une alternative très intéressante aux techniques physico-chimiques de dépollution des sols, souvent coûteuses et agressives vis-à-vis de l'écosystème. La phytoextraction est basée sur la capacité de certaines plantes à extraire et accumuler de grandes quantités d'ETM dans leurs parties aériennes.

Cependant les espèces hyperaccumulatrices sont rares et leur capacité d'extraction des ETM souvent limitée par une faible croissance (plante herbacée), ce qui présente un risque de réenrichissement des sols en ETM si les plantes ne sont pas récoltées et renouvelées. Ainsi, d'autres plantes peuvent compenser une capacité d'accumulation plus faible par une production de biomasse plus importante. Dans cette approche, des végétaux ligneux présentant une croissance rapide et un système racinaire étendu et profond (arbre) peuvent constituer un intérêt appliqué majeur puisqu'ils peuvent être utilisés pour diminuer les teneurs en ETM de leur substrat, stabiliser les sols, limiter leur érosion et prévenir de la propagation des ETM dans l'environnement (phytostabilisation). Les arbres peuvent en effet agir comme des réservoirs à long terme pour les polluants en les conservant dans leurs tissus les plus vivaces, en particulier le bois et les écorces, parties pérennes constituées essentiellement de biomasse pariétale à forte capacité d'échange cationique. Dans ce contexte, il pourrait être envisagé d'élaborer un projet pilote de phytostabilisation en région, où des terrains contaminés impropres à d'autres usages seraient stabilisés à long terme, grâce à une couverture végétale appropriée (préalablement sélectionnée) à rôle mécanique (diminution de

la dispersion et de la biodisponibilité des ETM) et écologique (restauration d'une certaine biodiversité).

En se basant sur ce même principe, une autre voie de valorisation des matériaux ligneux est envisageable; les écorces constituent en effet un matériel très intéressant à exploiter. Ce matériel est formé par une biomasse végétale essentiellement pariétale à formations secondaires riches en composés phénoliques qui accroissent les possibilités de rétention des ETM.

Notre travail dans la troisième partie a consisté à développer de nouvelles stratégies pour tenter d'accéder à des populations récalcitrantes du fait de leurs faibles effectifs, de propriétés écologiques ou physiologiques caractérisées par une localisation dans des microenvironnements protégés. Ces stratégies ont été basées sur deux approches distinctes mais qui sont complémentaires pour en maximiser l'efficacité.

La première approche était basée sur l'étude des variations de la diversité structurelle des populations bactériennes indigènes dans des sols contaminés par le fer, le phosphore et d'autres métaux lourds. La structure de la communauté bactérienne n'a pas été significativement affectée par les métaux lourds. L'analyse PCR-DGGE des gènes 16S ADNr a montré qu'il n'y avait pas de différences significatives dans la structure de la communauté microbienne entre les échantillons du sol. De même, pour la deuxième approche basée sur l'étude des variations de la diversité fonctionnelle des populations bactériennes a montré qu'il n'y avait pas de différences significatives dans l'utilisation des substrats par la communauté microbienne des échantillons du sol. L'analyse des similitudes (ANOSIM) des profils DGGE et l'analyse en composantes principales (ACP) des données Biolog ont montré que ni la direction, ni la distance à partir de la mine n'ont pas d'affection significative sur la diversité fonctionnelle et structurelle de la communauté bactérienne du sol. En effet, la toxicité des métaux dans les sols fortement contaminés par le Fe et le P n'a aucune incidence sur la quantité des populations microbiennes et aucun changement significatif dans la diversité microbienne des sols contaminés.

En plus, notre étude révèle que le Cr, le Cu, le Pb, le Zn et le Cd en présence du Fe et du P n'ont pas d'impacts négatifs sur la diversité structurelle et fonctionnelle des communautés bactériennes. Les résultats obtenus suggèrent donc que l'utilisation de la diversité microbienne structurelle et fonctionnelle pour étudier les effets des métaux lourds dans le sol peut être difficile en raison de fortes influences d'autres facteurs environnementaux.

Ainsi, nos études n'ont pas mis en évidence la diminution de la biomasse microbienne en présence de métaux lourds. Par ailleurs, les communautés bactériennes peuvent être influencées par de nombreux autres facteurs environnementaux tels que le pH, la température, la teneur en nutriments et la nature des exsudats racinaires.... Ainsi, des variations dans la biomasse bactérienne ne sont pas systématiquement et directement imputables à la présence de métal. Par exemple, si la contamination d'un sol affecte le développement des plantes, la réduction de la biomasse bactérienne observée n'est pas nécessairement due à un effet direct de la toxicité du métal sur les bactéries mais peut-être au manque de matière organique d'origine végétale.

La diversité fonctionnelle des micro-organismes est donc un prérequis pour une bonne qualité globale du sol, mais aussi pour permettre une certaine «tolérance» du sol envers des facteurs de stress. Pour estimer la qualité biologique d'un sol, il n'est pas donc utile d'établir une liste exhaustive des espèces présentes mais plutôt de chercher à identifier et quantifier des communautés pertinentes en termes de fonction dans le sol.

En ce qui concerne la caractérisation des communautés bactériennes rhizoplanes et endophytes, nous avons développé dans ce travail, différentes approches et/ou marqueurs: typage 16S ADNr, puis séquençage des OTUs. La démarche couplant le typage et le séquençage des OTUs, fut la plus satisfaisante car elle nous a permis d'arriver quasiment à

l'unité taxonomique élémentaire: l'espèce, mais cette démarche est lourde à mettre en œuvre. Nous avons cherché à isoler et caractériser des communautés bactériennes rhizoplantes et endophytes à partir des plantes qui poussent dans le site étudié (*Eryngium ilicifolium* Lam. et *Eryngium triquetrum* Vahl.), puis à identifier ces communautés bactériennes en utilisant des techniques moléculaires tels que ERIC-PCR, BOX-PCR, 16 S PCR et séquençage. Notre choix a été de travailler à l'échelle des communautés, une échelle écologique adaptée au cas des bactéries, car chez ces organismes la notion d'espèce reste difficile à manipuler. Néanmoins, il serait intéressant d'attribuer à nos séquences une identité spécifique sur la base de leur similarité afin de déterminer si les changements des communautés qui ont lieu dans des groupes phylogénétiques précis et de mieux comprendre la relation entre la structure de ces communautés et la contamination. Le marqueur que nous avons utilisé couvre des aspects différents de la diversité bactérienne: diversité taxonomique d'un vaste domaine, défini au niveau phylogénétique et non plus au plan fonctionnel pour l'ADNr 16S.

En conclusion, les résultats obtenus ont permis de mettre en place un schéma général pour la remédiation des sites contaminés. Dans une stratégie de gestion d'un site contaminé et de son éventuelle remédiation, la première étape est d'évaluer la contamination initiale: importance, localisation, type et impacts pour des organismes cibles ainsi que les relations sources-expositions. Ensuite, il faut définir des objectifs de remédiation, lister les options applicables c'est à dire évaluer les techniques compatibles avec la contamination mais aussi avec le temps imparti pour la remédiation et l'usage futur du site (industriel, agricole, urbain ...). Pour la viabilité économique du site et de la remédiation, il ne faut pas négliger de potentielles retombées financières, comme le recyclage de déchets industriels en tant qu'amendement ou l'utilisation de plantes avec un intérêt économique comme des plantes de fourrage, les plantes contenant des huiles essentielles ou permettant de produire des biocarburants. En fonction de la technique de remédiation il faudra choisir les amendements et les espèces végétales adéquates.

## II. PERSPECTIVES

Afin de répondre en partie à certaines interrogations toujours présentes à l'issue de ce travail, un certain nombre de travaux complémentaires nous paraissent essentiels à réaliser:

- Suivre au cours du temps les paramètres physico-chimiques des sols (pH, teneurs en matières organiques...) et la mobilité des ETM;
- Surveiller le transfert des ETM vers la profondeur et vers les plantes, ce qui permettrait d'évaluer les risques de contamination des eaux souterraines et des herbivores;
- Réaliser des expériences, soit en conditions contrôlées *ex situ* avec de jeunes arbres, soit en implantant des plots monospécifiques *in situ*. Ces études permettraient de mieux évaluer l'influence de chaque espèce et d'orienter le choix vers les espèces végétales les plus appropriées pour la phytostabilisation des sols contaminés ;
- Utiliser de nouvelles approches moléculaires comme la PCR en temps réel ou les techniques ciblant l'ARN pourraient nous apporter des renseignements sur la succession des modifications fonctionnelles des communautés bactériennes. Une étude moléculaire, utilisant des amorces spécifiques ciblant les groupes bactériens connus comme phytostimulant, devrait également être mise en œuvre;
- Comprendre les adaptations métaboliques des *E. spinosus*;
- Etudier l'impact des métaux sur la croissance et le métabolisme des céréales qui poussent autour de la mine et leur entrée la chaîne alimentaire;
- Exploiter le potentiel hyperaccumulateur (plantes ou bactéries) comme ressource génétique riche pour développer des plantes phytoextractrices à forte biomasse;
- Envisager des techniques pour détecter bactéries dégradant les métaux lourds *in situ* par une approche FISH (hybridation *in situ* par une sonde fluorescente) ou par qPCR en fonction des

conditions environnementales: changements de température au cours des saisons..., un tel suivi permettait de mieux comprendre le système de traitement des sols contaminés et d'améliorer l'efficacité du traitement par bioremédiation;

- Explorer la diversité fonctionnelle des communautés bactériennes afin de compléter les analyses sur la diversité de ces communautés. Des techniques telles que la construction de banques métagénomiques ou encore la technique des puces à ADN nous apportent ces informations. En effet, ces techniques permettent d'analyser la diversité des communautés sur la base d'une batterie de gènes «fonctionnels» dont l'expression renseigne sur les voies métaboliques en action. D'autres méthodes qui ne sont pas basées sur la biologie moléculaire existent également pour étudier la diversité fonctionnelle d'une communauté microbienne. La SIP (*Stable Isotope Probing*) permet de visualiser l'absorption de certains substrats par les micro-organismes. Dans le même principe, l'utilisation de fluorochromes spécifiques de certains substrats permettent de mesurer leur absorption par les micro-organismes.

# Références bibliographiques

- Aboudrar W., Schwartz C., Benizri E., Morel J.L. and Boularbah A. 2007. Soil Microbial Diversity as Affected by the Rhizosphere of the Hyperaccumulator *Thlaspi Caerulescens* Under Natural Conditions. *Int. J. Phytorem.*, 9:41-52.
- Adriano D.C. 1986. Trace elements in the terrestrial environment. In *Trace elements in the environment New York, Springer Verlag, pp:106-155.*
- Adriano D.C. 2001. Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. 2<sup>nd</sup> Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg.
- Adriano D.C., Wenzel W.W., Vangronsveld J. and Bolan N.S. 2004. Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. *Geoderma*, vol. 122 (2-4): 121-142.
- Agricola G. 1556. De Re Metallica Traduction d'Albert France-Lanord, Gérard Klopp (Ed.), Thionville, 1987.
- Akkajit P. and Tongcumpou C. 2010. Fractionation of metals in cadmium contaminated soil: Relation and effect on bioavailable cadmium. *Geoderma*, 156:126-132.
- Akmal M., Jianming X., Zhaojun L., Haizhen W. and Huaiying Y. 2005. Effects of lead and cadmium nitrate on biomass and substrate utilization pattern of soil microbial communities. *Chemosphere*, 60:508-514.
- Alloway B.J. 1990. Heavy Metals in Soils, Alloway John Wiley and Sons, New York.
- Alloway B.J. 1995 Soil processes and the behaviour of metals In Heavy metals in soils. *Black Academic and Professional*, 368p.
- AL-Oud S.S. and Helal M.I.D. 2003. Immobilization of Pb in polluted soils using natural and synthetic chemical additives Proceedings of NGWA Conference on Remediation: Site Closure and the total Cost of Cleanup. pp: 207-213. November 13-14, 2003 New Orleans, Louisiana, USA.
- Alvarenga P., Gonçalves A.P., Fernandes R.M., de Varennes A., Vallini G., Duarte E. and Cunha-Queda A.C. 2009. Organic residues as immobilizing agents in aided phytostabilization: (I) Effects on soil chemical characteristics. *Chemosphere*, 74:1292-1300.
- Antonovics J., Bradshaw A.D. and Turner R.G. 1971. Heavy metal tolerance in plants. *Adv. Ecol. Res.*, 7:1-85.
- Aravind R., Kumar A., Eapen S.J. and Ramana K.V. 2008. Endophytic bacterial flora in root and stem tissues of black pepper (*Piper nigrum*) genotype: Isolation, identification and evaluation against *Phytophthora capsici*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 48:58-64.
- Arshad M. 2009. Phytoextraction du plomb par les Pélargoniums odorants: Interactions sol-plante et mise en place d'outils pour en comprendre l'hyperaccumulation. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, 200 p.
- Ash H.J., Gemmill R.P. and Bradshaw A.D. 1994. The introduction of native plant species on industrial waste heaps: a test of immigration and other factors affecting primary succession. *J. Appl. Ecol.* 31:74-84.
- Aschby M.N., Rine J., Mongodin E.F., Nelson K.E. and Dimster-Denk D. 2007. Serial analyses of rRNA genes and the unexpected dominance of rare members of microbial communities *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 4532-4542.
- Assadian N.W. and Fenn L.B. 2001. Rhizosphere chemical changes enhance heavy metal absorption by plants growing in calcareous soils. In: *Trace elements in the rhizosphere*. Ed Prasad MNV, CRC Press, 43-60.
- Assink J.W. and Van den Brink W.J. 1986. Contaminated soil, In: J.W. Assink and W.J. Van den Brink (Eds.), 1<sup>st</sup> Int. TNO Conf. on contaminated soil, Martinus, Nijhoff, Dordrecht, Utrecht, The Netherlands.
- Azur Environmental 1995. Microtox<sup>®</sup> Acute Toxicity Solid Phase Test and Acute Toxicity Basic Test Procedures. Azur Environmental, Carlsbad, CA.
- Atallah T., Darwish T. and Ward R. 2000. La sericulture de la côte nord du Liban: entre tradition et intensification. *Cah. Agric.*, 9: 135-139.
- Bååth E. 1989. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations. *Water Air Soil Pollut.*, 47: 335-379.
- Bååth E., Díaz-Raviña M., Frostegård Å. and Campbell C.D. 1998. Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Appl. Envir. Microbiol.*, 64, 238-245.
- Baize D. 1997. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). INRA Editions, Paris, 408p
- Baker A.J.M. and Brooks R.R. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements-a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*. 1:81-126.
- Baker A.L.M. 1981. Accumulators and excluders-Strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutr.* 3:643-654.
- Baldani J.I. and Baldani V.L.D. 2005. History on the biological nitrogen fixation research graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *An. Acad. Brass. Sci.*, 77:549-579.
- Barker A.V. and Pilbeam D.J. 2007. Handbook of Plant Nutrition. CRC Press, Boca Raton, Florida: 613 p.
- Barkay T. and Schaefer J. 2001. Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. *Cur. Opinion Microbiol.*, 4:318-323.
- Basta N.T. and Sloan J.J. 1999. Bioavailability of heavy metals in strongly acidic soils treated with exceptional quality biosolids. *J. Environ. Qual.*, 28:633-638.

- Battaglia-Brunet F., D'hugues P., Cabral T., Cezac P., Garci J.L. and Morin D. 1998. The mutual effect of mixed thiobacilli and leptospirilli populations on pyrite bioleaching. *Mineral. Eng.*, 11:195-205.
- Baudoin E., Benizri E. and Guckert A. 2001. Metabolic fingerprint of microbial communities from distinct maize rhizosphere compartments. *Eur. J. Soil Biol.*, 37: 85-93.
- Baumeister W. 1954. Über den Einfluss des Zinks bei *Silene inflata* Smith I. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 67: 205-213.
- Beckett P.H.T. 1989. The use of extractants in studies on trace metals in soils, sewage sludges, and sludge-treated soils. In: Stewart, B.A. (Ed.). *Advances in soil science*, Vol. 9, Springer-Verlag, New York, pp. 143-176.
- Bellouti A., Cherkaoui F., Benhida M., Debbarh A., Soudi B. and Badraoui M. 2002. Mise en place d'un système de suivi et de surveillance de la qualité des eaux souterraines et des sols dans le périmètre irrigué du Tadla, au Maroc. *Actes de l'atelier du PCSI*, 28-29 mai 2002, Montpellier, France. CEMAGREF, CIRAD, IRD, Cédérom du CIRAD.
- Benavides M.P., Gallego S.M. and Tomaro M.L. 2005. Cadmium toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.*, 17: 21-34.
- Bennisse R., Labat M., ElAsli A., Brhada F., Chandad F., Lorquin J., Liegbott P.P., Hibti M. and Qatibi A. 2004. Rhizosphere bacterial populations of metallophyte plants in heavy metals-contaminated soils from mining areas in semiarid climate. *World j. microb. Biot.*, 20:759-766.
- Bert V., Bonnin I., Saumitou-Laprade P., de Laguérie P. and Petit D. 2002. Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallicolous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than those from metallicolous populations? *New Phytol.*, 155: 47-57.
- Berti W.R. and Cunningham S.D. 2000. Phytostabilization of metals. In I Raskin, BD Ensley (Eds.), *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment*: 71-88. John Wiley & Sons, Inc.: NY.
- Bizily S.P., Rugh C.L., Summers A.O. and Meagher R.B. 1999. Phytoremediation of methylmercury pollution: *merB* expression in *Arabidopsis thaliana* confers resistance to organomercurials. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96:6808-6813.
- Bizoux J.P., Daïnou K., Raspé O., Lutts S. and Mahy G. 2008. Fitness and genetic variation of *Viola calaminaria*, an endemic metallophyte: implications of population structure and history. *Plant Biol.*, 10:684-93.
- Blaise C., Forghani R., Legault R., Guzzo J. and Dubow M.S. 1994. A bacteria toxicity assay performed with microplates, microluminometry and Microtox reagent. *Biotechniques*, 16:932-937.
- Blanchard C. 2000. Caractérisation de la mobilisation potentielle des polluants inorganiques dans les sols pollués. Thèse: Ecole Doctorale de Chimie de Lyon.
- Bochner B.R. 1989. Sleuthing out bacterial identities. *Nature*, 339: 157-158.
- Boon M. and Heijnen J.J. 1998. Chemical oxidation kinetics of pyrite in bioleaching processes. *Hydrometallurgy*, 48: 27-41.
- Boon M., Snijder M., Hansford G.S. and Heijnen J.J. 1998. The oxidation kinetics of zinc sulphide with *Thiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 48:171-186.
- Boopathy R. 2000. Bioremediation of explosives contaminated soils. *Int Biodeter Biodeg.* 46: 29-36.
- Boularbah A., Schwartz C., Bitton G. and Morel J.L. 2006. Heavy metal contamination from mining sites in South Morocco: 1. Use of a biotest to assess metal toxicity of tailings and soils. *Chemosphere*, 63: 802-810.
- Boyd R.S. and Martens S.N. 1992. The raison d'être for metal hyperaccumulation by plants. In A.J.M. Boyd R.S., Martens S.N. 1994 Nickel hyperaccumulation by *Thlaspi montanum* var. *montanum* is acutely toxic to an insect herbivore. *Oikos* 70: 21-25.
- Bradshaw A.D. 1952. Populations of *Agrostis tenuis* resistant to lead and zinc poisoning. *Nature*, 169: 1098
- Braun V. and Killmann H. 1999. Bacterial solutions to the iron supply problem. *Trends Biochem. Sci.*, 24:104-109.
- Braunschweig J., Bosch J. and Meckenstock R.U. 2013. Iron Oxide Nanoparticles in Geomicrobiology: From Biogeochemistry to Bioremediation, *New Biotechnol.*, 30:793-802.
- Brooks R.R., 1998. Biogeochemistry and hyperaccumulators. In: Brooks R.R. (Ed.). *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 95-118.
- Bruckert S. and Rouiller J. 1994. Mécanismes de régulation du pH des sols. In: Bonneau M. & Souchier B. (ed) *Pédologie 2 : Constituants et propriétés du sol*. Masson, Paris, 511-524.
- Burak D.L., Fontes M.P.F., Santos N.T., Soares Monteiro L.V., de Sousa Martins E. and Becquer T. 2010. Geochemistry and spatial distribution of heavy metals in Oxisols in a mineralized region of the Brazilian Central Plateau. *Geoderma*, 160: 131-142.
- Burgos P., Madejon E., Pérez-de-Mora A. and Cabrera F. 2008. Horizontal and vertical variability of soil properties in a trace element contaminated area. *Int. J. Appl. Earth Obs. Geoinf.*, 10:11-25.

- Butenschoen O., Marhan S. and Scheu S. 2008. Response of soil microorganisms and endogeic earthworms to cutting of grassland plants in a laboratory experiment. *Appl. Soil Ecol.*, 38:152-160.
- Calmano W., Hong J. and Forstner U. 1993. Binding and mobilization of heavy metals in contaminated sediments affected by pH and redox potential. *Water Sci. Technol.*, 28:223-235.
- Cao X., Ma L.Q., Rhue D.R. and Appel C.S. 2004. Mechanisms of lead, copper, and zinc retention by phosphate rock. *Environ. Pollut.*, 131 :435-444.
- Cao R.X., Ma L.Q., Chen M., Singh S.P. and Harris W.G. 2003. Phosphate-induced metal immobilization in a contaminated site. *Environ. Pollut.*, 122:19-28.
- Casado-Martínez M.C., Campisi T., Díaz A., Lo Re R., Obispo R., Postma J.F., Riba I., Sneekes A.C., Buceta J.L. and DelValls T.A. 2006. Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. II. Bioluminescence inhibition test for rapid sediment toxicity assessment. *Cienc. Mar.*, 32:129-138.
- Cawthorn D.M., Botha S. and Witthuhn R.C. 2008. Evaluation of different methods for the detection and identification of *Enterobacter sakazakii* isolated from South African infant formula milks and the processing environment. *Int. J. Food Microbiol.*, 127:129-138.
- Chaignon V. 2001. Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées. Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides. Thèse : Ecole doctorale, Sciences de l'Environnement: Système Terre, Université d'Aix-Marseille.
- Chaney R.L., Angle R.S., Baker A.J.M. and Li Y.M. 1998. United States Patent 5711784.
- Chehregani A., Noori M. and Yazdi H.L. 2009. Phytoremediation of heavy-metal-polluted soils: Screening for new accumulator plants in Angouran mine (Iran) and evaluation of removal ability. *Ecotox. Environ. Safe.*, 72:1349-1353.
- Chen A., Komives E.A. and Schroeder J.I. 2006. An improved grafting technique for mature *Arabidopsis* plants demonstrates long-distance shoot-to-root transport of phytochelatin in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 141:108-120.
- Chen S.B., Zhua Y.G. and Ma Y.B. 2006. The effect of grain size of rock phosphate amendment on metal immobilization in contaminated soils. *J. Hazard. Mater.*, B134:74-79.
- Cheng C.J., Lin T.H., Chen C.P., Juang K.W. and Lee D.Y. 2009. The effectiveness of ferrous iron and sodium dithionite for decreasing resin-extractable Cr(VI) in Cr(VI)-spiked alkaline soils. *J. Hazard. Mater.*, 164:510-516.
- Chlopecka A. and Adriano D.C. 1996. Mimicked in-situ stabilization of metals in a cropped soil: bioavailability and chemical form of zinc. *Environ. Sci. Technol.*, 30:3294-3303.
- Chrestensen C.A., Starke D.W. and Mieval J.J. 2000. Acute cadmium exposure inactivates thioltransferase (glutaredoxin), inhibits intracellular reduction of protein-glutathionyl-mixed disulfides, and initiates apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 275:26556-26565.
- Clarke K.R. and Gorley R.N. 2001. PRIMER v5: User manual/tutorial. PRIMER-E, Plymouth, UK, 91 pp.
- Clarke K.R. and Warwick R.M. 2001. Change in marine communities: an approach to statistical analyses and interpretation, 2<sup>nd</sup> edn. PRIMER-E, Plymouth.
- Clarke K.R. 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Aust. J. Ecol.*, 18:117-143.
- Clemens S. 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88:1707-1719, Clubs Crin, 1999 Spéciation des métaux dans le sol. Ecrin (Ed).
- Clemens S., Palmgren M.G. and Kramer U. 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Plant Sci.*, 7: 309-315.
- Cobbett C.S. 2000. Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.*, 123:825-832.
- Conesa H.M. and Faz Á. 2011. Metal Uptake by Spontaneous Vegetation in Acidic Mine Tailings from a Semiarid Area in South Spain: Implications for Revegetation and Land Management. *Water Air Soil Poll.*, 215:221-227.
- Costa D., Freitas H. and Sousa J.P. 2013. Influence of seasons and land-use practices on soil microbial activity and metabolic diversity in the "Montado ecosystem". *Eur. J. Soil Biol.*, 59:22-30.
- Cui Y., Wang Q., Dong Y., Li H. and Christie P. 2004. Enhanced uptake of soil Pb and Zn by Indian mustard and winter wheat following combined soil application of elemental sulphur and EDTA. *Plant Soil*, 261:181-188.
- Cundy A.B, Hopkinson L. and Whitby R.L.D. 2008. Use of iron-based technologies in contaminated land and groundwater remediation: a review. *Sci. Total Environ.* 400:42-51.
- Cunningham C.J. and Philip J.C. 2000. Comparison of bioaugmentation biostimulation in ex situ treatment of diesel contaminated soil. *Land Contam. Reclam.*, 8:261-269.
- Curl E.A. and Truelove B. 1986. The rhizosphere. *Springer-Verlag*, 288 pp.



- Cycoń M., Markowicz A. and Piotrowska-Seget Z. 2013. Structural and functional diversity of bacterial community in soil treated with the herbicide napropamide estimated by the DGGE, CLPP and r/K-strategy approaches. *Appl. Soil Ecol.*, 72: 242–250.
- Dassonville F. and Renault P. 2002. Interactions between microbial process and geochemical transformations under anaerobic conditions: a review. *Agronomie*, 22: 51-68.
- Davis M.A., Pritchard S.G., Boyd R.S. and Prior S.A. 2001. Developmental and induced responses of nickel-based and organic defences of the nickel-hyperaccumulating shrub, *Psychotria douarrei*. *New Phytol.*, 150: 49-58.
- De Bruijn J.F. 1992. Use of repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus) Sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2180-2187.
- Deicke M., Bellenger J.P. and Wichard T. 2013. Direct quantification of bacterial molybdenum and iron metallophores with ultra-high-performance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. *J. Chrom., A* 1298: 50-60.
- Delmas-Gadras C. 2000. Influence des conditions physico-chimiques sur la mobilité du plomb et du zinc dans un sol et un sédiment en domaine routier. Thèse : Université de Pau et des pays de l'Adour, U.F.R. Sciences.
- Deneux-Mustin S., Roussel-Debet S., Mustin C., Henner P., Munier-Lamy C., Colle C., Berthelin J., Garnier-Laplace J. and Leyval C. 2003. Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces: influence des micro-organismes du sol. *TEC & DOC*, Paris.
- Deng D.M., Deng J.C., Li J.T., Zhang J., Hu M., Lin Z. and Liao B. 2008. Accumulation of zinc, cadmium, and lead in four populations of *Sedum alfredii* growing on lead/zinc mine spoils. *J. Integr. Plant Bio.*, 50:691-698.
- Dewhirst F.E., Shen Z., Scimeca M.S., Stokes L.N., Boumenna T., Chen T., Paster B.J. and Fox J.G 2005. Discordant 16S and 23S rRNA Gene Phylogenies for the Genus *Helicobacter*: Implications for Phylogenetic Inference and Systematics. *J. Bacteriol.*, 187:6106-6118.
- Dewis J. and Freitas F. 1984. Méthodes d'analyse physique et chimique des sols et des eaux. *Bulletin Pédologique de la FAO*, 10: 275.
- Dias A.C.F, Costa F.E.C., Andreote F.D., Lacava P.T., Teixeira M.A., Assumpção L.C., Araujo W.L., Azevedo J.L. and Melo I.S. 2009. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25:189-95.
- Díez Lázaro J., Kidd P.S. and Monterroso Martínez C. 2006. A phytogeochemical study of the Trás-os-Montes region (NE Portugal): Possible species for plant-based soil remediation technologies. *Sci. Total Environ.*, 354: 265-277.
- Djondo M.Y. 1995. Propriétés d'échange ionique des sols ferrallitiques argileux de la vallée du Niari et sableux du Plateau de Mbe-Batéké au Congo. Application à la correction de leur acidité. Thèse de Doctorat, ORSTOM, Centre de Montpellier.
- Doherty F.G. 2001. A Review of the Microtox® Toxicity Test System for Assessing the Toxicity of Sediments and Soils. *Water Qual. Res. J. Canada*, 36: 475-518.
- Dorigo U., Volatier L. and Humbert J.F. 2005. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Res.*, 39: 2207-2218.
- Dougherty M.J. and Downs D.M. 2006. A connection between iron-sulfur cluster metabolism and the biosynthesis of 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine pyrophosphate in *Salmonella enterica*. *Microbiol.-Sgm* 152:2345-2353.
- Duchaufour P.H. 1995. Pédologie: sol, végétation, environnement. Masson, Paris, Milan, Barcelone.
- Dudka S., Piotrowska M., Chlopecka A. and Witek T. 1995. Trace metal contamination of soils and crop plants by the mining and smelting industry in Upper Silesia, South Poland. *J. Geochem. Explor.*, 5:237-250.
- Economou-Eliopoulos M., Megremi I. and Vasilatos C. 2011. Factors controlling the heterogeneous distribution of Cr(VI) in soil, plants and groundwater: Evidence from the Assopos basin, Greece. *Chem. Erde Geochem.*, 71:39-52.
- Ehrlich H.L. 2001. Geomicrobiology. Marcel Dekker Inc. New York.
- Eichert T., Kurtz A., Steiner U. and Goldbach H. 2008. Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. *Physiol. Plantarum*, 134: 151-160.
- Eichert T. and Burkhardt J. 2001. Quantification of stomatal uptake of ionic solutes using a new model system. *J. Exp. Bot.*, 52: 771-781.
- El Hamiani O., El Khalil H., Lounate K., Sirguy C., Hafidi M., Bitton G., Schwartz C. and Boularbah A. 2010. Toxicity assessment of garden soils in the vicinity of mining areas in Southern Morocco. *J. Hazard. Mater.*, 177:755-761.
- Ellis R.J., Morgan P., Weightman A.J. and Fry J.C. 2003. Cultivation-Dependent and -Independent Approaches for Determining Bacterial Diversity in Heavy-Metal-Contaminated Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3223-3230.

- Ellis R.J., Neish B., Trett M.W., George B.J., Weightman A.J., Morgan P. and Fry J.C. 2001. Comparison of microbial and meiofaunal community analyses for determining impact of heavy metal contamination. *J. Microbiol. Methods*, 45:171-185.
- Environment Canada, 2002. Biological Test Method: Reference Method for Determining the Toxicity of Sediment Using Luminescent Bacteria in a Solid-phase Test. EPS 1/RM/42.
- Epelde L., Martín-Sánchez I., González-Oreja J.A., Anza M., Gómez-Sagasti M.T. and Garbisu C. 2012. Impact of sources of environmental degradation on microbial community dynamics in non-polluted and metal-polluted soils. *Sci. Total Environ.*, 433: 264-272.
- Epelde L., Becerril J.M., Hernandez-Allica J., Barrutia O. and Garbisu C. 2008. Functional diversity as indicator of the recovery of soil health derived from *Thlaspi caerulescens* growth and metal phytoextraction. *Appl. Soil Ecol.*, 39:299-310.
- Erhart H. 1956. La genèse des sols en tant que phénomène géologique. Masson, Paris 90 p.
- Eze P.N., Udeigwe T.K. and Stietiya M.H. 2010. Distribution and potential source evaluation of heavy metals in prominent soils of Accra Plains, Ghana. *Geoderma*, 156:357-362.
- Falissard B. 1996. Comprendre et utiliser les statistiques dans les sciences du vivant, Masson eds, pp. 314, Paris.
- FAOUN (Food and Agriculture Organization of the United Nations) 1984. Physical and chemical methods of soil and water analysis, Soils Bulletin, 10, pp. 1-275.
- Faure H. 1952. Reconnaissance géologique des formations sédimentaires post-paléozoïques du Niger Oriental, Thèse Paris.
- Forchetti G., Masciarelli O., Alemanno S., Alvarez D. and Abdala G. 2007. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): Isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76:1145-1152.
- Fox G.E., Pechman K.R. and Woese Carl R. 1977. Comparative Cataloging of 16S Ribosomal Ribonucleic Acid: Molecular Approach to Prokaryotic Systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 27: 44-57.
- Fritioff A. and Greger M. 2006. Uptake and distribution of Zn, Cu, Cd, and Pb in an aquatic plant *Potamogeton natans*. *Chemosphere*, 63: 220-227.
- Fritze H., Perkiömäki J., Saarela U., Katainen R., Tikka P., Yrjälä K., Karp M., Haimi J. and Romantschuk M. 2000. Effect of Cd-containing wood ash on the microflora of coniferous forest humus. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 32:43-51.
- Fulton J.R., Holland A.W., Fox D.J. and Bergman R.G. 2002. Formation, reactivity, and properties of nondative late transition metal-oxygen and -nitrogen bonds. *Acc. Chem. Res.*, 35:44-56
- Gadd G.M. 2004. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*, 122: 109-119.
- Gans J., Wolinsky M. and Dunbar J. 2005. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, 309:1387-1390.
- Garau G., Castaldi P., Santona L., Deiana P. and Melis P. 2007. Influence of red mud, zeolite and lime on heavy metal immobilization, culturable heterotrophic microbial populations and enzyme activities in a contaminated soil. *Geoderma*, 142: 47-57.
- Garbisu C. and Alkorta I. 2001. Phytoextraction: A cost effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Biores. Technol.*, 77:229-236.
- Garc a-Marnez J., Acinas S.G., Antón A.I. and Rodr guez-Valera F. 1999. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *J. Microbiol. Methods*, 36:55-64.
- Garland J.L. 1996. Patterns of potential C source utilization by rhizosphere communities. *Soil Biol. Biochem.*, 28:223-230.
- Garland J.L. and Mills A.L. 1991. Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-Level Sole-Carbon-Source Utilization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:2351-2359
- Ghosh E. and Singh S.P. 2005a. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its by-products, *Appl. Ecol. Environ. Res.*, 3: 1-18.
- Ghosh M and Singh S.P. 2005b. A comparative study of cadmium phytoextraction by accumulator and weed species, *Environ. Pollut.*, 133: 365-371.
- Giller E., Witter K. and Mcgrath P.S. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils. *Soil. Biol. Biochem.*, 30:1389-1414.
- Ginocchio R., Toro I. and Schnepf D. 2002. Copper tolerance in populations of *Mimulus luteus* var. *variegatus* exposed and non-exposed to copper pollution. *Geochem. Explor. Environ. Anal.*, 2:151-156
- Gobran G.R., Clegg S. and Courchesne F. 1998. Rhizospheric processes influencing the biogeochemistry of forest ecosystems. *Biogeoche.*, 42: 107-120.
- Goldschmit V.M. 1945. The geochemical background of minor elements distribution. *Soil Sci.*, 60:1-7.

- Gomes N.C.M., Heuer H., Schonfeld J., Costa R., Mendonc-a-Hagler L. and Smalla K. 2001. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant and Soil*, 232:167-180.
- Gong J.M., Lee D.A. and Schroeder J.I. 2003. Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatin and cadmium in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100: 10118-10123.
- Gonzalez C.R. and Gonzalez-Chavez M.C.A. 2006. Metal accumulation in wild plants surrounding mining wastes. *Environ. Pollut.*, 144:84-92.
- Gray E.J. and Smith D.L. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.*, 37:395-412.
- Grayston S.J., Wang S., Campbell C.D. and Edwards A.C. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.*, 30:369-378.
- Griffiths W.J.H., Kelly A.L. and Cox T.M. 1999. Inherited disorders of iron storage and transport. *Mol. Med. Today*, 5:431-438.
- Guerra R., Pasteris A., Ponti M., Fabbri D. and Bruzzi L. 2007. Impact of dredging in a shallow coastal lagoon: Microtox® Basic Solid-Phase Test, trace metals and *Corophium* bioassay. *Environ. Int.*, 33:469-473.
- Gupta S.K., Vollmer M.K. and Krebs R. 1996. The importance of mobile, mobilisable and pseudo total heavy metal fractions in soil for three-level risk assessment and risk management. *Sci. Total Environ.*, 178:11-20.
- Ha N.T.H., Sakakibara M., Sano S. and Nhuan M.T. 2011. Uptake of metals and metalloids by plants growing in a lead-zinc mine area, Northern Vietnam. *J. Hazard. Mater.*, 186:1384-1391.
- Hall J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.*, 53: 1-11.
- Harder E.C. 1919. Iron depositing bacteria and their geological implications. *US Geol. Surv. Prof. pap.* 113, 89.
- Harkins T. and Jarvie T. 2007. Metagenomics analysis using the Genome Sequencer FLX system. *Nat. Methods* 4. h.
- Harrison S., Safford H.D., Grace J.B., Viers J.H. and Davies K.F. 2006. Regional and local species richness in an insular environment : serpentine plants in California. *Ecol. Monogr.*, 76:41-56.
- Harry M., Gambier B., Bourezgui Y. and Garnier-Sillam E. 1999. Evaluation of purification procedures for DNA extracted from organic rich samples: interference with humic substances. *Analysis*. 27: 439-442.
- Harvey P. and Crundwell F. 1997. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans*: a Novel Experimental Design for Batch Growth and Bacterial Leaching Studies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 2586-2592.
- Hasan S.A., Fariduddin Q., Ali B., Hayat S. and Ahmad A. 2009. Cadmium: toxicity and tolerance in plants. *J. Environ. Biol.*, 30: 165-174.
- Hattori T. 1988. Soil aggregates as microhabitats of microorganisms *Biol. Fert. Soils*, 6: 189-203.
- He S., Zhang Y., Gu N., Feng Y., Lin X. and Ren H. 2011. The impact of iron oxide magnetic nanoparticles on the soil bacterial community, *J. Soils Sediments.*, 11:1408-1417.
- Heinonsalo J., Jorgensen K.S., Haahtela K., and Sen R. 2000. Effects of *Pinus sylvestris* root growth and mycorrhizosphere development on bacterial carbon source utilization and hydrocarbon oxidation in forest and petroleum-contaminated soils. *Can. J. Microbiol.*, 46, 451-464.
- Heuer H., Krsek M., Smalla K. and Wellington E.M.H. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of 16S rRNA and gel electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:3233-3241.
- Hill G.T., Mitkowski N.A., Aldrich-Wolfe L., Emele L.R., Jurkonie D.D., Ficke A., Maldonado-Ramirez S., Lynch S.T. and Nelson E.B. 2000 Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Appl. Soil Ecol.*, 15:25-36.
- Hiltner L. 1904. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründung und Brache. *Arb Dtsch Landwirtschaft Ges Berlin*, 98:59-78.
- Hinsinger P., Bengough A., Vetterlein D. and Young I. 2009. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil*, 321: 117-152.
- Hinsinger P., Jaillard B. and Dufey J.E. 1992. Rapid weathering of a trioctahedral mica by the roots of ryegrass. *Soil Sc. Society America J.*, 56: 977-982.
- Hopkins W.G. 2002. A scale of magnitudes for effect statistics. In: Internet Society of Sport Science. A New View of Statistics. <http://www.sportsci.org/resource/stats/effctmag.html> (accessed 19.02.2011).
- Houba V.J.G., Novozamsky I, Lexmond T.M. and Van Der Lee J.J. 1990. Applicability of 0.01 M CaCl<sub>2</sub> as a single extraction solution for the assessment of the nutrient status of soils and other diagnostic purposes. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 21:2281-2290.
- Huang J. and Cunningham S. 1996. Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytol.*, 134:75-84.
- Huang P.M. 2004. Soil Mineral-Organic Matter-Microorganism Interactions: Fundamentals and Impacts. In: Sparks D. L. *Adv. Agron.*, 82: 391-472.
- Hugenholtz P. and Tyson G.W. 2008. Metagenomics. *Nature*, 455:481-483.
- Hugenholtz P. 2002. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biol.*, 3:1-8.

- Hurt R.A., Qiu X., Wu L., Roh Y., Palumbo A.V., Tiedje J.M. and Zhou J. 2001. Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:4495-503.
- Hutchins S.R., Sewell G.W., Kovacs D.A. and Smith G.A. 1991. Biodegradation of aromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions. *Environ. Sci. Tech.*, 25:68-76.
- Imbert M. and Blondeau R. 1998. On the iron requirement of lactobacilli grown in chemically defined medium. *Curr. Microbiol.*, 37:64-66.
- Insam H. 1997. A new set of substrates proposed for community characterization in environmental samples. In: Insam H., and Ragger A. (eds.) *Microbial communities: functional versus structural approaches*. pp 259-260
- Isaure M.P. 2001. Spéciation et transfert du zinc dans un dépôt de sédiment de curage contaminé: Evolution le long du profil pédologique. Thèse. Géophysique-Géochimie-Géomécanique. Grenoble: Université Joseph Fournier - Grenoble 1, 321 p.
- Isnard P., Flammarion P., Roman G., Babut M., Bastien P.H., Bintein S., Esserméant L., Féraud J.F., Gallotti-Schmitt S., Saouter E., Saroli M., Thiébaud H., Tomassone R. and Vindimian E. 2001. Statistical analysis of regulatory ecotoxicity tests. *Chemosphere*, 45:659-669.
- Janoš P., Vávrová J., Herzogová L. and Pilařová V. 2010. Effects of inorganic and organic amendments on the mobility (leachability) of heavy metals in contaminated soil: A sequential extraction study. *Geoderma*, 159, 335-341.
- Jentschke G. and Godbold D.L. 2000. Metal toxicity and ectomycorrhizas. *Physiol. Plantarum.*, 109: 107-116.
- Kabata-Pendias A. 2004. Soil-plant transfer of heavy metals-an environmental issue. *Geoderma*.122:143-149.
- Kabata-Pendias A. and Pendias H. 2001. Trace elements in soils and plants. 3rd CRC Press, Boca Raton, London, New-York, Washington D.C.
- Kaiser H.F. 1960. The application of electronic computers to factor analysis. *Educ. Psychol.Measur.*, 20, 141-151.
- Kashem M.A. and Singh B.R. 2001. Metal availability in contaminated soils: I Effects of flooding and organic matter on changes in Eh, pH and solubility of Cd, Ni and Zn. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.*, 61:247-255.
- Kelly J.J. and Tate R.L. 1998. Effects of heavy metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of a zinc smelter. *J. Environ. Qual.*, 27:609-617.
- Kenarova A., Radeva G., Traykov I. and Boteva S. 2014. Community level physiological profiles of bacterial communities inhabiting uranium mining impacted sites. *Ecotoxicol. Environ. Safe.*, 100:226-232.
- Kidd P.S., Domínguez-Rodríguez M.J., Díez J. and Monterroso C. 2007. Bioavailability and plant accumulation of heavy metals and phosphorus in agricultural soils amended by long-term application of sewage sludge. *Chemosphere*, 66: 1458-1467.
- Kidd P.S. and Monterroso C. 2005. Metal extraction by *Alyssum serpyllifolium* ssp. lusitanicum on mine-spoil soils from Spain. *Sci. Total Environ.*, 336:1-11.
- Kim Y.Y., Yang Y.Y. and Lee Y. 2002. Pb and Cd uptake in rice roots. *Physiol. Plantarum.*, 116:368-372.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16:111-120.
- Kisku G.C., Pandey P., Negi M.P. and Misra V. 2011. Uptake and accumulation of potentially toxic metals (Zn, Cu and Pb) in soils and plants of Durgapur industrial belt. *J. Environ. Biol.*, 32 (6): 831-838.
- Knight B., McGrath S. and Chaudri A. 1997. Biomass carbon measurements and substrate utilization patterns of microbial populations from soils amended with cadmium, copper or zinc. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:39-43.
- Konopka A., Zakharova T., Bischoff M., Olivier L., Nakatsu C. and Turco R.F. 1999. Microbial biomass and activity in lead-contaminated soil. *Appl. Envir. Microbiol.*, 65:2256-2259.
- Kos B., Greman H. and Lestan D. 2003. Phytoextraction of lead, zinc and cadmium from soil by selected plants. *Plant, Soil Environ.*, 49: 548-553.
- Kraemer S.M. 2004. Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquat. Sci.*, 66:3-18.
- Krista L. De Fede K.L. and Sextstone A.J. 2001. Differential response of size-fractionated soil bacteria in BIOLOG® microtitre plates. *Soil Biol. Biochem.*, 33:1547-1554.
- Kruckeberg A.R. 1951. Intraspecific variability in response of certain native plant species to serpentine soil. *Am. J. Bot.*, 38: 408-419.
- Krumbein W.C. and Garrels R.M. 1952. Origin and classification of chemical sediments in terms of pH and oxydation-reduction potentials. *J. Geol.*, 60:1-33.
- Kuiper I., Lagendijk E.L., Bloembergen G.V. and Lugtenberg B.J.J. 2004. Rhizoremediation: a beneficial plant microbe interaction. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 17:6-15.
- Kurtzman C.P. and Robnett C.J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73: 331-371.
- Lan, R.T. and Reeves P.R. 1998. Recombination between rRNA operons created most of the ribotype variation observed in the seventh pandemic clone of *Vibrio cholerae*. *Microbiol.*, 144:1213-1221.

- Landi L., Renella G., Moreno J.L., Falchini L. and Nannipieri P. 2000. Influence of cadmium on the metabolic quotient, L-D-glutamic acid respiration ratio and enzyme activity: microbial biomass ratio under laboratory conditions. *Biol. Fertil. Soils*, 32:8-16.
- Laperche V., Logan T.J., Gaddam P. and Traina S.J. 1997. Effect of apatite amendments on plant uptake of lead from contaminated soil. *Environ. Sci. Technol.*, 31, 2745-2753.
- Lasat M.M. 2002. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *J. Environ. Qual.*, 31:109-120.
- Laureysens I., Blust R., DeTemmerman L., Lemmens C. and Ceulemans R. 2004. Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: I. Seasonal variation in leaf, wood and bark concentrations. *Environ. Pollut.*, 131:485-494.
- Lawton J.H. and Jones C.G. 1995. Linking species and ecosystems. Organisms as ecosystems engineers. In Jones CG and Lawton JH (Eds) *Linking Species and Ecosystems* Chapman and Hall Inc 9 pp.
- Leblanc M., Petit D., Deram A., Robinson B.H. and Brooks R.R. 1999. The phytomining and environmental significance of hyperaccumulation of thallium by *Iberis intermedia* from southern France. *Econ. Geol.*, 94:109-114.
- Lecroq B., Lejzerowicz F., Bachar D., Christen R., Esling P., Baerlocher L., Østerås M., Farinelli L. and Pawlowski J. 2011. Ultra-deep sequencing of foraminiferal microbarcodes unveils hidden richness of early monothalamous lineages in deep-sea sediments. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 108: 13177-13182.
- Lefèbvre C. and Vernet P. 1990. Microevolutionary processes on contaminated deposits. In: *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects* (ed. Shaw J.), CRC Press Inc, Boca Raton, 285-300.
- Legrand C., Solerieu M. and Goglio E. 2006. Traitement des sites et des sols pollués. Territorial Editions. Voiron. 85p.
- Leita L., De Nobili M., Muhlbachova G., Mondini C., Marchiol L. and Zerbi G. 1995. Bioavailability and effects of heavy metals on soil microbial biomass survival during laboratory incubation. *Biol. Fertil. Soils.*, 19:103-108.
- Lexerad N. and Eid T. 2006. An évaluation of différent diameter diversity indices based on criteria related to forest management planning. *For. Ecol. Manage.*, 222:17-28.
- Leyval C. and Berthelin J. 1991. Weathering of a mica by roots and rhizospheric microorganisms of Pine. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 55:1009-1016.
- Li X. and Thornton I. 2001. Chemical partitioning of trace and major elements in soils contaminated by mining and smelting activities. *Appl. Geochem.*, 16:1693-1706.
- Li Y.T., Rouland C., Benedetti M., Li F.B., Pando A., Lavelle P. and Dai J. 2009. Microbial biomass, enzyme and mineralization activity in relation to soil organic C, N and P turnover influenced by acid metal stress. *Soil Biol. Biochem.*, 41, 969-977.
- Li Z., Xu J., Tang C., Wu J., Akmal M. and Wang H. 2006. Application of 16S rDNA-PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of shift in microbial community diversity in Cu-, Zn-, and Cd-contaminated paddy soils. *Chemosphere*, 62:1374-1380.
- Lindstrom J.E., Barry R.P. and Braddock J.F. 1998. Microbial community analysis: a kinetic approach to constructing potential C source utilization patterns. *Soil Biol. Biochem.*, 30:231-239.
- Liu H.J., Zhang J.L., Christie P. and Zhang F.S. 2008. Influence of iron plaque on uptake and accumulation of Cd by rice (*Oryza sativa* L.) seedlings grown in soil. *Sci. Total Environ.*, 394: 361-368.
- Liu J.G., Liang J.S., Li K.Q., Zhang Z.J., Yu B.Y., Lu X.L., Yang J.C. and Zhu Q.S. 2003. Correlations between cadmium and mineral nutrients in absorption and accumulation in various genotypes of rice under cadmium stress. *Chemosphere*, 52:1467-1473.
- Liu Z., Lozupone C., Hamady M., Bushman F.D. and Knight R. 2007. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nuc. Acids Res.*, 35: e120.
- Lombard A. 1953. Les rythmes sédimentaires et la sédimentation générale. Essai de synthèse. *Rev. Inst. Franc. Du Pétrole Paris*.
- Lopareva-Pohu A. 2011. Intérêt de la phytostabilisation aidée pour la gestion des sols pollués par des éléments traces métalliques (Cd, Pb, Zn). Université du Littoral Cote d'Opale, thèse.
- Lorestani B., cheraghi M. and yousefi N. 2011. Accumulation of Pb, Fe, Mn, Cu and Zn in plants and choice of hyperaccumulator plant in the industrial town of vian, Iran. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 63:739-745.
- Lu L., Tian S., Yang X., Li T. and He Z. 2009. Cadmium uptake and xylem loading are active processes in the hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *J. Plant Physiol.*, 166: 579-587.
- Lucho-Constantino C.A., Alvarez-Suarez M., Beltran-Hernandez R.I., Prieto-Garcia F. and Poggi-Varaldo H.M. 2005. A multivariate analysis of the accumulation and fractionation of major and trace elements in agricultural soils in Hidalgo State, Mexico irrigated with raw wastewater. *Environ. Int.*, 31: 313-323.
- Ludwig W., Strunk O., Westram R., Richter L., Meier H., Yadhukumar, Buchner A., Lai T., Steppi S., Jobb G., Förster W., Brettske I., Gerber S., Ginhart A.W., Gross O., Grumann S., Hermann S., Jost R., König A., Liss T., Lüssmann R., May M., Nonhoff B., Reichel B., Strehlow R., Stamatakis A., Stuckmann N., Vilbig A.,

- Lenke M., Ludwig T., Bode A. and Schleifer K.H. 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nuc. Acids Res.*, 32: 1363-1371.
- Lugtenberg B. and Kamilova F. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Ann. Rev. Microb.*, 63: 541-556
- Luo Y., Rimmer D.L. 1995 Zinc-copper interaction affecting plant growth on a metal contaminated soil. *Environ. Pollut.*, 88:79-83.
- Lupski J.R. and Weinstock K.H. 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.*, 174:4525-4529.
- MA 2005. Millenium ecosystem assesment. ecosystem and human well-being: synthesis. *Tech. rep.*, Island Press, Washington DC.
- Ma Q.Y., Logan T.J. and Traina S.J. 1995. Lead immobilization from aqueous solutions and contaminated soils using phosphate rocks, *Environ. Sci. Technol.*, 29:1118-1126.
- Maarit-Niemelä R., Heiskanen I., Wallenius K. and Lindstrom K. 2001. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *J. Microbiol. Methods*, 45: 155-165.
- Macnair M.R. 2003. The hyperaccumulation of metals by plants, *Adv. Bot. Res.* 40: 63-105.
- Macnair M.R., Tilstone G.H. and Smith S.E. 2000. The genetics of metal tolerance and accumulation in higher plants. In: *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water* (eds. Terry N., Banuelos G., Vangronsveld J.), CRC Press, Boca Raton, 235-250.
- Maier R.M., Pepper I.L. and Gerba C.P. 2000. Environmental Microbiology. London: Academic Press, 585 p.
- Maiz I., Arambarri I., Garcia R. and Millan E. 2000. Evaluation of heavy metal availability in polluted soils by two sequential extraction procedures using factor analysis. *Environ. Pollut.*, 110:3-9.
- Malik N. V Biswas A.K. 2012. Role of higher plants in remediation of metal contaminated sites. *Sci. Rev. Chem. Comm.*, 2: 141-146.
- Mamindy-Pajany Y., Hurel C., Geret F., Roméo M. and Marmier N. 2013. Comparison of mineral-based amendments for ex-situ stabilization of trace elements (As, Cd, Cu, Mo, Ni, Zn) in marine dredged sediments: A pilot-scale experiment. *J. Hazard. Mater.*, 252-253:213-219.
- Manz M., Weissflog L., Kühne R. and Schüürmann G. 1999. Ecotoxicological hazard and risk assessment of heavy metal contents in agricultural soils of central Germany. *Ecotox. Environ. Saf.*, 42:191-201.
- Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants (2nd edn. ed.). Academic Press: London, UK.
- Martinez C.E. and McBride M.B. 1998. Solubility of Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, and Zn<sup>2+</sup> in aged coprecipitates with amorphous iron hydroxides. *Environ. Sci. Tech.*, 32: 743-748.
- Matsuyama T. and Nakagawa Y. 1996. Bacterial wetting agents working in colonization of bacteria on surface environments. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 7: 207-214.
- Mattina M.I., Lannucci-Berger W., Musante C. and White J.C. 2003. Concurrent plant uptake of heavy metals and persistent organic pollutants from soil. *Environ. Pollut.*, 124:375-378.
- Mbonigaba Muhinda J.J., Nzeyimana I., Bucagu C. and Culot M. 2009. Caractérisation physique, chimique et microbiologique de trois sols acides tropicaux du Rwanda sous jachères naturelles et contraintes à leur productivité. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13:545-558.
- McBride M.B. 1994. Environmental chemistry of soil. Oxford University Press.
- McGrath S.P. and Zhao F.J. 2003. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 14: 277-282.
- McGrath S.P. 1998. Phytoextraction for Soil Remediation. In: Brooks, R.R. (Ed.). *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 261-287.
- McHardy A.C. and Rigoutsos I. 2007. What's in the mix: phylogenetic classification of metagenome sequence samples. *Curr. Opin. Microbiol.* 10: 499-503.
- McLaughlin M.J., Zarcinas B.A., Stevens D.P. and Cook N. 2000. Soil testing for heavy metals. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.*, 31:1661-1700.
- Melero S., Porras J.C.R., Herencia J.F. and Madejon E. 2006. Chemical and biochemical properties in a silty loam soil under conventional and organic management. *Soil Tillage Res.*, 90:162-170.
- Mench M., Lepp N., Bert V., Schwitzguébel J.P., Gawronski S., Schröder P. and Vangronsveld J. 2010. Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *J. Soils Sedim.*, 10: 1039-1070.
- Mench M., Vangronsveld J., Lepp N., Bleeker P., Ruttens A. and Gebelein W. 2005. Phytostabilisation of metal contaminated sites. pp. 109-190 in T. N. Springer, editor. *Phytoremediation of metal contaminated soils*. Echevarria G., Morel J. L., Goncharova N. (Eds), Trest, Czech Republic.
- Mench M., Morel J.L. and Guckert A. 1987. Metal binding properties of high molecular weight soluble exudates from maize (*Zea mays* L.) roots. *Biol. Fert. Soils*, 3:165-169.
- Mendoza-Cozatl D.G., Butko E., Springer F., Torpey J.W., Komives E.A., Kehr J. and Schroeder J.I. 2008. Identification of high levels of phytochelatins, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiolpeptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *Plant J.*, 54: 249-259.

- Mertens J., Vervaeke P., Meers E. and Tack F.M.G. 2006. Seasonal changes of metals in willow (*Salix* sp.) stands for phytoremediation on dredged sediment. *Environ. Sci. Technol.*, 40: 1962-1968.
- Mico C., Recatala L., Perisa M. and Sanchez J. 2006. Assessing heavy metal sources in agricultural soils of an European Mediterranean area by multivariate analysis. *Chemosphere*, 65:863-872.
- Microbics Corporation, 1992. Microtox<sup>®</sup> Manual. A Toxicity Testing Handbook. Carlsbad, CA, USA.
- Miller D.N., Bryant J.E., Madsen E.L. and Ghiorse W.C. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:4715-24.
- Miller R. 1996. Phytoremediation. *Tech. Overview Rep.*, GWRTAC Series.
- Minguzzi C. and Vergano O. 1948. Il contenuto di nichel nelle ceneri di *Alyssum bertolonii* Desv. *Memorie Societa Toscana di Scienze Naturali* 55: 49-77.
- Mondini C. and Insam H. 2003. Community level physiological profiling as a tool to evaluate compost maturity: a kinetic approach. *Eur. J. Soil Biol.*, 39:141-148.
- Morales S.E., Cosart T.F., Johnson J.V. and Holben W.E. 2009. Extensive phylogenetic analysis of a soil bacterial community illustrates extreme taxon evenness and the effects of amplicon length, degree of coverage, and DNA fractionation on classification and ecological parameters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 668-675.
- Moreno-Jimenez E., Penalosa J.M., Manzano R., Carpena-Ruiz R.O., Gamarra R. and Esteban E. 2009. Heavy metals distribution in soils surrounding an abandoned mine in NW Madrid (Spain) and their transference to wild flora. *J. Hazard. Mater.*, 162:854-859.
- Mortvedt J.J. 2000. Bioavailability of micronutrients. in M.C. Summer (ed.), *Handbook of soil science*. CRC Press, Boca Raton, D71- D88.
- Mouillot D. and Lepretre A. 1999. A comparison of species diversity estimators. *Res. Popul. Ecol.*, 41:203-215.
- Mrabet R., Lahlou S., Bissonnais Y. L. and Duval O. 2004. Estimation de la stabilité structurale des sols semi-arides marocains: Influence des techniques culturales simplifiées. *Bulletin du Réseau Erosion*, 23:405-415.
- Mukhopadhyay B., Sundquist J. and Schmitz R.J. 2007. Removal of Cr(VI) from Cr-contaminated groundwater through electrochemical addition of Fe(II). *J. Environ. Manag.*, 82, 66-76.
- Mulling B.T.M., Soeter A.M., van der Geest H.G. and Admiraal W. 2014. Changes in the planktonic microbial community during residence in a surface flow constructed wetland used for tertiary wastewater treatment. *Sci. Total Environ.*, 466-467:881-887.
- Muyzer G. and Ramsing N.B. 1995. Molecular methods to study the organization of microbial communities. *Water Sci. Technol.* 32, p. 1-9.
- Muyzer G., DE Waal E. and Uitterlinden A. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 695-700.
- Nagajyoti P.C., Lee K.D. and Sreekanth T.V.M. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ. Chem. Letters*, 8:199-216.
- Nakatsu C.H., Torsvik V. and Øvreas L. 2000. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 64: 1382-1388.
- Namasivayam C. and Ranganathan K. 1995. Removal of Cd(II) from wastewater by adsorption on "waste" Fe(III)/Cr(III) hydroxide. *War. Ges.*, 29: 173-174.
- Neilands J.B. 1981. Iron absorption and transport in microorganisms. *Ann. Rev. Nut.*, 1:27-46.
- NEN 5704, 1996. Soil-Sample preparation of soil-Extraction with a calcium chloride solution (0.01 mol/L), 4p.
- NF EN ISO 14688-2, 2005. - Reconnaissance et essais géotechniques-Dénomination, description et classification des sols-Partie 2: principes pour une classification. pp: 13.
- Nichols D. 2007. Cultivation gives context to the microbial ecologist. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 60:351-357.
- Niklińska M., Chodak M. and Laskowski R. 2005. Characterization of the forest humus microbial community in a heavy metal polluted area. *Soil Biol. Biochem.*, 37:2185-2194.
- Noret N., Meerts P., Tolrà R.P., Poschenrieder C., Barceló D. and Escarré J. 2005. Palatability of *Thlaspi caerulescens* for snails: influence of Zn and glucosinolates. *New Phytol.*, 165:763-772.
- Normand P., Ponsonnet C., Nesme X., Neyra M. and Simonet P. 1996. ITS analysis of prokaryotes. *Molecular Microbial Ecology Manual*. Vol. 3.4.5. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, p. 1-12.
- Nübel U., Engelen B., Felske A., Snaird J., Wieshuber A., Amann R.I., Ludwig W. and Backhaus H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16s rRNAs in *Paenibacillus pofymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 178, 5636-5643.
- Nunes S.M., Mucha A.P., Rocha A.C., Teixeira C., Gomes C.R. and Almeida C.M.R. 2014. A strategy to potentiate Cd phytoremediation by saltmarsh plants-Autochthonous bioaugmentation, *J. Environ. Manag.*, 134:136-144.
- Oh S.Y., Chad K. and Chiu P.C. 2004. Conceptual comparison of pink water treatment technologies: granular activated carbon, anaerobic fluidized bed, and zero-valent iron-Fenton process. *Wat. Sci. Technol.* 49: 129-136.

- Okamura M.Y., Isaacson R.A. and Feher G. 1975. Primary acceptor in bacterial photosynthesis: obligatory role of ubiquinone in photoactive reaction centers of *Rhodospseudomonas spheroides*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72:3491-3495.
- Pacheco A.M.G., Freitas M.C., Baptista M.S., Vasconcelos M.T.S.D. and Cabral J.P. 2008. Elemental levels in tree-bark and epiphytic-lichen transplants at a mixed environment in mainland Portugal, and comparisons with an in situ lichen. *Environ. Pollut.*, 151:326-333.
- Padmavathiamma P.K. 2007. Phytoremediation Technology: Hyper-accumulation Metals in Plants. *Water Air Soil Pollut.* 184:105-126.
- Parker M.A. 2001. Case of localized recombination in 23S rRNA genes from divergent *Bradyrhizobium* lineages associated with neotropical legumes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:2076-2082.
- Pascal M., Richer De Forges B., Le Guyader H. and Simberloff D. 2008. Mining and Other Threats to the New Caledonia Biodiversity Hotspot. *Conserv. Biol.*, 2:498-499.
- Paule A. 2012. Dynamique des communautés microbiennes des biofilms phototrophes à différents niveaux d'intégration biologique: des successions écologiques aux réponses à l'exposition à un herbicide. Université de Toulouse 3 Paul Sabatier, Thèse.
- Pedros-Alio C. 2006. Marine microbial diversity: Can it be determined? *Trends Microbiol.* 14: 257-263.
- Perchet G.T. 2008. Etude de bioremédiation de sédiments contaminés par des composés organiques nitrés persistants, *Thèse*.
- Pereira R., Antunes S.C., Marques S.M. and Gonçalves F. 2008. Contribution for tier 1 of the ecological risk assessment of Cunha Baixa uranium mine (Central Portugal): I Soil chemical characterization. *Sci. total environ.*, 390: 377-386.
- Pérez-de-Mora A., Madejón E., Burgos P. and Cabrera F. 2006. Trace element availability and plant growth in a mine-spill contaminated soil under assisted natural remediation I. Soils. *Sci. Total Environ.*, 363:28-37.
- Perfus-Barbeoch L., Leonhardt N., Vavasseur A. and Forestier C. 2002. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J.*, 32: 539-548.
- Pilon-Smits E. 2005. Phytoremediation. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 56:15-39.
- Pinto A.P., Mota A.M., Varennes A. and Pinto F.C. 2004. Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. *Sci. Total Environ.*, 326, 239-247.
- Pollard A.J. and Baker A.J.M. 1997. Deterrence of herbivory by zinc hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae). *New Phytol.*, 135: 655-658.
- Posey J.E. and Gherardini F.C. 2000. Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science*, 288:1651-1653.
- Posey J.E., Hardham J.M., Norris S.J. and Gherardini F.C. 1999. Characterisation of a manganese dependent regulatory protein, TroP, from *Treponema pallidum*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 96:10887-10892.
- Pourrut B. 2008. Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. Thèse de l'université de Toulouse.
- Prasad M.N.V. 2008. Trace elements as contaminants and nutrients: consequences in ecosystems and human health. John Wiley & Sons, USA, 777 p.
- Prasad M.N.V., Sajwan K.S. and Naidu R. 2006. Trace elements in the environment: biogeochemistry, biotechnology, and bioremediation. CRC Press, Taylor and Francis, Boca Raton, 726 p.
- Prasad M.N.V. 2004. Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems (2<sup>ème</sup> édition), Springer.
- Prasad M.N.V. and Hagemeyer F. 1999. Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin: 401 p.
- Prat S. 1934. Die Erblichkeit der Resistenz gegen Kupfer. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 52: 65-67.
- Pueyo M., López-Sánchez J.F. and Rauret G. 2004. Assessment of CaCl<sub>2</sub>, NaNO<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> extraction procedures for the study of Cd, Cu, Pb and Zn extractability in contaminated soils. *Analytica Chimica Acta*, 504:217-226
- Quantin C., Becquer Th., Rouiller J. and Berthelin J. 2002. Redistribution of metals in a New Caledonia Ferrasol after microbial weathering. *Soil Sci. Am. J.*, 66 :1797-1804.
- Raghothama K.G. and Karthikeyan A.S. 2005. Phosphate acquisition. *Plant Soil*, 274:37-49.
- Rajakaruna N. 2004. The edaphic factor in the origin of plant species. *Int. Geo. Rev.*, 46:471-478.
- Ramade F. Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement. 2<sup>ème</sup> édition. Paris: Dunod, 2002.
- Ramette A. 2009. Quantitative community fingerprinting methods for estimating the abundance of operational taxonomic units in natural microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 2495-2505.
- Ranjard L., Poly F. and Nazaret S. 2000. Monitoring complex bacterial communities using culture independent molecular techniques: application to soil environment. *Res. Microbiol.*, 151 :167-177.
- Rappe M.S. and Giovannoni S.J. 2003. The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.*, 57: 369-394.
- Rascio N. and Navari-Izzo F. 2010. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci.*, 180:169-181.



- Reeves R.D. and Baker A.J.M. 2000. Metal-accumulating plants, in: I. Raskin, B.D. Ensley (Eds.), *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean up the Environment*, John Wiley & Sons, pp. 193-229.
- Remon E., Bouchardon J.L., Cornier B., Guy B., Leclerc J.C., Faure O. 2005 Soil characteristics, heavy metal availability and vegetation recovery at a former metallurgical landfill: Implications in risk assessment and site restoration. *Environ. Pollut.*, 137:316-323
- Rio M.D., Font R., Almela C., Velez D., Montoro R. and Bailon A.D.H. 2002. Heavy metals and arsenic uptake by wild vegetation in the Guadiamar river area after the toxic spill of the Aznalcollar mine, *J. Biotechnol.*, 98:125-137.
- Robert M. and Chenu C. 1992. Interactions between soil minerals and microorganisms. *Soil Biochemistry*. Stotzky, G., and Bollag, J.M., eds. p. 307-404. Marceil Dekker Inc, New York, Basel, Hong Kong.
- Robinson N.J., Procter C.M., Connolly E.L. and Guerinot M.L. 1999. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature*, 397:694-697.
- Roesch L.F., Fulthorpe R.R., Riva A., Casella G., Hadwin A.K., Kent A.D., Daroub S.H., Camargo F.A., Farmerie W.G. and Triplett E.W. 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *Isme J.* 1: 283-290.
- Rohwerder T., Gehrke T., Kinzler K. and Sand W. 2003. Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63: 239-248.
- Roth U., von Roepenack L.E. and Clemens S. 2006. Proteome changes in *Arabidopsis thaliana* roots upon exposure to Cd<sup>2+</sup>. *J. Exp. Bot.*, 57: 4003-4013.
- Ryan R.P., Germaine K., Franks A., Ryan D.J. and Dowling D.N. 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol. Lett.*, 278: 1-9.
- Saano A. and Lindstrom K. 1995. Small-scale extraction of DNA from soil with spun column cleanup. *Molecular Microbial Ecology Manual*. 1341-1346.
- Sainger P.A., Dhankhar R., Sainger M., Kaushik A. and Singh R.P. 2011. Assessment of heavy metal tolerance in native plant species from soils contaminated with electroplating effluent. *Ecotox. Environ. Safe.*, 74:2284-2291.
- Saxena S. and D'Souza S.F. 2006. Heavy metal pollution abatement using rock phosphate mineral. *Environ. Inter.*, 32:199-202.
- Sayler G.S. and Ripp S. 2000. Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 11:286-289.
- Schachtman D.P., Reid R.J. and Ayling S.M. 1998. Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell, *Plant Physiol.*, 116:447-453.
- Schafer G., Purschke W.G., Gleissner M. and Schmidt C.L. 1996. Respiratory chains of archaea and extremophiles. *Bba-Bioenergetics*, 1275:16-20.
- Scherer M.M., Richter S., Valentine R.L., and Alvarez P.J.J. 2000. Chemistry and microbiology of permeable reactive barriers for in situ groundwater cleanup, *Environ. Sci. Technol.*, 30:363-411.
- Schloss P.D. and Handelsman J. 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 1501-1506.
- Schnoor J.L. 2000. Phytostabilization of metals using hybrid poplar trees. In I Raskin, BD Ensley (Eds.), *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. John Wiley & Sons: NY, US.
- Schouls L.M., Schot C.S. and Jacobs J.A. 2003. Horizontal transfer of segments of the 16S rRNA genes between species of the *Streptococcus anginosus* group. *J. Bacteriol.*, 185, p. 7241-6.
- Schützendübel A. and Polle A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.*, 53: 1351-1365.
- Schwartz C., Leyval C. and Morel J.L. 1999. Réhabilitation des sols urbains: intérêt de la voie biologique. *C. R. Acad. Agric. France*, 85:159-169.
- Segalen P. 1964. Le fer dans les sols. O. R. S. T. O. M. PARIS 156p.
- Seregin I.V. and Kozhevnikova A.D. 2008. Roles of root and shoot tissues in transport and accumulation of cadmium, lead, nickel, and strontium. *Russian J. Plant Physiol.*, 55:1-22.
- Seregin I.V. and Ivanov V.B. 2001. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian J. Plant Physiol.*, 48: 523-544.
- Shah K. and Nongkynrih J.M. 2007. Metal hyperaccumulation and bioremediation. *Biologia Plantarum*, 51:618-634.
- Sharma R.J., Agrawal M. and Marshall F. 2008. Heavy metal contamination of soil and vegetables in suburban areas of Varanasi, India. *Ecotox. Environ. Safe.*, 66:258-266.
- Shen J., Yuan L., Zhang J., Li H., Bai Z., Chen X., Zhang W. and Zhang F. 2011. Phosphorus Dynamics: From Soil to Plant. *Plant Physiol.*, 156:997-1005.
- Shingles R., North M. and McCarty R.E. 2002. Ferrous ion transport across chloroplast inner envelope membranes. *Plant Physiol.*, 128:1022-1030.

- Sigg L., Behra, P. and Stumm, W. 2000. Chimie des milieux aquatiques. Chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement. 3ème édition, Dunod, Paris.
- Singh S. and Singh J.S. 1995. Microbial biomass associated with water-stable aggregates in forest, savanna and cropland soils of a seasonally dry tropical region, India. *Soil Biol. Biochem.*, 27:1027-1033.
- Slattery W.J., Conyers M.K. and Aitken R.I. 1999. Soil pH, Aluminium, Manganese and lime Requirement. In Peverill K.I., Sparrow L.A. and Reuter D.J. *Soil analysis: an interpretation manual*. CSIRO publishing Australia. pp. 103-106.
- Smalla K., Wachtendorf U., Heuer H., Liu W. and Forney L. 1998. Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:1220-1225.
- Sneath P.H. 1993. Evidence from *Aeromonas* for genetic crossing-over in ribosomal sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43: 626-629.
- Söderberg K.H., Probanza A., Jumpponen A. and Bååth E. 2004. The microbial community in the rhizosphere determined by community-level physiological profiles (CLPP) and direct soil- and cfu-PLFA techniques. *Appl. Soil Ecol.*, 25:135-145.
- Sogin M.L., Morrison H.G., Huber J.A., Welch D.M., Huse S.M., Neal P.R., Arrieta J.M. and Herndl G.J. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the under explored "rare biosphere". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103:12115-12120.
- Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A., Kämpfer P., Maiden M.C., Nesme X., Rosselló-Mora R., Swings J., Trüper H.G., Vauterin L., Ward A.C. and Whitman W.B. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.*, 52: 1043-1047.
- Stephan A., Meyer A.H. and Schmid B. 2001. Plant diversity affects culturable soil bacteria in experimental grassland communities. *J.Ecol.*, 88: 988-998.
- Steffan R.J., Goksoyr J., Bej A.K. and Atlas R.M. 1988. Recovery of DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:2908-2915.
- Stemmler S., Loyaux-Lawniczak S. and Berthelin J. 2004. Effet de la teneur en eau d'un sol sur la réduction bactérienne d'oxydes de fer. *C.R. Géosciences*, 336:1171-1179.
- Stemmler S. and Berthelin J. 2003. Microbial activity as a major factor in the mobilization of iron in the humid tropic. *Eur. J. Soil Sci.*, 54:725-733.
- Stoys S.J. and Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Medicine*, 18: 321-336.
- Stoltz E. and Greger M. 2002. Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb, and Zn by four wetland plant species growing on submerged mine tailings. *Environ. Exp. Bot.*, 47:271-280.
- Sun R., Zhou Q. and Jin C. 2006. Cadmium accumulation in relation to organic acid in leaves of *Solanum nigrum* L. as a newly found cadmium hyperaccumulator. *Plant Soil*, 285:125-134.
- Takeuchi Y. and Arai H. 1990. Removal of coexisting Pb<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> ions from water by addition of hydroxyapatite powder. *J. Chem. Eng. Jpn.*, 23:75-80.
- Termier H. and Termier G. 1958. L'évolution de la lithosphère II, Orogénèse. In: *Revue de géographie de Lyon*. 33: 394-396.
- Tessier A., Campbell P.G.C. and Bisson M. 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Anal. Chem.*, 51:844-851.
- Theron J. and Cloete T.E. 2000. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Crit. Rev. Microbiol.*, 26: 37-57.
- Tiwari K.K., Singh N.K., Patel M.P., Tiwari M.R. and Rai U.N. 2011. Metal contamination of soil and translocation in vegetables growing under industrial wastewater irrigated agricultural field of Vadodara, Gujarat, India. *Ecotoxicol. Environ. Safe.*, 74:1670-1677.
- Torsvik V. and Ovreas L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.*, 5:240-245.
- Torsvik V., Daae F.L., Sandaa R.A. and Ovreås L. 1998. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J Biotechnol.*, 64:53-62.
- Torsvik V., Salte K., Sorheim R. and Goksoyr J. 1990. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 776-781.
- Tremel-Schaub A. and Feix I. 2005. Contamination des sols-transferts des sols vers les plantes. *ADEME/EDP Sciences, Paris*; 413 p.
- Ulrich B. 1987. Stability, elasticity, and resilience of terrestrial ecosystems with respect to matter balance. In Shultze ED & Zölfer H (Eds) *Ecological Studies 61 Springer-Verlag, Berlin Heidelberg* 38 pp.
- Uzu G., Sobanska S., Sarret G., Munoz M. and Dumat C. 2010. Foliar Lead Uptake by Lettuce Exposed to Atmospheric Fallouts. *Environ. Sci. Technol.*, 44:1036-1042.

- Van Assche F. and Clijsters H. 1986. Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentration of zinc: effect on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J. Plant Physiol.*, 125: 355-360.
- Vandamme P.B., Grillis P.D.V., Kersters K. and Swing J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacteria systematic. *Microbiol. Rev.*, 60:407-438.
- Van Elsas J.D., Trevors J.T. and Wellington E.M.H. 1997. Modern soil microbiology. New York: Marcel Dekker, 683 p.
- Vásquez-Murrieta M.S., Migueles-Garduño I., Franco-Hernández O., Govaerts B. and Dendooven L. 2006. C and N mineralization and microbial biomass in heavy-metal contaminated soil. *Eur. J. Soil Biol.*, 42:89-98.
- Venditti D., Durécu S. and Berthelin J. 2000. A multidisciplinary approach to assess history, environmental risks and remediation feasibility of soils contaminated by metallurgical activities, Part A: chemical and physical properties of metals and leaching ability. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 38:411-420.
- Verkleij J.A.C., Golan-Goldhirsh A., Antosiewicz D.M., Schwitzguebel J.P. and Schreder P. 2009. Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper plant parts. *Environ. Exp. Bot.*, 67: 10-22.
- Versadovic J., Koeuth T. and Lupski J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucl. Ac. Res.*, 19:6823-6831.
- Verslovic J.T., Schneider M., de Bruijn F.J. and Lupski J.R. 1994. Genomic fringerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.*, 5:25-40.
- Vidali M. 2001. Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.*, 73:1163-1172.
- Villieras F., Michot L.J., Cases J.M., Berend I., Bardot F., François M., Gérard G. and Yvon J. 1997. Static and dynamic studies of the energetic surface heterogeneity of clay minerals. *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 104:573-623.
- Volatier L. 2004. Réponse d'une communauté périphytique à un effluent complexe: études en bio-essais et en canaux artificiels. Science et Technique du déchet. Lyon: L'Institut des Sciences Appliquées de Lyon, 289 p.
- Volpi Ghirardini A., Girardini M., Marchetto D. and Pantani C. 2009. Microtox solid phase test: effect of diluent used in toxicity test. *Ecotox. Environ. Safe.*, 72: 851-861.
- von Wiren N., Klair S., Bansal S. Briat J.F., Khodr H., Shiori T., Leigh R.A. and Hider R.C. 1999. Nicotianamine chelates both FeIII and FeII Implications for metal transport in plants. *Plant Physiol.*, 119:1107-1114.
- Walkley A. and Black I.A. 1934. An examination of Degtjareff method for determining organic carbon in soils: effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. *Soil Sci.*, 63:251-263.
- Wagner R. 1994. The regulation of ribosomal RNA synthesis and bacterial cell growth. *Arch. Microbiol.*, 161:100-106.
- Wandersman C. and Delepelaire P. 2004. Bacterial iron sources: From siderophore to hemophores. *Ann. Rev. Microbiol.*, 58: 611-647.
- Wang H.B., Wong M.H., Lan C.Y., Baker A.J.M., Qin Y.R., Shu W.S., Chen G.Z. and Ye Z.H. 2007. Uptake and accumulation of arsenic by 11 *Pteris* taxa from southern China, *Environ. Pollut.*, 145:225-233.
- Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M. and Cole J.R. 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 5261-5267.
- Wang Q.R., Cui Y.S., Liu X.M., Dong Y.T. and Christie P. 2003. Soil contamination and plant uptake of heavy metals at polluted sites in China. *J. Environ. Sci. Health.*, 38:823-838.
- Wang Y. and Zhang Z.S. 2000. Comparative sequence analyses reveal frequent occurrence of short segments containing an abnormally high number of non-random base variations in bacterial rRNA genes. *Microbiol.* 146:2845-2854.
- Watteau F. and Berthelin J. 1994. Microbial dissolution of iron from minerals: efficiency and specificity of hydroxamate siderophore in the dissolution of ferric oxides. *Eur. J. Soil Biol.*, 30:1-9.
- Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler O., Krichevsky M.I., Moore L.H., Moore W.E.C., Murray R.G.E., Stackebrandt E., Starr M.P. and Trupe H.G. 1987. Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37: 463-464.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. and Lane D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173:697-703.
- Weng C.H., Lin Y.T., Lin T.Y. and Kao C.M. 2007. Enhancement of electrokinetic remediation of hyper-Cr (VI) contaminated clay by zero-valent iron. *J. Hazard. Mater.*, 149:292-302.
- Whiting S.N., Reeves R.D., Richards D., Johnson M.S., Cooke J.A., Malaisse F., Paton A., Smith J.A.C., Angle J.S., Chaney R.L., Ginocchio R., Jaffré T., Johns R., McIntyre T., Purvis O.W., Salt D.E., Schat H., Zhao F.J. and Baker A.J.M. 2004. Research Priorities for Conservation of Metallophyte Biodiversity and their Potential for Restoration and Site Remediation. *Restor. Ecol.*, 12:106-116.
- Whiting S.N., Neumann P.M. and Baker A.J.M. 2003. Nickel and zinc hyperaccumulation by *Alyssum murale* and *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae) do not enhance survival and whole-plant growth under drought stress. *Plant, Cell Environ.*, 26: 351-360.

- Wiatrowski H.A. and Barkay T. 2005. Monitoring of microbial metal transformations in the environment. *Cur. Opin. Biotechnol.*, 16: 261-268.
- Wild H. 1978. The vegetation of heavy metal and other toxic soils. In: Werger M.J.A. (ed.), *Biogeography and Ecology of southern Africa*. The Hague, Junk.
- Withman W.B., Coleman D.C. and Wiebe W.J. 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6578-6583.
- Woese C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 51: 221-271.
- Woese C. and Fox G. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5088-90.
- Wong M.H. 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere*, 50:775-780.
- Xu P., Zeng G.M., Huang D.L., Feng C.L., Hu S., Zhao M.H., Lai C., Wei Z., Huang C., Xie G.X. and Liu Z.F. 2012. Use of iron oxide nanomaterials in wastewater treatment: a review. *Sci. Total Environ.*, 424: 1-10.
- Xue D., Yao H.Y., Ge D.Y. and Huang C.Y. 2008. Soil microbial community structure in diverse land use systems: A comparative study using Biolog, DGGE, and PLFA analyses. *Pedosphere*. 18:653-663.
- Yao H., He Z., Wilson M.J. and Campbell C.D. 2000. Microbial biomass and community structure in a sequence of soils with increasing fertility and changing land use. *Microbiol. Ecol.*, 40: 223-237.
- Yap W.H., Zhang Z. and Wang Y. 1999. Distinct types of rRNA operons exist in the genome of the actinomycete *Thermomonospora chromogena* and evidence for horizontal transfer of an entire rRNA operon. *J. Bacteriol.* 181:5201-5209.
- Yoon J., Cao X., Zhou Q. and Ma L.Q. 2006. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Sci. Total Environ.*, 368:456-464.
- Zak J.C., Willig M.R., Moorhead D.L. and Wildman H.G. 1994. Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach. *Soil Biol. Biochem.*, 26:1101-1108.
- Zappi M.E., Rogers B.A., Teeter C.L., Gunnison D. and Bajpai R. 1996. Bioslurry treatment of a soil contaminated with low concentrations of total petroleum hydrocarbons. *J. Hazard. Mater.*, 46: 1-12.
- Zhang C., Wu L., Luo Y., Zhang H. and Christie P. 2008. Identifying sources of soil inorganic pollutants on a regional scale using a multivariate statistical approach: role of pollutant migration and soil physicochemical properties. *Environ. Pollut.*, 151:470-476.
- Zhang C. 2006. Using multivariate analyses and GIS to identify pollutants and their spatial patterns in urban soils in Galway, Ireland. *Environ. Pollut.*, 142:501-511.
- Zhao F.J., Hamon R.E., Lombi E., McLaughlin M.J. and McGrath S.P. 2002. Characteristics of cadmium uptake in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J. Exp. Bot.*, 53:535-543.
- Zhu J., Zhang J., Li Q., Han T., Xie J., Hu Y. and Chai L. 2013. Phylogenetic analysis of bacterial community composition in sediment contaminated with multiple heavy metals from the Xiangjiang River in China. *Mar. Pollut. Bull.*, 70:134-139.
- Zhu Y.G., Chen S.B. and Yang J.C. 2004. Effects of soil amendments on lead uptake by two vegetable crops from a lead-contaminated soil from Anhui, China. *Environ. Int.*, 30:351-356.
- Zuckermandl E. and Pauling L. 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins, pp. 97-166 in *Evolving Genes and Proteins*, edited by V. Bryson and H.J. Vogel. Academic Press, New York.

**ANNEXE**

## METAL CONCENTRATIONS FOR TESTING BACTERIA RESISTANCE – MOROCCO

### CHROMIUM (Cr)

#### Converting mg/Kg in mg/L

[Cr]<sub>max</sub> = 222.16 mg/Kg ⇒ test 444 mg/Kg

444 mg Cr ----- 1000 g soil  
x ----- 0.150 g soil (weight used for extraction)      x = 0.066 mg Cr

0.066 mg Cr ----- 0.150 g soil  
0.066 mg Cr ----- 25 ml extraction volume  
x ----- 1000 ml      x = 2.66 mg Cr /L

#### . Preparing agar contaminated with Cr at 2.66 mg/L:

##### **i) mass of Cr needed to prepare 100 ml of a 100 mg/L stock solution**

100 mg/L = m/0,050 L

m = **10 mg Cr**

##### **ii) mass of Cr<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> xH<sub>2</sub>O needed to have 10 mg of Cr**

Cr<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> xH<sub>2</sub>O (#158)

Sigma Aldrich ref.: 342432

CAS no. 15244-38-9

M = 392,18 g/mol

M (Cr) = 51,99 g/mol

392.18 g/mol Cr<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> xH<sub>2</sub>O ----- 103.99 g/mol Cr

x ----- 0.010 g Cr

x = **37.7 mg** Cr<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> xH<sub>2</sub>O to prepare 100 ml of Cr solution at 100 mg/L

with distilled water

This solution has to be filtered through 0.22 µm in a sterilized chamber into a sterilized plastic vessel w/lid.

##### **iii) volume of stock solution needed for contaminating agar with Cr at 2.66 mg/L**

2.66 mg/L x 500ml agar = 100 mg/L x V

V = **13.32ml** Cr solution to inoculate into 486.68 ml agar (TSA)

### COPPER (Cu)

#### . Converting mg/Kg in mg/L

[Cu]<sub>max</sub> = 100 mg/Kg ⇒ test 200 mg/Kg

200 mg Cu ----- 1000 g soil  
x ----- 0.150 g soil (weight used for extraction)      x = 0.030 mg Cu

0.030 mg Cu ----- 0.150 g soil  
0.030 mg Cu ----- 25 ml extraction volume  
x ----- 1000 ml      x = 1.2 mg Cu /L

#### . Preparing agar contaminated with Cu at 1.2 mg/L:

##### **i) mass of Cu needed to prepare 100ml of a 100 mg/L stock solution**

100 mg/L = m/0,100 L

m = **10 mg Cu**

##### **ii) mass of CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O needed to have 10 mg of Cu**

CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (# 59)

Merck ref.: 1.02790

CAS no. 7758-99-8

M = 249.68 g/mol

M (Cu) = 63,55 g/mol

249.68 g/mol CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O ----- 63.55 g/mol Cu

x ----- 0.010 g Cu

x = **39.2 mg** CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O to prepare 100 ml of Cu solution at 100 mg/L with distilled water

This solution has to be filtered through 0.22 µm in a sterilized chamber into a sterilized glass with a lid.

**iii) volume of stock solution needed for contaminating agar with Cu at 1.2 mg/L**

$$1.2 \text{ mg/L} \times 500 \text{ ml agar} = 100 \text{ mg/L} \times V$$

$$V = \mathbf{6 \text{ ml}}$$
 Cu solution to inoculate into 494 ml agar (TSA)

**CADMIUM (Cd)**

Converting mg/Kg in mg/L

$$[\text{Cd}]_{\text{max}} = 21 \text{ mg/Kg} \Rightarrow \text{test } 42 \text{ mg/Kg}$$

$$42 \text{ mg Cd} \text{ ----- } 1000 \text{ g soil}$$

$$x \text{ ----- } 0.150 \text{ g soil (weight used for extraction)}$$

$$x = 6.3 \times 10^{-3} \text{ mg Cd}$$

$$6.3 \times 10^{-3} \text{ mg Cd} \text{ ----- } 0.150 \text{ g soil}$$

$$6.3 \times 10^{-3} \text{ mg Cd} \text{ ----- } 25 \text{ ml extraction volume}$$

$$x \text{ ----- } 1000 \text{ ml}$$

$$x = 0.252 \text{ mg Cd /L}$$

Preparing agar contaminated with Cd at 0.252 mg/L:

**i) mass of Cd needed to prepare 100ml of a 100 mg/L stock solution**

$$100 \text{ mg/L} = m/0,100 \text{ L}$$

$$m = \mathbf{10 \text{ mg Cd}}$$

**ii) mass of CdCl<sub>2</sub> needed to have 1 mg of Cd**

CdCl<sub>2</sub> (# 178)

Acròs ref.: 296330250

CAS no. 10108-64-2

M = 183.31 g/mol

M (Cd) = 112,41 g/mol

$$183.31 \text{ g/mol CdCl}_2 \text{ ----- } 112.41 \text{ g/mol Cd}$$

$$x \text{ ----- } 0.01 \text{ g Cd}$$

$$x = \mathbf{16.3 \text{ mg}}$$
 CdCl<sub>2</sub> to prepare 100 ml of Cd solution at 10 mg/L with distilled

water

This solution has to be filtered through 0.22 µm in a sterilized chamber into a sterilized glass with a lid.

**iii) volume of stock solution needed for contaminating agar with Cd at 0.252 mg/L**

$$0.252 \text{ mg/L} \times 500 \text{ ml agar} = 100 \text{ mg/L} \times V$$

$$V = \mathbf{1.26 \text{ ml}}$$
 Cd solution to inoculate into 487.4 ml agar (TSA)

**Tableau 1.** Les résultats moyens de l'DO à 163,5 h des plaques EcoPlaque Biolog des différents échantillons

	T11	T12	T13	T14	T15	T21	T22	T23	T24	T25	T31	T32	T33	T34	T35	T41	T42	T43	T44	T45	REF
A2	0,313	0,216	0,421	0,050	0,991	0,135	0,047	0,557	0,578	0,328	0,079	0,072	0,051	0,298	0,178	0,105	0,120	0,092	0,176	0,226	1,390
A3	0,156	0,650	0,177	0,137	0,587	0,203	0,401	0,718	0,485	0,348	0,149	0,195	0,082	0,602	0,432	0,154	0,033	0,270	0,164	0,003	1,351
A4	0,400	0,450	0,392	0,065	0,604	0,060	0,462	0,603	0,609	0,546	0,855	0,074	0,027	0,615	0,179	0,105	0,424	0,724	0,124	0,267	0,678
B1	0,899	1,054	1,182	0,143	0,700	0,553	0,719	1,766	1,014	0,566	1,440	1,007	0,314	0,720	1,010	0,167	0,483	1,486	0,730	0,283	1,126
B2	0,134	0,015	0,062	0,035	0,523	0,060	0,023	0,612	0,274	0,049	0,065	0,143	0,096	0,205	0,116	0,026	0,119	0,110	0,146	0,088	1,080
B3	0,070	1,062	0,518	0,047	0,839	0,609	0,029	1,588	0,475	0,080	0,052	0,523	0,051	0,368	0,545	0,056	0,367	0,932	0,544	0,005	1,083
B4	0,585	0,947	0,271	0,000	1,528	0,243	0,194	1,301	1,285	0,104	0,263	0,094	0,055	1,255	0,806	0,000	0,123	0,681	0,760	0,511	1,966
C1	0,267	0,542	0,235	0,000	0,963	0,156	0,000	0,573	0,495	0,205	0,087	0,425	0,000	0,733	0,288	0,000	0,001	0,248	0,450	0,000	0,532
C2	0,019	0,050	0,027	0,000	0,001	0,066	0,000	0,365	0,016	0,000	0,000	0,020	0,067	0,174	0,027	0,000	0,068	0,045	0,035	0,000	1,027
C3	0,138	0,001	0,037	0,076	0,063	0,044	0,031	0,050	0,106	0,089	0,105	0,043	0,000	0,151	0,010	0,073	0,068	0,086	0,018	0,062	0,042
C4	0,021	0,754	0,535	0,003	0,429	0,027	0,296	1,319	0,656	0,181	0,596	0,375	0,000	0,891	0,916	0,067	0,037	0,947	0,073	0,056	0,177
D1	0,295	0,288	0,219	0,000	0,735	0,282	0,416	0,388	0,269	0,275	0,441	0,259	0,016	0,415	0,239	0,197	0,000	0,617	0,125	0,000	1,103
D2	0,718	1,142	0,801	0,106	1,907	0,272	0,161	1,565	1,477	0,593	1,016	0,581	0,178	0,839	1,004	0,073	0,356	1,279	0,766	0,453	2,005
D3	0,374	0,895	0,714	0,057	0,941	0,057	0,323	1,061	0,873	0,126	0,775	0,444	0,071	0,609	0,202	0,123	0,094	0,570	0,061	0,016	1,167
D4	0,000	0,000	0,091	0,000	0,131	0,014	0,021	0,232	0,144	0,000	0,050	0,063	0,034	0,116	0,053	0,000	0,052	0,017	0,105	0,081	0,983
E1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	0,000	0,000	0,000	0,518	0,003	0,000	0,014	0,000	0,028	0,030	0,002	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000
E2	0,178	0,584	0,666	0,081	1,215	0,291	0,172	0,552	0,950	0,400	0,617	0,093	0,220	0,586	0,295	0,141	0,222	0,754	0,225	0,112	1,782
E3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,081	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,107	0,000	0,031	0,025	0,032	0,000	0,041	0,047
E4	0,069	0,042	0,170	0,029	0,157	0,028	0,121	0,217	0,033	0,022	0,175	0,289	0,119	0,168	0,048	0,029	0,067	0,280	0,066	0,036	0,145
F1	0,402	0,494	0,343	0,109	0,592	0,108	0,144	0,775	1,094	0,139	0,171	0,122	0,043	0,104	0,353	0,086	0,167	0,367	0,161	0,213	0,028
F2	0,302	0,723	0,308	0,053	1,151	0,039	0,593	0,807	0,417	0,164	0,224	0,533	0,000	0,445	0,000	0,000	0,048	0,836	0,001	0,000	0,149
F3	0,000	0,011	0,000	0,020	0,217	0,005	0,000	0,109	0,110	0,191	0,109	0,000	0,042	0,156	0,137	0,000	0,072	0,148	0,159	0,000	0,777
F4	0,000	0,131	0,078	0,066	0,144	0,015	0,007	0,000	0,022	0,017	0,037	0,047	0,034	0,310	0,000	0,000	0,056	0,239	0,077	0,000	0,396
G1	1,206	0,810	0,732	0,159	1,694	0,142	0,164	0,839	0,809	0,292	0,378	0,240	0,836	1,002	0,306	0,105	0,349	0,391	0,238	0,640	1,847
G2	0,080	0,252	0,086	0,000	0,478	0,091	0,121	0,210	0,010	0,072	0,084	0,038	0,111	0,262	0,006	0,002	0,093	0,088	0,000	0,276	0,920
G3	0,000	0,066	0,000	0,055	0,066	0,041	0,010	0,047	0,040	0,039	0,013	0,018	0,069	0,143	0,078	0,000	0,038	0,099	0,070	0,000	0,046
G4	0,112	0,002	0,020	0,000	0,111	0,049	0,086	0,073	0,038	0,076	0,056	0,021	0,099	0,110	0,016	0,043	0,064	0,066	0,045	0,000	0,007
H1	0,012	0,000	0,042	0,002	0,081	0,000	0,000	0,223	0,044	0,000	0,000	0,000	0,000	0,028	0,000	0,000	0,000	0,000	0,031	0,033	0,418
H2	0,051	0,131	0,134	0,051	0,152	0,045	0,144	0,076	0,167	0,064	0,121	0,004	0,108	0,202	0,021	0,026	0,010	0,092	0,034	0,000	0,189
H3	0,635	1,012	0,385	0,099	0,854	0,088	0,156	0,771	0,838	0,290	0,667	0,407	0,128	0,566	0,699	0,140	0,139	0,386	0,608	0,072	0,959
H4	0,072	0,051	0,008	0,119	0,427	0,049	0,000	0,036	0,036	0,046	0,112	0,093	0,124	0,136	0,387	0,133	0,054	0,192	0,166	0,048	1,621



