

UNIVERSITE PARIS EST
ECOLE DOCTORALE SCIENCE DE LA VIE ET DE LA SANTE

Thèse de Doctorat

Spécialité

ECOLOGIE MICROBIENNE

Présentée par

Thi My Dung HUYNH

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS EST

**IMPACTS DES METAUX LOURDS SUR
L'INTERACTION PLANTE/ VER DE TERRE/
MICROFLORE TELLURIQUE**

Soutenue le 22 décembre 2009

Devant le jury composé de :

Pr Philippe MORA, Université Paris Est-Créteil

Président

Pr Alain LEPRETRE, Université Lille 1

Rapporteur

Pr Jun DAI, South China Agricultural University

Rapporteur

Dr Franck POLY, Université Claude Bernard Lyon 1

Examineur

Dr Thi Anh Thu PHAM, Université Paris Est-Créteil

Examineur

Pr Thi My Hanh DIEP, Université des Sciences Naturelles, Vietnam

Co-directrice de thèse

Pr Corinne ROULAND-LEFEVRE, IRD

Directrice de thèse

*A mes parents
A ma famille
A ma sœur
A Barthélemy*

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé principalement dans le Laboratoire d'Interactions BIOlogiques dans les Sols (IBIOS) (UMR 211 – BIOEMCO) de l'IRD à Bondy, institut qui a également attribué une bourse pour la réalisation de cette thèse. Je voudrais ainsi remercier les autorités administratives et scientifiques de l'IRD pour les moyens déployés pour sa réalisation et leur exprimer toute ma reconnaissance pour les enseignements, conseils et encouragements qu'ils m'ont apportés durant ces trois années.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à Madame Le Professeur Corinne Rouland-Lefèvre, directrice de ma thèse. Avec sa disponibilité, son savoir-faire, ses conseils, elle m'a permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions. Sa compétence, sa patience, son enthousiasme et l'attention particulière avec laquelle elle a suivi et dirigé ce travail ont permis son aboutissement à temps. De Corinne, j'ai acquis une méthodologie de travail bien organisée afin de ne pas se tromper de chemin. Je la remercie de m'avoir accompagné dans la nuit entre le laboratoire et chez moi, je n'oublierai jamais qu'elle a travaillé jusqu'à très tard pendant la rédaction de mon manuscrit. Merci pour tout !

Je tiens à remercier Monsieur Alain Leprêtre, Professeur à l'Université Lille 1 et Monsieur Dai Jun, Professeur à l'Université « South China Agricultural » pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs. Merci pour votre disponibilité pour la lecture de ce mémoire et aussi d'avoir accepté de juger cette thèse.

Ce travail a été aussi réalisé grâce à différents laboratoires que je tiens ici à remercier :

Au Vietnam :

Je remercie tout d'abord Mme Thi My Hanh Diep, co-directrice de ma thèse, qui a accepté de m'accueillir dans son laboratoire et de me confier le travail sur la plante *Lantana camara*. Tous mes remerciements également aux personnes qui m'ont aidé pour l'expérimentation à Binh Duong – Ho Chi Minh Ville : Lam, Van, Phuong, Trung, Julie.

Je voudrais remercier le Professeur Le Dinh Don, directeur du laboratoire de Biotechnologie de l'Université de l'Agriculture et de la Forêt de Ho Chi Minh Ville, ainsi que toutes les personnes qui travaillent dans ce laboratoire pour leur précieuse aide. Je tiens à exprimer mes remerciements à mes deux étudiants de licence, Phuong Hoa et Hoang Phuc.

En France :

Ayant effectué un stage sur la technique DGGE au CNRS de Lyon, j'exprime tout d'abord ma profonde gratitude à Mr Franck Poly qui a accepté de m'accueillir dans son équipe au laboratoire d'Ecologie Microbienne (CNRS – Lyon) depuis mon Master 2, et suite à ce stage, d'être examinateur de cette thèse. Merci pour sa grande disponibilité, ses conseils, sa sympathie, tout ceci malgré la distance entre Paris et Lyon. Je tiens à particulièrement remercier Eléonore qui m'a énormément aidé en ce qui concerne cette technique.

J'ai aussi travaillé sur la méthode Biolog au laboratoire d'IBIOS à Créteil et je tiens à remercier le Professeur Philippe Mora pour son accueil, ses conseils et sa gentillesse. Je remercie également, la technicienne Stéphanie, la secrétaire Suzanne, les permanents Michel, Virginie et particulièrement Edouard. Je tiens aussi à remercier Madame Anh Thu Pham Thi pour ses conseils au tout début de l'expérimentation et Monsieur Noureddine Bousserhine pour le protocole Biolog.

Enfin, ayant travaillé principalement dans le laboratoire IBIOS de l'IRD à Bondy, je tiens à remercier le directeur de l'IRD de Bondy Monsieur Georges De Noni pour ses encouragements.

Je tiens à remercier Madame Anne Pando pour son expérience qu'elle m'a fait partager, ses conseils, ses encouragements, et la correction du manuscrit.

Je tiens à remercier Monsieur Alain Robert, qui m'a supportée pendant la rédaction de ma thèse, merci pour son aide, ses conseils, la correction du manuscrit, merci également à sa femme qui a réservé du temps à l'orthographe et la ponctuation de mon manuscrit.

Merci également à Madame Jocelyne Roman, qui m'a aidé pour la culture fongique, ses encouragements, son amitié.

Je remercie Annick pour les photographies et son amitié. Merci aussi pour m'avoir aidée à imprimer cette mémoire.

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Patrick Lavelle pour la démonstration de l'identification du ver de terre et ses conseils sur ce projet.

Je remercie également tous les permanents du laboratoire, Manuel pour ses conseils, son idée de la technique Biolog, Jérôme pour les statistiques, Florence pour son soutien moral et les statistiques (R), Nuria pour son aide sur les statistiques (ADE-4), Thierry, Sébastien, sans oublier les deux secrétaires du laboratoire Annabelle et Sandrine.

Je remercie les étudiants du laboratoire, Thomas, Joseph, Anouar, Trang, Chi, Fatima, Anan, et mon étudiante en licence, Taline. Sans oublier les amis de Lyon, Martina, Afi, Amandine, Nelly.

Je tiens à remercier les étudiants vietnamiens Chi, Linh, Khanh et spécialement Minh Thu qui a beaucoup partagé de moments avec moi.

Merci infiniment à Diana pour son aide à la rédaction des articles en Anglais.

Merci à tous ceux qui ont soutenu cette aventure de près et de loin.

Enfin, un grand merci à Solange et Joseph, Pierre, Thomas, et Jacques qui m'ont apporté la chaleur d'une deuxième famille et qui ont compensé l'absence de ma famille au Vietnam.

My Dung HUYNH

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
PARTIE A : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
I. Métaux lourds.....	4
I.1 Définition des « métaux lourds ».....	4
I.2 Origine de la contamination des sols par les métaux lourds	6
I.3 Mobilité et disponibilité des métaux lourds.....	7
I.4 Pollution par les métaux lourds : le cas du plomb.....	11
II. Effet des métaux lourds sur les microorganismes du sol.....	11
II.1 Biomasse.....	12
II.2 Structure de la communauté microbienne.....	13
II.3 Activité enzymatique.....	13
II.4 Différentes approches méthodologiques.....	14
III. Techniques de dépollution.....	14
III.1 Principe de la technique de phytoremédiation.....	15
III.2 Phytoextraction des sols contaminés par les métaux lourds.....	16
III.2.1 Phytoextraction induite.....	17
III.2.2 Phytoextraction continue.....	18
III.2.3 Avantages et limites de la technique de phytoextraction.....	19
IV. Ver de terre, « organisme ingénieur » des sols.....	22
IV.1 Ver de terre.....	22
IV.2.1 Concept d'« ingénieurs de l'écosystème ».....	22
IV.2.2 Taxonomie et catégories écologiques.....	22
IV.2 Impact favorable des vers de terre.....	24
IV.2.1 Galeries.....	25
IV.2.2 Turricules.....	26
IV.3 Ver de terre et métaux lourds.....	27

PARTIE B : MATERIEL ET METHODES.....	29
I. PRESENTATION DES COMPOSANTS BIOLOGIQUES.....	29
I.1 La plante « hyperaccumulatrice » <i>Lantana camara</i> L.....	29
I.1.1 Description et caractéristiques.....	29
I.1.2 <i>Lantana camara</i> et phytoremédiation.....	30
I.2 Le ver de terre, <i>Pontoscolex corethrurus</i>	30
I.2.1 Description et caractéristiques.....	30
I.2.2 Avantages de ce ver.....	30
II. MISE EN PLACE DES EXPERIMENTATIONS.....	31
II.1 Site d'étude.....	31
II.2 Matériel.....	32
II.2.1 Les pots.....	32
II.2.2 Le sol.....	32
II.2.3 La plante.....	33
II.2.4 Le ver de terre.....	33
II.2.5 Le plomb.....	34
II.3 Plan de l'expérience.....	34
III. DEMONTAGE DES MICROCOSMES.....	36
III.1 La plante.....	36
III.2 Les échantillons de sol.....	36
IV. ANALYSES PHYSIQUES ET CHIMIQUES.....	38
IV.1 Propriétés physiques et chimiques.....	38
IV.2 Teneur en plomb des plantes.....	38
V. TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES.....	39
V.1 Dosages enzymatiques.....	39
V.1.1 Préparation des solutions de sol.....	39
V.1.2 Dosage des phosphatases acide et alcaline.....	39
V.1.3 Dosage des polysaccharides.....	39
V.1.4 Dosage des hétérosidases.....	40
V.1.5 Dosage des uréases.....	40
V.1.6 Dosage de la FDA.....	40

V.2	Culture microbienne et profil physiologique.....	41
V.2.1	Numération bactérienne.....	41
V.2.2	Numération fongique.....	41
V.2.3	Profil physiologique – BIOLOG.....	42
VI.	TECHNIQUES MOLECULAIRES.....	42
VI.1	Extraction ADN à partir de souches fongiques pures.....	42
VI.2	Extraction de l'ADN génomique total du sol et des agrégats.....	43
VI.3	Contrôle et purification de l'ADN extrait.....	44
VI.4	Amplification de l'ADN par Polymerase Chain Reaction (PCR).....	44
VI.5	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE).....	48
VI.6	Identification et analyse des produits d'amplification	48
VII.	ANALYSES STATISTIQUES.....	48
PARTIE C : RESULTATS.....		49
CHAPITRE I : EFFET DES VERS SUR LA CROISSANCE DE LANTANA CAMARA ET SUR LA PHYTOEXTRACTION DU PLOMB.....		49
A/ <i>Pontoscolex corethrurus</i>.....		49
A.1	Survie	49
A.2	Production de structures biogéniques turricules.....	50
B/ <i>Lantana camara</i>.....		51
B.1	Observation des plantes.....	51
B.2	Suivi de la croissance des plantes pendant l'expérimentation.....	52
B.3	Comparaison des croissances en fin d'expérimentation.....	53
B.4	Etude de la biomasse.....	54
C/ Article 1 : Impact de la présence du vers, <i>Pontoscolex corethrurus</i> sur l'absorption de plomb par la plante, <i>Lantana camara</i>		
1.	Introduction.....	57
2.	Matériel et méthodes.....	58
3.	Résultats.....	60

4. Discussion.....	61
5. Références.....	64
D/ Discussion.....	68
CHAPITRE II : CARACTERISATION DES AGREGATS RACINAIRES.....	71
A/ Comparaison des propriétés physico-chimiques des agrégats racinaires obtenus dans les différents types d'expérimentation.....	71
A.1 Comparaison entre les échantillons du sol et les agrégats.....	73
A.2 Comparaison entre les différents types d'agrégats racinaires.....	73
A.3 Discussion.....	77
B/ Activités enzymatiques.....	80
B.1 Comparaison entre les échantillons de sol et les agrégats.....	81
B.2 Action des vers et/ou du Pb sur l'activité biologique des agrégats racinaires.....	83
B.2.1 Cycle du carbone.....	83
B.2.2 Cycle de l'azote.....	84
B.2.3 Cycle du phosphore.....	85
B.2.4 Fluorescéine diacétate hydrolase (FDA).....	85
B.2.5 Analyse en composante principale (ACP).....	86
B.2.6 Dendrogramme.....	87
B.3 Discussion.....	88
CHAPITRE III : ETUDE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DES AGREGATS RACINAIRES	90
A/ Communautés bactériennes.....	90
A.1 Densité.....	90
A.2 Diversité génétique	91
A.3 Diversité fonctionnelle.....	97
A.3.1 Evolution des valeurs d'AWCD en fonction du temps d'inoculation.....	98
A.3.2 Activité totale et AWCD.....	99
A.3.3 Capacités de dégradation et indice de Shannon.....	99
A.3.4 Activités par catégories biochimiques.....	100
A.3.5 Analyse en composante principale des catégories biochimiques.....	102

B/ Communauté fongique.....	103
B.1 Densité fongique cultivable.....	103
B.2 Diversité de la mycoflore cultivable.....	104
B.3 Détermination taxonomique des 7 souches fongiques sélectionnées.....	107
B.4 Etude moléculaire des communautés fongiques.....	108
C/ Discussion.....	111
1/ Evolution de la microflore bactérienne en présence de plomb et/ou de ver.....	111
2/ Effet du Pb et/ou du ver sur la structure des communautés bactériennes.....	112
3/ Diversité bactérienne fonctionnelle.....	113
4/ Densité et diversité de la mycoflore en présence de plomb et/ou de ver.....	115
PARTIE D : DISCUSSION-CONCLUSION GENERALE.....	117
REFERENCES.....	122
ANNEXE.....	145

INTRODUCTION GENERALE

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 : en agriculture par l'application de boues d'épuration ou dans l'industrie métallurgique. 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 d'elle, la phytoremédiation, exploite les propriétés de certaines plantes à accumuler de grandes quantités de métaux lourds (Rufus *et al.*, 1997, Salt *et al.*, 1998, Prabha *et al.*, 2007). 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 la phytoremédiation 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 al.*, 2007 ; Salt *et al.*, 1998 ; Singh *et al.*, 2003).

Pour l'amélioration des rendements, la plupart des études sur ce thème concernent la sélection de plantes hyperaccumulatrices et leur rhizosphère ; par contre peu d'études prennent en compte le compartiment fonctionnel du sol que constitue la drilosphère (zone d'influence des vers de terre sur le sol) (Wenzel, 2009 ; Kuffner *et al.*, 2008). Pourtant les vers de terre en tant qu'ingénieurs écologiques jouent un rôle important dans leur environnement (Derouard *et al.*, 1996 ; Bohlen, 2002 ; Dechaine *et al.*, 2005 ; Tapie-Coral *et al.*, 2006). Les effets positifs des vers de terre sur la production végétale ont été déjà largement montrés. Par ailleurs, les métaux lourds ont des effets d'intensité variable sur les vers de terre selon les espèces (Weltje, 1998 ; Morgan, 1999). Ces effets varient également suivant la nature du métal, sa forme chimique et les propriétés du sol (Ma *et al.*, 2002).

Enfin, l'impact toxique des métaux lourds sur les communautés bactériennes telluriques a fait l'objet de très nombreuses études (Giller *et al.*, 1997 ; Belyaeva *et al.*, 2005 ; Khan et Scullion, 2002 ; Khalil *et al.*, 1996). 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 microorganismes 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.

Ce projet présente donc l'originalité d'aborder la question des interactions vers de terre/ plantes/ microorganismes telluriques du sol sous l'action des métaux lourds. En effet, si les travaux concernant les interactions plantes/métaux lourds et métaux lourds/vers de terre sont nombreux, il existe très peu d'étude jusqu'à présent qui ont pris en compte ces trois facteurs simultanément. Notre objectif majeur est de déterminer si les interactions entre les deux compartiments que sont la rhizosphère (plante) et la drilosphère (ver) ont un impact sur les activités microbiennes. Ces interactions pourraient en retour influencer sur les processus de phytoextraction.

De cet objectif se dégagent trois questions scientifiques majeures sur lesquelles s'appuient nos travaux de recherche :

- (1) Les métaux lourds, dans notre cas le plomb, ont-ils une influence sur la plante « phytoremédiatrice »?
- (2) Quelle est la contribution des vers de terre à la biomasse végétale et à la capacité de phytoremédiation de la plante?
- (3) La réponse des communautés microbiennes (bactéries et champignons) dans un contexte complexe plante phytoremédiatrice/ver de terre/métaux lourds, jouent-elles un rôle sur la croissance de la plante et l'efficacité de l'hyperaccumulation ?

Pour répondre à ces interrogations, une expérimentation a été menée sur le terrain (Ho Chi Minh Ville - Vietnam) avec une plante hyperaccumulatrice (*Lantana camara* L.) et un ver de terre (*Pontoscolex corethrurus*) dans un sol contaminé par l'ajout d'une solution de Pb à

différentes concentrations. Les résultats obtenus sont présentés dans un mémoire articulé autour de 3 parties :

Une synthèse bibliographique qui retrace les connaissances actuelles sur les métaux lourds et leurs effets sur les microorganismes du sol, sur les mécanismes principaux de la technique de phytoremédiation, et sur les interactions vers de terre/plantes et vers/métaux lourds.

Une partie matériel et méthode où sont décrits le matériel biologique utilisé, le protocole expérimental et les techniques d'analyse.

La troisième partie présente les résultats obtenus dans les 3 chapitres :

- (Chapitre C-I) Effet des vers sur la croissance de *Lantana camara* et sur la phytoextraction du Pb
- (Chapitre C-II) Caractérisation physico-chimique et activités biologiques des agrégats racinaires
- (Chapitre C-III) Etude de la diversité et des fonctions des communautés bactériennes et fongiques dans les agrégats racinaires

Nous concluons ce travail par une discussion générale et une conclusion.

PARTIE A : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I/ Métaux lourds

I.1 Définition des « métaux lourds »

D'un point de vue purement chimique, les éléments de la classification périodique formant des cations en solution sont des métaux.

D'un point de vue physique, le terme « métaux lourds » désigne les éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes (environ 65 éléments), caractérisés par une forte masse volumique supérieure à 5 g.cm^3 (Adriano, 2001) (Tableau 1).

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.

- (i) Les métaux essentiels sont des éléments indispensables à l'état de trace pour de nombreux processus cellulaires et qui se trouvent en proportion très faible dans les tissus biologiques (Loué, 1993). Certains peuvent devenir toxiques lorsque la concentration dépasse un certain seuil. C'est le cas du cuivre (Cu), du nickel (Ni), du zinc (Zn), du fer (Fe). Par exemple, le zinc (Zn), à la concentration du milli-molaire, est un oligo-élément qui intervient dans de nombreuses réactions enzymatiques (déshydrogénases, protéinase, peptidase) et joue un rôle important dans le métabolisme des protéines, des glucides et des lipides (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).
- (ii) Les métaux toxiques ont un caractère polluant avec des effets toxiques pour les organismes vivants même à faible concentration. Ils n'ont aucun effet bénéfique connu pour la cellule. C'est le cas du plomb (Pb), du mercure (Hg), du cadmium (Cd).

Le terme métaux lourds, « heavy metal », implique aussi une notion de toxicité. Le terme « éléments traces métalliques » est aussi utilisé pour décrire ces mêmes éléments, car ils se retrouvent souvent en très faible quantité dans l'environnement (Baker et Walker, 1989). Dans ce contexte, nous utiliserons le terme « métaux lourds » dans le sens de l'impact toxique sur les humains et les environnements.

CLASSIFICATION PERIODIQUE DES ELEMENTS

Période	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	
1 couche K	1 H Hydrogène																	2 He Hélium	
2 couche L	3 Li Lithium	4 Be Béryllium												5 B Bore	6 C Carbone	7 N Azote	8 O Oxygène	9 F Fluor	10 Ne Neon
3 couche M	11 Na Sodium	12 Mg Magnésium												13 Al Aluminium	14 Si Silicium	15 P Phosphore	16 S Soufre	17 Cl Chlore	18 Ar Argon
4 couche N	19 K Potassium	20 Ca Calcium	21 Sc Scandium	22 Ti Titane	23 V Vanadium	24 Cr Chrome	25 Mn Manganèse	26 Fe Fer	27 Co Cobalt	28 Ni Nickel	29 Cu Cuivre	30 Zn Zinc	31 Ga Gallium	32 Ge Germanium	33 As Arsenic	34 Se Sélénium	35 Br Brome	36 Kr Krypton	
5 couche O	37 Rb Rubidium	38 Sr Strontium	39 Y Yttrium	40 Zr Zirconium	41 Nb Niobium	42 Mo Molybdène	43 Tc Technétium	44 Ru Ruthénium	45 Rh Rhodium	46 Pd Paladium	47 Ag Argent	48 Cd Cadmium	49 In Indium	50 Sn Étain	51 Sb Antimoine	52 Te Tellure	53 I Iode	54 Xe Xénon	
6 couche P	55 Cs Césium	56 Ba Baryum	57 La Lanthane	58 Ce Cérite	59 Pr Praseodyme	60 Nd Néodyme	61 Pm Prométhée	62 Sm Samarium	63 Eu Europium	64 Gd Gadolinium	65 Tb Terbium	66 Dy Dysprosium	67 Ho Holmium	68 Er Erbium	69 Tm Thulium	70 Yb Ytterbium	71 Lu Lutécium		
7 couche Q	87 Fr Francium	88 Ra Radium	89 Ac Actinium	90 Th Thorium	91 Pa Protactinium	92 U Uranium	93 Np Neptunium	94 Pu Plutonium	95 Am Américium	96 Cm Curium	97 Bk Berkélium	98 Cf Californium	99 Es Einsteinium	100 Fm Fermium	101 Md Mendelevium	102 No Nobelium	103 Lw Lawrencium		

Légende

- nombre de masse de l'isotope le plus abondant = nombre de nucléons
- nombre atomique = nombre de protons
- masse molaire atomique en g.mol⁻¹
- symbole
- nom

■ Hydrogène
■ Métaux vrais
■ Métaux de transition
■ "Métalloïdes"
■ Non métaux
■ Gaz rares
■ Lanthanides
 Transuraniens

Tableau 1 : Classification périodique des éléments

I.2 Origine de la contamination des sols par les métaux lourds

Le problème principal avec les métaux lourds comme le plomb, le cadmium, le cuivre et le mercure est qu'ils ne peuvent pas être biodégradés, et donc persistent pendant de longues périodes dans des sols. Leur présence dans les sols peut être naturelle ou anthropogénique (Figure 1).

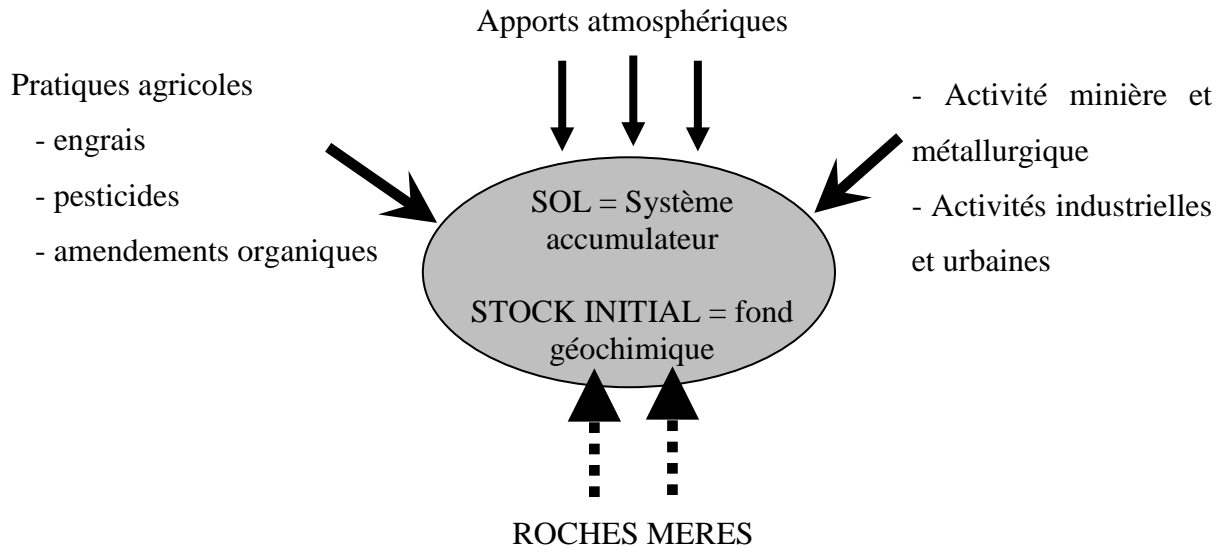


Figure 1: Origine des métaux lourds dans le sol (D'après Robert et Juste, 1999)

(a) Origine naturelle

Les métaux lourds sont présents naturellement dans les roches, ils sont libérés lors de l'altération de celles-ci pour constituer le fond géochimique (Bourelhier et Berthelin, 1998). La concentration naturelle de ces métaux lourds dans les sols varie selon la nature de la roche, sa localisation et son âge.

(b) Origine anthropique

Cependant, la source majeure de contamination est d'origine anthropique. Au cours des décennies dernières, l'apport de métaux lourds au sol dans le monde s'est étendu ; à l'heure actuelle on l'estime à 22000 tonnes de cadmium, 939000 t de cuivre, 783000 t de plomb, et 1350000 t de zinc (Singh *et al.*, 2003). Les principaux types de pollutions anthropiques responsables de l'augmentation des flux de métaux, sont la pollution atmosphérique (rejets urbains et industriels), la pollution liée aux activités agricoles et la pollution industrielle.

- La pollution atmosphérique résulte des activités industrielles (rejets d'usine) et urbaines (gaz d'échappement, etc....). Il faut distinguer les apports diffus aériens d'origine lointaine des apports massifs localisés d'origine proche. Dans les apports diffus sont classés les poussières et aérosols provenant des chauffages ainsi que des moteurs d'automobiles. Les apports massifs localisés résultent d'apports anthropiques accidentels liés aux activités industrielles sans protection efficace contre la dispersion dans l'environnement (Baize, 1997).
- Certaines pratiques agricoles sont à l'origine de l'introduction de métaux lourds dans le sol. Les produits destinés à améliorer les propriétés physico-chimiques du sol sont souvent plus riches en métaux lourds que le sol lui-même par exemple les engrais, les composts et les boues de station d'épuration (Robert et Juste, 1999).
- La pollution industrielle provenant des usines de production de l'activité humaine tels que les matières organiques et graisses (industries agro-alimentaires), les produits chimiques divers (industries chimiques), les matières radioactives (centrales nucléaires, traitement des déchets radioactifs) et la métallurgie (Godin *et al.*, 1985). Les déchets miniers et les terrils industriels sont une source particulièrement importante de pollution par le zinc, le plomb et le cadmium.

Le rôle des pratiques industrielles et agricoles dans la contamination des sols doit être pris en compte : cela concerne une grande partie du territoire. Leur accumulation et leur transfert constituent donc un risque pour la santé humaine via la contamination de la chaîne alimentaire, mais aussi pour le milieu naturel dans son ensemble (Bourrelier et Berthelin, 1998).

I.3 Mobilité et biodisponibilité des métaux lourds

La toxicité d'un métal dépend de sa spéciation (forme chimique) autant que des facteurs environnementaux (Babich, 1980). Dans le sol, les métaux lourds peuvent exister sous forme d'ion libre ou sous forme liée à des particules de sol. Cependant, un métal n'est toxique pour les organismes vivants que s'il est sous forme libre ; il est alors biodisponible. Comme tout élément chargé positivement, les cations métalliques peuvent interagir dans le sol avec toute particule organique ou minérale chargée négativement. De l'équilibre entre les formes libres et fixées de l'ion va dépendre sa biodisponibilité, directement liée à sa toxicité. Enfin, la biodisponibilité (Figure 2) des métaux lourds varie en fonction de plusieurs facteurs du sol.

Parmi lesquels, la capacité d'échange de cation (CEC), le pH, le potentiel redox (Eh), la teneur en phosphate disponible, la teneur en matière organique et les activités biologiques.

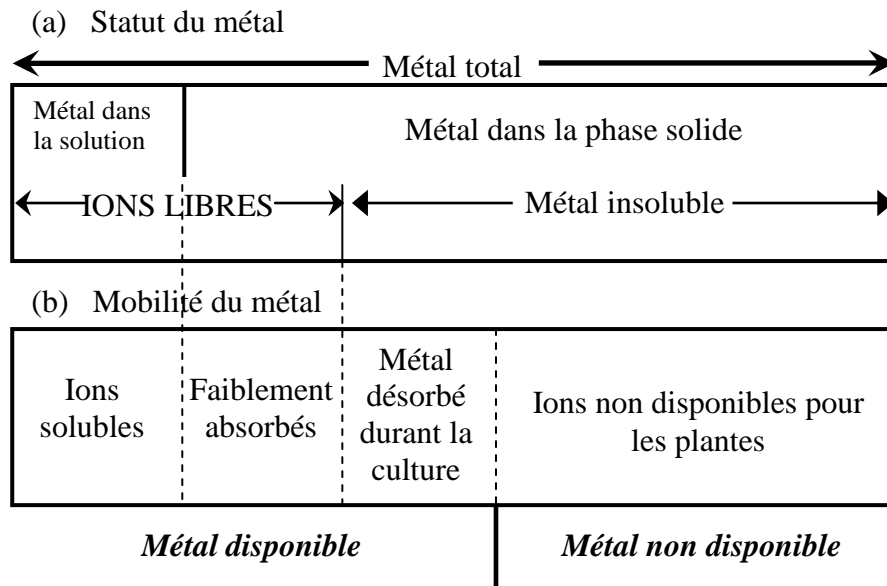


Figure 2: Schéma illustrant la mobilité des métaux lourds (D'après Shallari, 1997)

I.3.1 La teneur en argile

Les argiles, de par leurs propriétés physico-chimiques, jouent un rôle très important dans la disponibilité des métaux lourds. Li et Li (2000) ont montré que les métaux lourds peuvent être absorbés et immobilisés par les minéraux argileux ou également être complexés par la matière organique du sol en formant alors un complexe organométallique (Lamy, 2002). En effet, la charge électro négative des argiles les rend aptes à contracter des liaisons électrostatiques avec toute entité chargée positivement, comme les cations métalliques. Ces liaisons sont réversibles et les cations fixés sont échangeables : ils peuvent être remplacés par d'autres cations présents dans la phase aqueuse du sol. Cette capacité d'échange de cations (CEC) exprimée en milliéquivalents pour 100 g est une caractéristique importante de chaque argile qui conditionne grandement la biodisponibilité d'un métal dans le sol.

I.3.2 Le pH

Le pH est un autre facteur important influençant la solubilité et la spéciation du métal et donc sa toxicité (Babich et Stotzky, 1977a et b). Quand le pH diminue d'une unité, la

concentration des cations métalliques libres augmente d'environ un facteur 2 dans la solution de sol et par conséquent améliore la phytoextraction (Christensen, 1984 ; Sanders, 1983 ; Sanders *et al.*, 1986). Les organismes et les microorganismes eux-mêmes peuvent influencer la disponibilité des métaux lourds dans leur environnement proche par acidification locale lors d'une réaction métabolique ou par la production de composés complexant les métaux lourds (Giller *et al.*, 1998).

I.3.3 Le potentiel redox (Eh)

Le potentiel redox (Eh) permet de caractériser les échanges d'électrons entre les espèces chimiques. Ainsi, les faibles valeurs d'Eh favorisent la dissolution des hydroxydes et entraînent une augmentation de la concentration des métaux associés avec des composants (Chaignon, 2001). 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. Par exemple, en conditions réductrices, les sulfates sont réduits en sulfure qui piègent volontiers les éléments métalliques tels que Pb, Cd, Zn (Deneux-Mustin *et al.*, 2003).

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).

I.3.4 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. Nous nous attacherons à développer principalement l'action des microorganismes et des végétaux supérieurs.

Parmi les microorganismes 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 modes 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 chimiolithotrophes (*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. Les champignons et les racines des plantes excrètent eux aussi des acides afin d'augmenter leur absorption de nutriments, ou tout simplement comme déchets métaboliques (Foy *et al.*, 1978 ; Chaignon, 2001 ; Deneux-Mustin *et al.*, 2003). 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 se fait jusqu'aux plantes dans lesquelles ils s'accumulent (Chaignon, 2001).

- ➔ L'insolubilisation constitue le phénomène opposé. Bien que le phénomène de détoxification externe des métaux lourds par des exsudats racinaires n'ait jamais été démontré (Baker et Walker, 1990), 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 microorganismes sur le degré d'oxydation de l'espèce métallique. C'est le cas du mercure, de l'arsenic et du sélénium (Se). La biométhylation permet le transfert de groupements méthyl directement aux atomes, Pb, Sn (étain), As, Sb (antimoine) et Se, permettant leur volatilisation dans l'atmosphère.

I.4 Pollution par les métaux lourds : le cas du plomb

Le plomb (Tableau 1, page 6), élément du groupe IV-A du tableau périodique, de masse atomique 207,2 g/mol, possède une densité élevée de 11,3 g.cm⁻³. Le plomb possède un point de fusion de 327°C et sa température d'ébullition est d'environ 1700°C. Il est difficilement détruit, et non dégradable (Morlot, 1996). Dans le sol, le Pb peut se retrouver sous forme ionique, dissoute, ou liée plus ou moins fortement aux particules (Raskin et Ensley, 2000). L'accumulation de Pb, provenant des retombées atmosphériques, ou de déchets contaminés déposés sur le sol, se fait principalement dans les horizons de surface (Steckeman *et al.*, 2000) et plus précisément dans les horizons riches en matière organique. Les teneurs en Pb diminuent, ensuite, plus en profondeur (de Abreu *et al.*, 1998). Ceci s'explique par le fait que le Pb est peu mobile. Etant principalement associé aux argiles, aux oxydes, aux hydroxydes de fer et à la matière organique, il n'est mobile que lorsqu'il forme des complexes organiques solubles et/ou que le sol a dépassé sa capacité d'absorption pour le Pb (Morlot, 1996 ; Raskin et Ensley, 2000). Les principales sources de contamination en Pb sont les rejets anthropiques. Ils proviennent principalement des industriels qui extraient et purifient le Pb naturel et qui recyclent les composants contenant du Pb comme les batteries.

II/ Effet des métaux lourds sur les microorganismes du sol

Le sol est un compartiment de l'écosystème possédant de multiples fonctions comme : support pour les organismes et microorganismes vivants, réservoir de matière organique et minérale, lieu de transformations, système épurateur, régulateur des flux et des échanges dans les cycles biogéochimiques (cycle de l'azote, du carbone...) (Gobat *et al.*, 1998). De nombreux organismes participent à la réalisation de ces fonctions. Le sol est un remarquable réservoir de microorganismes. 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 microorganismes 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). L'importance écologique des bactéries du sol ne se limite pas à leur nombre ou à leur biomasse, même si ces paramètres y contribuent grandement. En effet, leur atout principal réside dans leur grande diversité génétique et fonctionnelle. La diversité bactérienne dans le sol est en effet plus importante que celle des environnements aquatiques (Torsvik et Ovreås, 2002). Cette diversité est à l'origine

d'un très large éventail de propriétés physiologiques mais aussi d'activités métaboliques et de fonctions que les bactéries peuvent accomplir dans le sol. La diversité métabolique couplée à leur imposante biomasse font que les bactéries du sol sont capables de métaboliser tous les composés naturels disponibles mais aussi la majorité des composés d'origine anthropique présents dans le sol, après un délai nécessaire à la mise en place des voies métaboliques. Les bactéries sont en effet les acteurs principaux des grands processus de transformation de la matière et des flux d'énergie dans le sol. Certaines étapes clé du cycle des éléments ne peuvent d'ailleurs être réalisées que par les bactéries. Leur disparition ne permet donc plus de garantir à long terme la fertilité du sol.

C'est pourquoi, 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 microorganismes 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.

II.1 Biomasse

Les métaux lourds sont réputés pour leur toxicité sur la plupart des microorganismes 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 microorganismes 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 (Kandeler *et al.*, 1996 ; Smit *et al.*, 1997, Bååth *et al.*, 1998 ; Konopka *et al.*, 1999 ; Kuperman et Carreiro, 1997 ; Kelly *et al.*, 1999 ; Ekelund *et al.*, 2003). D'ailleurs, Giller *et al.* (1998) estiment que, même à long terme et pour des faibles teneurs en métaux lourds, les microorganismes ne sont pas capables de maintenir une biomasse équivalente à celle d'un sol non pollué. Les expérimentations de Sandaa *et al.* (1999) ont montré qu'il y a une corrélation entre la diminution du nombre des génomes bactériens et les niveaux de concentration en métaux lourds. Dans le sol non contaminé, le génome bactérien est estimé à 16000/g de sol, dans le sol de contamination moyenne à 6400/g de sol et de seulement 2000/g de sol dans un sol fortement contaminé (Sandaa *et al.*, 1999).

II.2 Structure de la communauté microbienne (génétique et fonctionnelle)

Le stress par les métaux lourds entraîne des modifications plus ou moins drastiques dans la structure des communautés microbiennes telluriques. Les études de l'impact de métaux lourds sur la diversité de la communauté bactérienne dans le sol ont montré surtout une influence négative (Hirsch *et al.*, 1993 ; Hinojosa *et al.*, 2005 ; Moffett *et al.*, 2003 ; Smit *et al.*, 1997 ; Sandaa *et al.*, 2001). Les bactéries et les champignons isolés à partir de sols pollués sont plus tolérants à une forte contamination par les métaux lourds que ceux des sols non pollués (Doelman *et al.*, 1994 ; Huysman *et al.*, 1994 ; Mertens *et al.*, 2006). L'ajout de métaux lourds entraîne donc la disparition des populations les plus sensibles et subséquemment l'adaptation des populations les plus résistantes. Ainsi, les équilibres peuvent basculer et les dominances s'inverser (Díaz-Roviña et Bååth, 1996). Il a été montré que les modifications des communautés suite à la présence de cuivre pouvaient entraîner une augmentation de la proportion relative des bactéries Gram négatifs (Protéobactéries) (Turpeinen *et al.*, 2004) ou au contraire des Gram positifs (Firmicutes) (Ekelund *et al.*, 2003). Rasmussen et Sørensen (2001) ont analysé l'effet du mercure sur la diversité bactérienne en calculant l'indice de diversité de Shannon à partir des bandes obtenues en électrophorèse DGGE. Ils ont montré qu'après une légère diminution de la diversité, celle-ci tendait à augmenter lentement et constamment le reste du temps de l'expérience. La diversité estimée à la fin de l'incubation est supérieure à la diversité initiale. Ces résultats suggèrent l'établissement d'une nouvelle communauté adaptée, caractérisée par de nouvelles espèces dominantes et par une diversité plus importante (Rasmussen et Sørensen, 2001).

II.3 Activité enzymatique

D'autres propriétés biologiques largement étudiées dans les études d'impact concernent les activités enzymatiques, dont les activités respiratoires. L'effet néfaste des métaux lourds sur les activités enzymatiques du sol a souvent été souligné (Renella *et al.*, 2003 ; Landi *et al.*, 2000 ; Kandeler *et al.*, 1996 ; Kuperman et Carreio, 1997 ; Haanstra et Doelman, 1991 ; Hattori, 1992). La sensibilité des activités vis-à-vis des métaux peut dépendre du type d'enzyme (Renella *et al.*, 2003). Dans une étude portant sur l'impact de différents métaux sur 13 enzymes impliquées dans les cycles du carbone (C), de l'azote (N), du phosphore (P) et du soufre (S), Kandeler *et al.* (1996) ont montré que la réduction de leurs activités était plus ou moins sévère : celles impliquées dans le cycle du carbone étaient moins affectées que celles

liées aux cycles du N, P, S. Les sols contaminés par les métaux lourds peuvent donc perdre certaines de leurs propriétés biochimiques indispensables au bon fonctionnement de l'écosystème. Par exemple, il a été montré que l'activité déshydrogénase était réduite lors d'une contamination par un métal (Doelman et Haanstra, 1979 ; Kelly *et al.*, 1999 ; Kelly et Tate, 1998). Cet effet, parfois sévère, peut aller jusqu'à une réduction de 95% de l'activité (Kelly *et al.*, 1999). L'activité déshydrogénase étant corrélée à l'activité respiratoire du sol, une telle réduction peut avoir des répercussions néfastes significatives sur l'ensemble de l'écosystème du sol, avec une réduction de la décomposition de la matière organique et la perturbation des grands cycles des éléments (Kelly *et al.*, 1999).

II.4 Différentes approches méthodologiques

Les microorganismes sont donc susceptibles d'être affectés au niveau de leurs activités, leur physiologie, leur diversité, autant de perturbations pouvant avoir des conséquences sévères sur l'ensemble de l'écosystème. La réponse des microorganismes telluriques aux métaux lourds peut donc être appréhendée à différents niveaux, et au moyen de techniques variées, mais les interprétations écologiques qui en découlent seront à nuancer.

Les études d'impact ont utilisé des approches globales visant à mesurer le nombre de cellules cultivables, la biomasse, les activités enzymatiques, la capacité métabolique, paramètres reflétant un état général des microorganismes du sol suite à une perturbation. En complément de ces approches, des méthodes basées sur l'analyse de molécules bio-indicatrices extraites directement du sol (ADN, ARN, phospholipides) se sont avérées efficaces pour contourner les biais et limites habituellement associés aux techniques de culture (White *et al.*, 1998 ; Kozdroj et van Elsas, 2001a). Ces approches moléculaires se déclinent en une large gamme et permettent d'explorer plus ou moins finement la structure des communautés microbiennes et de mettre en évidence d'éventuelles variations de cette structure en réponse à une pollution par un métal lourd (Kozdroj et van Elsas, 2001a).

III/ Techniques de dépollution

Les nombreux cas de pollution par les métaux lourds génèrent autant de sites contaminés qu'il faut réhabiliter. Les méthodes physico-chimiques de dépollution de ces sites utilisées *in situ* et *ex situ* présentent l'inconvénient d'être coûteuses et lourdes à mettre en œuvre (Gadd,

2000 ; Raskin *et al.*, 1994 ; Salt *et al.*, 1995). De plus, elles perturbent fortement l'activité biologique des sols et altèrent leur structure physique. Le besoin de nouvelles techniques économiquement compétitives et pouvant préserver les caractéristiques du sol s'est fait sentir et l'utilisation des biotechnologies s'est avérée être une alternative intéressante. La capacité de certaines plantes à tolérer ou même à accumuler des métaux a permis d'ouvrir de nouvelles voies de recherche sur le traitement des sols : on parle de phytoremédiation.

III.1 Principe de la technique de phytoremédiation

Connue sous le nom de phytoremédiation « phyto » = plante et « remedium » = rétablissement de l'équilibre, remédiation, la phytoremédiation est définie comme l'utilisation de plantes pour extraire ou transformer les polluants organiques et aussi inorganiques (plus particulièrement les métaux lourds) (Salt *et al.*, 1998). Les aspects technologiques d'efficacité, de coût du traitement et les aspects économiques sont abordés. Plus précisément, Les types de stratégies de phytoremédiation, particulièrement utilisés dans la dépollution des métaux lourds sont décrits ci-dessous et illustrés dans la Figure 3:

- (1) Phytostimulation : Les plantes sécrètent des exsudats racinaires qui peuvent être utilisés par les communautés microbiennes et promouvoir leur développement et leurs activités. Cette stimulation microbienne dans la rhizosphère modifie la bioaccumulation, oxydation/réduction biologique et biométhylation des métaux lourds (McGrath, 1998).
- (2) Phytostabilisation : Utilisation des plantes pour réduire la biodisponibilité des polluants par les écoulements (latéraux ou en profondeur) ou immobiliser les composés polluants en les liants chimiquement par précipitation, stabilisation, absorption ou piégeage de ceux-ci par la plante. Cette technique permet d'éviter la dispersion des polluants dans les eaux de surface et souterraines (Cunningham *et al.*, 1995).
- (3) Phytoextraction : Utilisation de plantes qui absorbent les métaux lourds dans les sols par les racines, puis transfèrent et accumulent ceux-ci dans leurs parties récoltables (feuilles, tiges et racines). Les métaux lourds vont se complexer avec des acides organiques ou des acides aminés synthétisés par la plante. Les métaux lourds sont ensuite récupérés en incinérant ou compostant la biomasse de plante (McGrath, 1998).

- (4) **Phytovolatilisation** : Utilisation de plantes qui absorbent des contaminants organiques et autres produits toxiques, transformant ceux-ci en éléments volatiles peu ou pas toxiques et les relâchant dans l'atmosphère via leurs feuilles (McGrath, 1998).

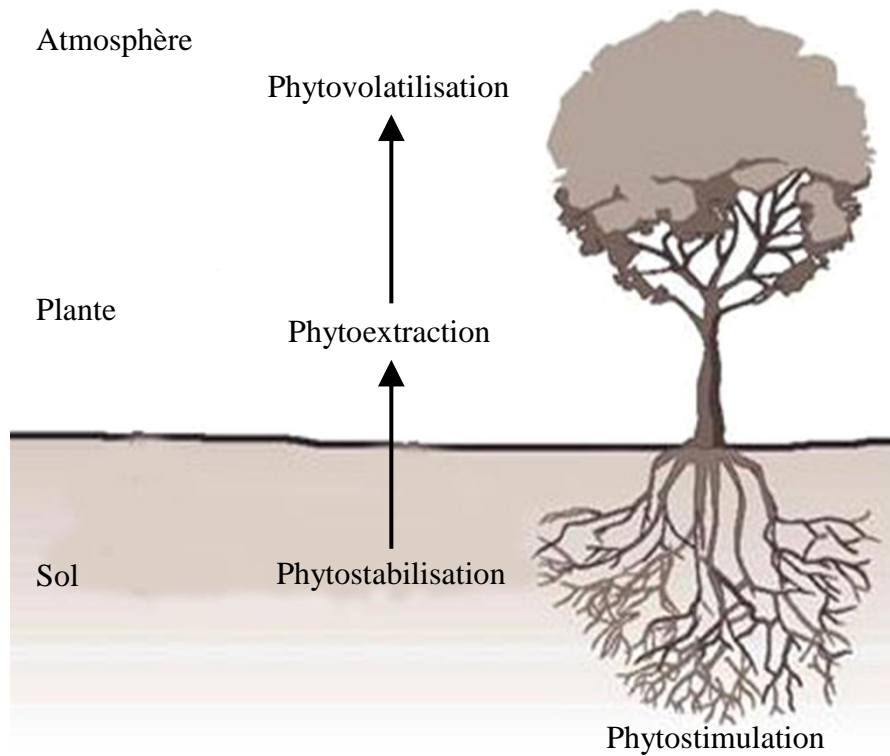


Figure 3: Schéma représentant la phytoremédiation

III.2 Phytoextraction des sols contaminés par les métaux lourds

Parmi les différentes méthodes de phytoremédiation, la plus utilisée est la phytoextraction, appliquée particulièrement pour la dépollution des métaux lourds. La phytoextraction utilise des plantes capables de prélever les métaux lourds, de les transférer et de les accumuler dans les parties aériennes qui seront ensuite récoltées. Après récolte par des méthodes traditionnelles agricoles, les tissus végétaux ayant concentré les métaux lourds seront traités par séchage, incinération ou compost. Cette technique représente une alternative ou un complément aux traitements physico-chimiques des sols contaminés par les métaux lourds. Il existe deux stratégies de phytoextraction, la phytoextraction assistée (induite) et la phytoextraction continue (Salt *et al.*, 1998 ; Cooper *et al.*, 1999).

III.2.1 Phytoextraction induite

La phytoextraction induite (Figure 4) se fait en présence de chélateurs et de plantes à forte biomasse et à croissance rapide. Lorsque la plante a atteint un certain niveau de croissance, les chélateurs de métaux sont appliqués au sol. Ceux-ci permettent d'induire l'accumulation de métaux lourds dans la plante par augmentation de la biodisponibilité de l'élément ciblé. Les chélateurs des métaux

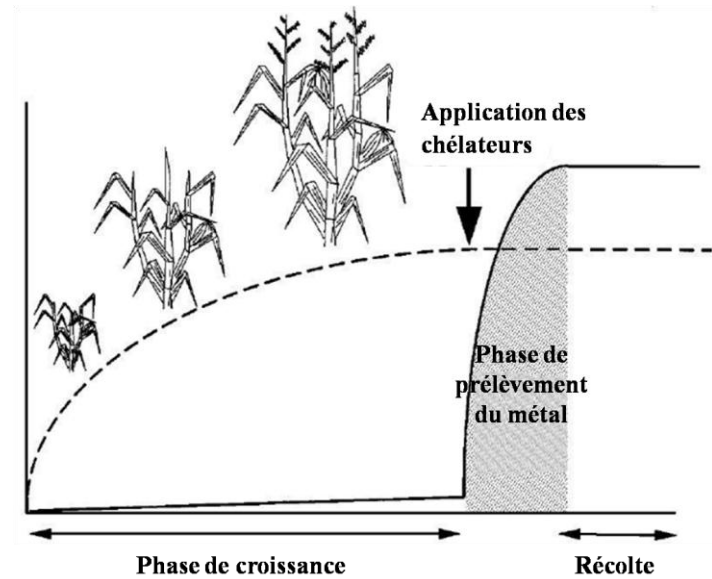


Figure 4: Schéma représentant une phytoextraction induite par des chélateurs (D'après Salt *et al.*, 1998)

lourds comme EDTA (éthylène diamine tetra acetic acid) et EDDS (ethylène diamine disuccinate) pour le plomb, et EGTA (ethylene glyco-O,O'-bis-[2-amino-ethyl]-N,N,N',N',-tetra acetic acid) pour le cadmium, sont connus pour améliorer la phytoextraction par l'augmentation de la biodisponibilité et de l'accumulation des métaux lourds (Cooper *et al.*, 1999 ; Tandy *et al.*, 2006). Des expériences, réalisées par Jarvis et Leung (2002), ont montré que la plante *Pinus radiata* n'est capable d'accumuler naturellement que 60 à 80 mg.kg⁻¹ de plomb ; l'application d'un chélateur synthétique, comme l'EDTA ou l'H-EDTA multiplie par 5 ou 6 son pouvoir d'absorption du plomb (Jarvis et Leung, 2002). En fait, lors de l'ajout du chélateur dans le site contaminé par le plomb, celui-ci est absorbé et migre vers la partie aérienne où il s'accumule sous la forme du complexe Pb-EDTA (Salt *et al.*, 1998 ; Huang et Cunningham, 1996). Ce phénomène a pu être décrit chez *Zea mays* L. ; l'ajout d'EDTA ou d'EDDS permet une augmentation de l'accumulation de plomb dans la partie racinaire (Luo *et al.*, 2006).

III.2.2 Phytoextraction continue

Contrairement à l'absorption induite par des chélateurs, la phytoextraction continue (Figure 5) est basée sur les capacités génétiques et physiologiques des plantes spécialisées dans l'absorption, la translocation et la tolérance des métaux lourds. On parle de « plante hyperaccumulatrice ». Brooks *et al.* (1997) ont utilisé le terme « hyperaccumulateur = hyperaccumulatrice » la première

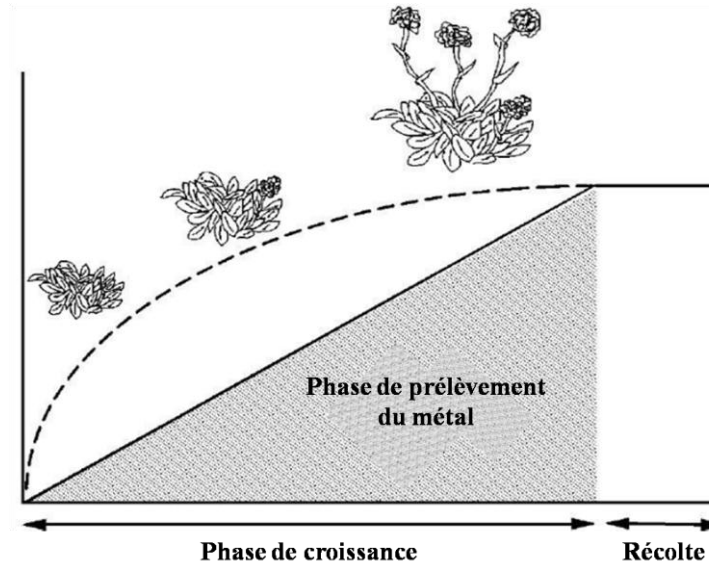


Figure 5: Schéma représentant une phytoextraction continue (D'après Salt *et al.*, 1998)

fois pour décrire des plantes avec une teneur en nickel supérieure à 0,1% de leur matière sèche, ce qui correspond à une valeur nettement plus élevée que celle rencontrée chez les plantes non accumulatrices (Brooks *et al.*, 1977). Aussi, selon Baker et Brooks (1989), les plantes hyperaccumulatrices devraient avoir une valeur seuil d'accumulation de métaux lourds dans leur partie aérienne à 1% pour Zn, Mn, 0,1% pour Pb, Cu et Al, 0,01% pour Cd et Se et 0,001% pour Hg de leur matière sèche. Actuellement, environ 400 espèces hyperaccumulatrices ont été répertoriées (Tableau 2) (Baker *et al.*, 1999).

Métal	Critère (% MS des feuilles)	Nombre de taxons	Nombre de familles
admium	> 0,01	1	1
Cobalt	> 0,1	28	11
Cuivre	> 0,1	37	15
Plomb	> 0,1	14	6
Nickel	> 0,1	317	37
Zinc	> 1,0	11	5
Manganèse	> 1,0	9	5

Tableau 2: Estimation du nombre de plantes hyperaccumulatrices (Baker *et al.*, 1999)

III.2.3 Avantages et limites de la technique de phytoextraction

III.2.3.1 Avantages

La technique de phytoextraction présente de nombreux intérêts, d'ordre environnemental et économique. En effet, l'activité biologique et la structure des sols sont maintenues après le traitement. En plus, le coût de la technique est bien moindre que celui de procédés traditionnels *in situ* et *ex situ* et varie selon les contaminants. Le coût d'un traitement *in situ* en présence de contaminants organiques et inorganiques est de l'ordre de 10\$ à 40\$ par tonne de sols (Mulligan *et al.*, 2001). D'autre part, les plantes permettent de conserver un paysage agréable (reverdissement et floraison), et aussi d'installer une communauté de microflore et de microfaune métallo-résistantes pouvant agir en synergie avec ces plantes afin d'accélérer le processus de décontamination. Les plantes peuvent être facilement surveillées et récoltées à des fins de traitement et la biomasse végétale réutilisée (Kumar *et al.*, 1995 ; Raskin *et al.*, 1997 ; Blaylock et Huang, 2000 ; Garbisu et Alkorta, 2001). D'autre part, les métaux lourds peuvent aussi être récupérés et réutilisés. Enfin, cette technique biologique est facilement acceptée par le public dans le contexte de la préservation de l'environnement, du développement durable, et dans l'aspect esthétiquement plaisant de son application.

III.2.3.2 Limites de la technique de phytoextraction

Cependant comme d'autres techniques de dépollution, la phytoextraction comporte des désavantages. Cette idée a été initialement introduite par Baker *et al.*, (1989). Malheureusement, la majorité des plantes hyperaccumulatrices présentent une faible production de biomasse et une vitesse de croissance lente demandant un investissement en temps assez important, et/ou en argent avec l'adjonction de chélateurs ou autres substances « starter ». La concentration et le type de métaux lourds influencent la phytotoxicité, et dans certains cas, la croissance des plantes peut être réduite (Shah *et al.*, 2007 ; Salt *et al.*, 1998 ; Singh *et al.*, 2003). Pour palier ces inconvénients et développer avec succès une phytoextraction, la plupart des études ont pour objectif de découvrir des plantes hyperaccumulatrices ayant une forte production de biomasse. La transformation par génie génétique des plantes sensibles à forte production de biomasse en plantes hyperaccumulatrices pourrait également être envisagée. Pour cela, il est nécessaire de comprendre les mécanismes biochimiques et moléculaires intervenant dans la réponse de la

plante survenant lors d'un stress aux métaux lourds. (Kärenlampi *et al.*, 2000). Le tableau 3 représente les plantes hyperaccumulatrices connues et leurs capacités de dépollution des métaux lourds.

Espèce de plante	Métal	Concentration de métal (mg.kg ⁻¹)	Référence
<i>Thlaspi caerulescens</i>	Zn	1800	Reeves et Brooks (1983)
<i>Thlaspi caerulescens</i>	Cd	39600	Barker et Walker (1990)
<i>Thlaspi rotundifolium</i>	Pb	8200	Reeves et Brooks (1983)
<i>Zea mays</i>	Pb	4900	Huang et Cunningham (1996)
<i>Ambrosia artemissifolia</i>	Pb	24000	Huang et Cunningham (1996)
<i>Ipomea alpina</i>	Cu	12300	Barker et Walker (1990)
<i>Serbetia acuminata</i>	Ni	25% (WS)	Jaffre <i>et al.</i> (1976)
<i>Berkheya coddii</i>	Ni	5500	Robinson <i>et al.</i> (1997)
<i>Arabidopsis halleri</i>	Zn	3000	Zhao <i>et al.</i> (2000)

Tableau 3: Exemple de plantes hyperaccumulatrices et leur potentiel d'accumulation

La phytoextraction repose essentiellement sur les interactions entre les plantes, le compartiment du sol et la microflore tellurique. Le sol est une matrice complexe servant de support au développement des plantes et des micro-organismes. Dans le système plante-sol-microorganisme, les microorganismes ont souvent biodégradé en amont de l'absorption racinaire. De plus, plantes (rhizosphère) et microorganismes ont co-évolué pour disposer d'une stratégie à bénéfices mutuels pour gérer la phytotoxicité de la plante, et donc améliorer la phytoextraction. Les microorganismes rhizosphériques profitent des exsudats racinaires tels que des acides aminés, des hormones, des enzymes alors que les plantes bénéficient de la capacité de dégradation des polluants en stimulant l'activité microbienne pour réduire le stress de phytotoxicité. Une meilleure connaissance de ces mécanismes est une clé essentielle pour réussir la phytoextraction. Par exemple, *Microbacterium saperdae*, *Pseudomonas monteilii*, et *Enterobacter cancerogenes*, trois isolats bactériens ont été inoculés avec des graines d'une plante hyperaccumulatrice (*Thlaspi caerulescens*), et ont ainsi augmenté d'un facteur 4 la quantité de zinc accumulé, en favorisant sa disponibilité (Whiting *et al.*, 2001). Glick (2003) ont montré que les bactéries PGPR (Promoting Growth Plant Rhizobacterie) peuvent réduire les effets toxiques du métal vis-à-vis de la plante. En fait, le niveau d'éthylène produit par la plante lors du stress induit par les métaux lourds peut être réduit par l'ACC (acide aminocyclopropane carboxylique) désaminase produit par des bactéries PGPR (Glick, 2003).

Enfin, la phytoextraction induite avec ajout des chélateurs permet d'augmenter la mobilité et la biodisponibilité des métaux lourds, et la capacité d'extraction et de transport du métal dans les plantes (Huang *et al.*, 1997 ; Blaylock *et al.*, 1997). Cependant, les chélateurs présentent des risques pour l'environnement et il manque des données concernant la persistance des chélateurs de métaux lourds dans les sols contaminés (Lombi *et al.*, 2001a et b).

Pour l'amélioration des rendements de phytoextraction, la plupart des études sur ce thème concernent la sélection de plantes hyperaccumulatrices et la rhizosphère (Wenzel, 2009). Par contre, peu d'études prennent en compte le compartiment fonctionnel du sol que constitue la drilosphère (zone d'influence des vers de terre sur le sol) (Hickman et Reid, 2008 ; Kuffner *et al.*, 2008). Pourtant les vers de terre en tant qu'ingénieurs écologiques jouent un rôle important dans leur environnement (Derouard *et al.*, 1996 ; Bohlen, 2002 ; Dechaine *et al.*, 2005 ; Tapie-Coral *et al.*, 2006).

IV/ Ver de terre, « organisme ingénieur » des sols

IV.1 Ver de terre

IV.2.1 Concept d' « ingénieurs de l'écosystème »

Le terme d' « ingénieurs de l'écosystème » a été utilisé par Jones *et al.* (1994) et Lawton (1994) pour désigner des organismes qui, directement ou indirectement, modifient les ressources disponibles pour d'autres organismes en provoquant des changements physiques de l'état des matériaux biotiques et abiotiques tels que le ver de terre, le termite ou la fourmi. Ils sont considérés comme les principaux ingénieurs de l'écosystème sol en zone tropicale (Jones *et al.*, 1994 ; Lavelle, 1996).

Les vers de terre, aussi appelés lombriciens (annélides, oligochètes) représentent une composante majeure de la macrofaune du sol dans la plupart des écosystèmes terrestres. En 1994, plus de 3600 espèces de vers de terre, réparties en 15 familles, avaient été recensées dans le monde, auxquelles s'ajoutent plus de 60 nouvelles espèces chaque année. On estime à 7000 environ le nombre total d'espèces, la majorité vivant sous les tropiques (Lavelle *et al.*, 1998). Ils jouent un rôle important dans leur environnement grâce à différents mécanismes physico-chimiques et biologiques, permettant d'améliorer la fertilité et de préserver la structure du sol (Stork et Eggleton, 1992 ; Lavelle *et al.*, 1997). Aussi, en affectant les propriétés physiques et chimiques du sol, ils modifient le biotope des communautés microbiennes (Lavelle et Gilot, 1994 ; Lavelle *et al.*, 1997).

IV.2.2 Taxonomie et catégories écologiques

Les vers de terre sont omniprésents dans tous les sols tropicaux ou tempérés et leur diversité taxonomique est très importante. Les grandes glaciations du quaternaire ont provoqué l'extinction des vers de terre. Les régions tropicales sont beaucoup plus riches. Selon des critères morphologiques et comportementaux les vers de terre se répartissent en trois grandes catégories écologiques : les épigés, les anéciques et les endogés (Bouché, 1977) (Figure 6).

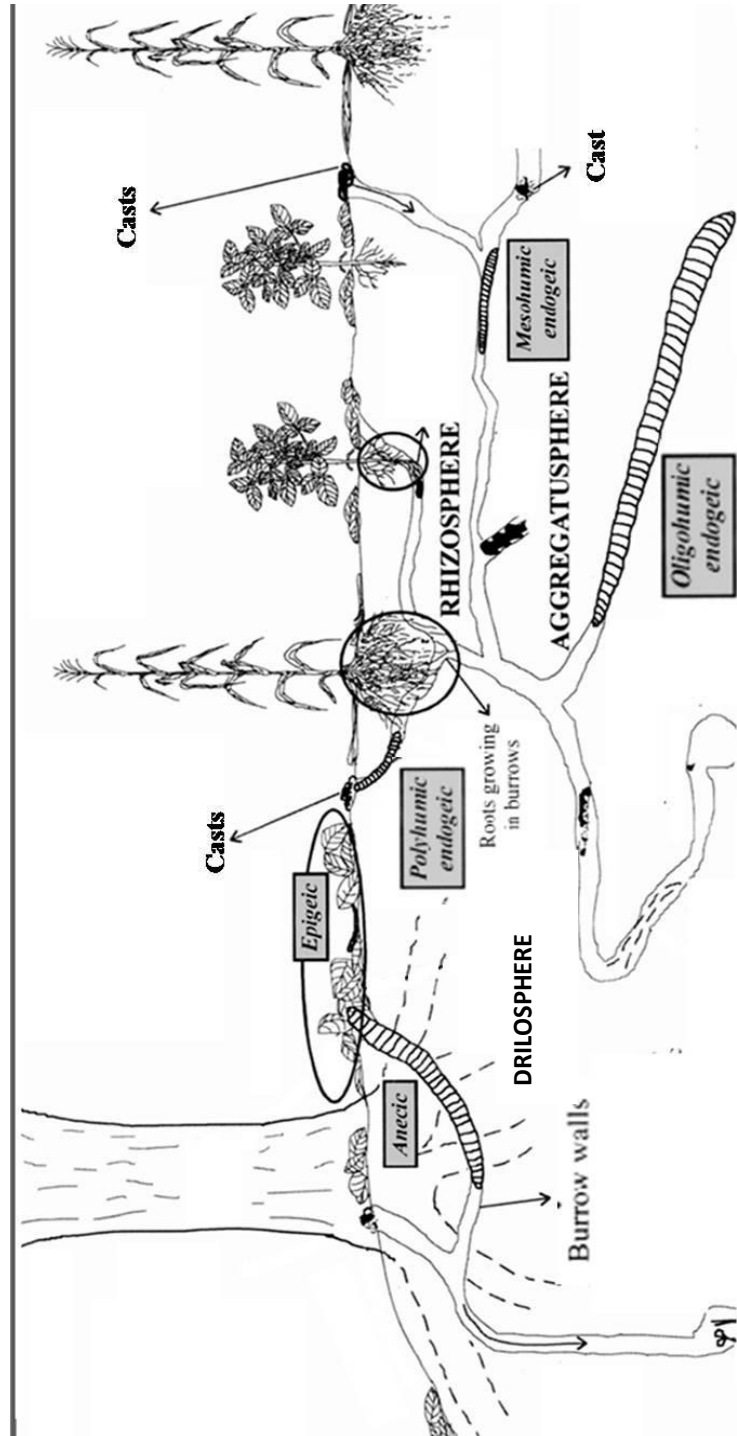


Figure 6 : Caractéristiques et localisation des trois catégories écologiques de vers de terre (D'après Brown, 2000)

- (1) **Les épigés** : (Bouché, 1977 ; Lee, 1985) sont de petite taille (10 à 30 mm) et vivent généralement au niveau de la litière et dans les matières organiques en décomposition. On les trouvera également dans les excréments des grands herbivores ou dans le bois humides en cours de décomposition. Ces espèces sont localisées en surface et sont donc particulièrement sensibles à la prédation, aux variations climatiques et aux facteurs anthropiques tels que le labour des horizons de surface et l'usage de produits phytosanitaires. Les vers de terre épigés jouent un rôle important dans le recyclage de la matière organique.

- (2) **Les anéciques** : (Bouché, 1977) sont des individus de taille moyenne à géante, dans le cas des espèces méditerranéennes, (10 à 110 cm) vivant dans des galeries verticales à subverticales plus ou moins ramifiées et s'ouvrant en surface. Au cours de l'ingestion du sol et de l'enfouissement de la matière organique, ils assurent un mélange intime de la matière organique et de la fraction minérale des différents horizons du sol. Ces espèces, localisées sur toute la hauteur du profil, disposent d'une forte musculature leur permettant de s'adapter à des compacités de sol relativement élevées et de résister aux pressions anthropiques connues en sols cultivés.

- (3) **Les endogés** : (Bouché, 1977) sont de taille variable (1 à 20 cm). Ils représentent 20 à 50% de la biomasse des terres fertiles et vivent en permanence dans le sol où ils creusent des galeries d'orientation quelconque. Ces vers se nourrissent de terre plus ou moins riche en matière organique et se déplacent donc beaucoup pour satisfaire leurs besoins alimentaires. Lavelle, (1981) précise cette classification en fonction de la richesse en matière organique du sol qu'ils ingèrent. Il existe trois sous-catégories d'endogés : polyhumiques, mésohumiques, et oligohumiques. Les endogés qui ingèrent le sol le plus pauvre en matière organique sont des oligohumiques. Les endogés ont été couramment observés près des racines.

IV.2 Impact favorable des vers de terre

L'impact des vers de terre sur le sol varie selon leur catégorie écologique. Les endogés et les anéciques sont les plus influents (Bouché, 1977). Les activités mécaniques principales des vers comprennent (i) l'élaboration de réseaux de galeries dans lesquelles ils se déplacent

et (ii) l'excrétion de déjections dans les galeries (fèces) ou en surface du sol (turricules) (Figure 7). La « drilosphère » est la zone d'influence des vers de terre sur le fonctionnement des sols. Elle comprend toutes les structures physiques dépendantes des vers telles que le contenu du tube digestif, les turricules, et les galeries ainsi que les communautés d'invertébrés et de micro-organismes qui y sont présentes. La structure et l'importance relative de la drilosphère sont déterminées par le climat, les paramètres du sol et la qualité des apports organiques (Lavelle *et al.*, 1998).

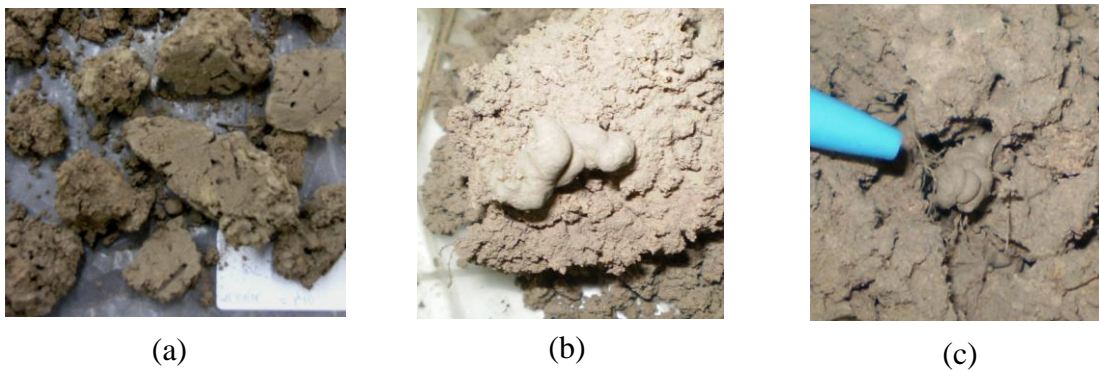


Figure 7 : Structures construites par des vers de terre :
(a) galeries, (b) déjection dans les galeries (fèces) et (c) à la surface (turricules)

IV.2.1 Galeries

Selon la catégorie écologique des vers de terre, le réseau de galeries sera différent (étendue, orientation, diamètre...). Le nombre de galeries dans un sol dépend de l'abondance des vers mais peut atteindre plusieurs centaines par m^2 (Lee, 1985). Dans les sites avec des communautés de vers importantes, le volume des galeries contribue pour une grande part aux pores du sol et fournit ainsi une voie de passage pour l'air et l'eau dans le sol (Tomlin *et al.*, 1995). Ces activités conduisent à l'amélioration de la porosité et de l'aération. Par exemple, des expérimentations en microcosmes ont montré que les galeries de *L. terrestris* augmentaient de 8 à 9 fois la conductivité hydraulique (Joschko *et al.*, 1989). Des études au champ viennent conforter ces résultats en montrant un transfert d'eau par les galeries de *L. terrestris* (Edwards *et al.*, 1989, 1992) et une forte corrélation du taux d'infiltration avec la longueur, la surface et le volume des galeries d'un ver anécique *Scherotheca gigas mifuga* (Bouché et Al-Addan, 1997).

De plus, les galeries favorisent le transfert de composés dans les différents horizons du sol, à la fois passivement (percolation, infiltration) mais également par le rôle fouisseur actif des espèces anéciques. Les vers de terre tapissent les galeries de mucus et de déjections riches en nutriments au cours de leurs passages successifs dans le sol (Sims et Gerard, 1985 ; Binet et Curmi, 1992). Binet *et al.* (1993) montrent que les parois de galeries de *L. terrestris* sont plus riches en carbone organique et en azote que le sol environnant. L'incorporation de matière organique dans les galeries par *L. terrestris* a été démontrée en écosystèmes forestiers (Van hoof, 1983).

Ces rapports favorisent le développement d'une microflore bactérienne importante tout au long des parois des galeries, ce qui entraîne une augmentation des activités respiratoires et de minéralisation enzymatique (Binet, 1993). Tiunov et Scheu (1999) ont montré que la biomasse microbienne s'accroît d'un facteur de 2,3 à 4,7 dans les parois de galeries de *L. terrestris* par rapport au sol environnant. Cette croissance microbienne se traduit par une augmentation de la respiration d'un facteur de 3,7 à 9,1 en écosystème forestier (Tiunov et Scheu, 1999).

IV.2.2 Turricules

Les vers de terre ingèrent les sols, puis les excrètent à la surface du sol ou dans les galeries. La quantité de turricules déposée à la surface du sol se situe entre 2 et 250 tonnes ha⁻¹ par an en sol tempéré, mais en prairies les valeurs sont de 40 à 50 tonnes ha⁻¹ par an, ce qui représente une épaisseur de sol de 3 à 4 mm (Lee, 1985). Binet et Le Bayon (1999) évaluent la production de turricules de 2,5 à 3,5 kg m⁻² an⁻¹ (poids sec) pour 100 g de ver m⁻².

Cependant, la production et l'abondance des turricules de vers de terre apparaissent très variables en fonction du milieu (conditions climatiques, types de sol), des espèces de vers présentes ainsi que du couvert végétal. Par exemple, la disparition des turricules est de 70% en saison des pluies, et de 20% en période sèche ; les turricules sont donc intégrés plus lentement à la matrice du sol en période sèche (Binet et Le Bayon, 1999).

Le comportement alimentaire des vers de terre conduit à une grande variabilité dans la composition de leurs déjections. Celles-ci possèdent donc des structures physiques offrant des conditions miro-environnementales particulières différentes de celles du sol initial. Certains

vers de terre se nourrissent sélectivement de sol enrichi en matière organique (Zhang et Schrader, 1993 ; Doube *et al.*, 1994). Doube *et al.* (1996) ont montré que *L. terrestris* et *A. caliginosa* consomment préférentiellement un mélange de particules minérales fines et de matière organique plutôt que de la matière organique seule. Les champignons constituent également une importante source de nourriture pour beaucoup d'espèces de vers de terre (Edwards et Fletchet, 1988). Les vers de terre peuvent aussi se nourrir à partir de protozoaires, de bactéries ou d'algues.

Après leur transit dans le tube digestif du vers, les organismes ingérés sont plus ou moins modifiés en fonction des conditions physicochimiques intestinales. Les organismes ayant survécu (surtout des spores de champignons, de protozoaires et des bactéries résistantes) constituent l'inoculum qui colonisera le turricule par la suite et orientera les processus microbiens (Brown, 1995). Parle *et al.* (1963a) montrent un enrichissement des turricules en bactéries et en actinomycètes dans les déjections de *L. terrestris* dû au passage du sol dans l'intestin qui crée des conditions favorables à leur développement. De plus, cet auteur indique un développement d'hyphes de champignons à la surface des déjections (Parle, 1963b), phénomènes également observés chez un ver endogé, *Pontoscolex corethrurus* (Barois, 1987). Si de nombreux travaux démontrent l'effet de stimulation des vers de terre sur l'activité microbienne des sols, à l'inverse l'ingestion du sol par les vers de terre endogés peut conduire à la diminution des populations bactériennes et fongiques (Kristufek *et al.*, 1992). D'autre part, les activités enzymatiques peuvent donner des informations sur le fonctionnement de la communauté microbienne. Tiwari *et al.* (1989) indiquent que les activités phosphatase, déshydrogénase, et uréase sont plus intenses dans les turricules. Une forte activité phosphatase a aussi été trouvée dans les turricules frais du vers endogé *A. caliginosa*. Ces activités enzymatiques peuvent agir sur la biodisponibilité des éléments minéraux tels que le phosphore (Satchell et Martin, 1984).

IV.3 Ver de terre et métaux lourds

Les vers de terre sont plus sensibles aux teneurs en métaux lourds que les autres invertébrés dans le sol (Bengtsson *et al.*, 1992) et leur capacité à accumuler des métaux lourds souvent plus élevée que pour d'autres espèces animales (Beyer *et al.*, 1982). Cependant, les métaux lourds ont des effets variables en fonction des espèces, du stade de développement, du mode de vie (lieu de vie et régime alimentaire) et de leur capacité d'adaptation face à la

pollution. Ces effets varient également suivant la nature du métal, sa forme chimique et les propriétés du sol.

L'augmentation de la teneur en métaux lourds au delà d'un certain seuil réduit la densité des vers (Pizl et Josen, 1995) et influe négativement sur leur croissance pondérale, leur développement sexuel et la production de cocons (Spurgeon et Hopkin, 1996, 1999). Spurgeon *et al.* (2000) ont observé une réduction significative du taux de survie de 4 espèces de vers de terre pour des concentrations en zinc comprises entre 2000 – 3600 ppm. De plus, ils ont noté des pertes significatives de poids à partir de 1200 – 2000 ppm de zinc. Par ailleurs, Depta *et al.* (1999) indiquent que l'un des mécanismes potentiels d'adaptation des vers à la pollution est l'évitement. Les vers, placés en sols pollués, seraient ainsi en mesure de différencier la matière organique selon son niveau de contamination.

La capacité d'accumulation de métaux lourds des vers (étudiée sur quelques espèces) a été reconnue dans la littérature dès la fin du 19^{ème} siècle (Hopkin, 1989). Chez les vers de terre, les métaux lourds s'accumulent notamment dans les tissus digestifs soit par voie orale après leur ingestion, soit par voie cutanée chez les vers de terre n'ayant pas de cuticule protectrice et vivant en contact permanent avec le sol. De nombreuses études ont permis d'identifier les paramètres dont dépend ce processus de bioconcentration (i) l'espèce de ver et sa catégorie écologique, (ii) le type de métal et sa spéciation, (iii) les propriétés physiques et chimiques du sol, (iv) la saison et (v) quand il s'agit d'une pollution diffuse, la distance à la source de contamination. Ainsi, les métaux lourds complexes sont moins disponibles pour le ver de terre (Hartenstein et Hartenstein, 1981). Enfin, l'étude de l'accumulation des métaux lourds dans les tissus des vers pourrait être un bon bioindicateur de disponibilité des métaux lourds dans le sol (Lanno et Mc carty, 1997 ; Conder et Lanno, 2000 ; Conder *et al.*, 2001 ; Oste *et al.*, 2001).

Par ailleurs, quelques études traitent également de l'impact des vers de terre eux-mêmes et de leurs activités sur la dynamique des métaux lourds dans le sol tels que la solubilité, l'extractibilité, la biodisponibilité (Wen *et al.*, 2004 ; Devliergheer et Verstraete, 1997). Ainsi, la présence du vers de terre *L. terrestris* augmente la disponibilité du cuivre de 6% (Devliergheer et Verstraete, 1995). Cependant, on considère que le rôle de ces organismes dans la biodisponibilité des métaux lourds pour les plantes est très modeste dans les sites contaminés (Abdul rida, 1996).

PARTIE B : MATERIEL ET METHODES

I/ PRESENTATION DES COMPOSANTS BIOLOGIQUES

I.1 La plante « hyperaccumulatrice » *Lantana camara* L.

I.1.1 Description et caractéristiques

Lantana camara L. (Figure 8) est un petit arbuste persistant de port buissonnant de la famille des Verbénacées, originaire des régions tropicales, et plus particulièrement de l'Ouest de l'Inde. Il est adapté aux climats subtropicaux ou tropicaux mais peut aussi être cultivé sous des climats plus doux. Le *Lantana* requiert les expositions suivantes : mi-ombre, lumière, soleil (Ghisalberti, 2000).



Figure 8 : La plante, *Lantana camara*

Les fleurs (Figure 9) regroupées en panicules d'environ 5 cm de diamètre, sont de coloris divers en fonction des variétés. Elles peuvent être blanches, jaunes, oranges, rouges, roses, voire de plusieurs couleurs simultanément. De plus les couleurs changent avec l'âge de la fleur.



Figure 9 : Fleur de *Lantana camara*

Le feuillage du *Lantana* est semi-persistant à persistant selon les climats. Les feuilles pointues et dentées de couleur vert-foncé présentent des nervures marquées. Elles peuvent mesurer plus de 10 cm de longueur. Les feuilles broyées dégagent une odeur agréable un peu mentholée. Les fruits (Figure 10) sont de petites baies vertes, devenant noires à maturité. Ils renferment des acides tri-terpéniques (lantadènes) qui sont toxiques pour l'homme et le bétail.



Figure 10 : Fruit de *Lantana camara*

I.1.2 *Lantana camara* et phytoremédiation

L. camara possède une croissance et un développement très rapides. La biomasse est multipliée par 15 après 105 jours de culture. Il possède une action phytoremédiatrice très importante. Gosh et Singh (2005) ont montré que le *Lantana camara* a de fortes capacités de tolérance et d'accumulation de chrome (Cr). Cette plante peut se développer dans des conditions extrêmes, très résistante aux conditions climatiques des pays chauds, supportant de longues périodes de sécheresse en plein soleil ou des pluies abondantes. Enfin, ses fleurs groupées en panicules multicolores permettent l'intégration de cet arbuste dans une composition florale ou encore dans un projet d'aménagement du paysage.

I.2 Le ver de terre, *Pontoscolex corethrurus*

Embranchement : Annélide

Classe : Oligochaeta

Ordre : Opisthopora

Famille : Glossoscolecidae

Espèce : *Pontoscolex*



Figure 11: Ver de terre, *Pontoscolex corethrurus*

I.2.1 Description et caractéristiques

Pontoscolex corethrurus (Müller, 1857) (Figure 11) est une espèce endogée appartenant à la famille des Glossoscolecidae. Il s'agit d'un ver rouge, mesurant de 7 à 10 cm, son poids est d'environ un gramme. Chez l'adulte, le clitellum recouvre les segments 14 à 22.

Ce ver représente plus de 90% de la biomasse de la macrofaune du sol dans la zone étudiée. Ils accumulent à la surface du sol des turricules argileux, très humides et compacts, qui s'unissent les uns aux autres et forment rapidement une couche continue dure et imperméable à la surface du sol.

I.2.2 Avantages de ce ver

Cette espèce est très abondante sur le territoire de l'étude et est donc particulièrement facile à récolter (Dechaine *et al.*, 2005).

Pontoscolex corethrurus est un décomposeur efficace de la matière organique. En effet, les vers endogés se nourrissent de matière organique décomposée ou d'exsudats racinaires (Edwards et Bohlen, 1996 ; Edwards et Arancon, 2004). *P. corethrurus* joue également un rôle important dans l'assimilation du phosphore (Jiménez *et al.*, 2003 ; Dechaine *et al.*, 2005 ; Tapie-Coral *et al.*, 2006). Cette espèce a donc une action certaine sur la microflore tellurique et la rhizosphère. De plus cette espèce est pérégrine et a donc une forte capacité de dispersion, ce qui la rend potentiellement capable d'être utilisée en agronomie (Lavelle *et al.*, 1987).

II/ MISE EN PLACE DES EXPERIMENTATIONS

II.1 Site d'étude

Les principaux sites industriels du Vietnam, sont concentrés au nord du pays, autour de Hanoi et dans le sud, autour de Ho Chi Minh Ville. L'activité industrielle, en plein essor depuis les années 1990, concerne surtout l'automobile, les raffineries de pétrole, les produits chimiques, les engrais et les batteries. Les microcosmes ont été mis en place dans la région de Binh Duong, province au Sud du Vietnam à 80 km au nord-ouest de Ho Chi Minh Ville (Figure 12). C'est un site représentatif de la diversité industrielle depuis quelques années. Le sol de ce site est typique des sols du Sud Est du Vietnam, gris, acide et pauvre en matière organique et éléments nutritifs (Le *et al.*, 2000).



Figure 12 : Localisation du site d'étude

II.2 Matériel

II.2.1 Les pots

Les pots (Figure 13) utilisés pour les expérimentations sont en argile et ont un diamètre supérieur maximum de 30 cm et un diamètre inférieur de 20 cm. Les pots sont perforés pour laisser l'eau s'écouler mais, afin d'éviter la fuite des vers les trous sont fermés par un filet de plastique perforé.



Figure 13 : Pot

II.2.2 Le sol

Le sol a été prélevé dans une parcelle non cultivée de l'écomusée de Phu An (Vietnam). C'est un sol gris typique du Sud Est Asiatique, acide, sableux et pauvre en matière organique. Le sol est séché à l'air libre, broyé puis tamisé à 5 mm. Il est ensuite homogénéisé, 10 kg sont pesés et placés dans chaque pot d'argile.

II.2.3 La plante

A l'écomusée de Phu An, une parcelle d'environ 200 pieds de *Lantana camara* a été mise à notre disposition. Les plantes utilisées pour l'expérimentation ont été obtenues à partir de boutures de 20 cm de hauteur préparées et disposées dans des pots en plastique de 5l contenant un mélange de 1/3 de sol gris, 1/3 de fumier et 1/3 de bourre de coco. Sur l'ensemble des boutures, nous avons sélectionné des plantes de même taille : 40 cm de hauteur avec un diamètre de 20 cm. Avant rempotage, les racines sont lavées à la main afin d'éliminer la majorité des communautés bactériennes associées aux racines (Figure 14). Les plantes poussent naturellement dans les conditions locales (température à 25-30°C) et sont arrosées deux fois par jour (300 ml d'eau le matin et 200 ml d'eau le soir).



Figure 14 : Une étape de lavage des racines

II.2.4 Le ver de terre



Figure 15 : Récolte les vers



Figure 16 : Ver de terre

Les vers de terre, *Pontoscolex corethrurus* ont été récoltés dans la région de Bien Hoa (environ 100 km à l'Est de Ho Chi Minh Ville) dans une zone humide, non polluée par les métaux lourds (Figure 15). Les vers de terre sont maintenus pendant 7 jours dans un bac en plastique afin de contrôler leur état sanitaire avant la mise en place des expériences. 10 vers adultes ($\pm 10g$) (Figure 16) sont placés dans chaque pot ce qui correspond à 0,1% du poids de sol.

II.2.5 Le plomb

Le plomb est utilisé sous la forme d'une poudre d'acétate de plomb qui est mise en solution dans de l'eau distillée. Afin d'obtenir une concentration de 500 ppm et 1000 ppm, nous avons procédé aux calculs ci-dessous :

$$\text{Poids} = \frac{C(\text{mg/kg}) * \text{Poids du sol}(\text{kg}) * \text{Masse molaire de l'acétate de plomb}}{\text{Masse molaire du plomb}}$$

II.3 Plan de l'expérience

L'expérimentation comporte 4 traitements avec 5 réplicats pour chaque traitement : (i) sol (S), (ii) sol-ver (SV), (iii) sol-plante (SP), (iv) sol-plante-ver (SPV). Nous avons également 3 niveaux de pollution au Pb (i) sans Pb (T), (ii) 500 mg.kg⁻¹ de Pb (Pb+), (iii) 1000 mg.kg⁻¹ de Pb (Pb++). Deux temps d'expérimentation, 1 mois et 2 mois, ont été aussi réalisés.

Les pots sont disposés selon le plan d'expérimentation présenté dans la Figure 17. Celui-ci a été obtenu après avoir réalisé un tirage aléatoire, nous permettant de nous affranchir des facteurs environnementaux pouvant fausser nos résultats.

Les traitements au plomb sont arrosés avec 300 ml de solution de Pb acétate pour avoir une concentration finale à 500 et 1000 mg.kg⁻¹ et 300 ml d'eau pour tous les contrôles. Les pots sont protégés par un toit en bambou et plastique transparent afin d'éviter la pluie (Figure 18).

Durant toute la période de l'expérimentation, une observation visuelle (décoloration, jaunissement, pigmentation, nécroses, flétrissement...) et une mesure de croissance de la partie aérienne des plantes (nombre de feuilles, de rameaux, longueur et largeur du pied) sont réalisées chaque semaine.

Position des pots									
14/02/08									
I - Pollution en Pb à 500 mg.kg⁻¹ (Pb+)					II – Pollution en Pb à 1000 mg.kg⁻¹ (Pb++)				
1 mois					1 mois				
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SV	SV	SV	SV	SV	SV	SV	SV	SV	SV
SPV	SPV	SPV	SPV	SPV	SP	SP	SP	SP	SP
SP	SP	SP	SP	SP	SPV	SPV	SPV	SPV	SPV
2 mois					2 mois				
S	S	S	S	S	SP	SP	SP	SP	SP
SV	SV	SV	SV	SV	SPV	SPV	SPV	SPV	SPV
SP	SP	SP	SP	SP	S	S	S	S	S
SPV	SPV	SPV	SPV	SPV	SV	SV	SV	SV	SV
III – Non pollué									
1 mois					2 mois				
T-S	T-S	T-S	T-S	T-S	T-SV	T-SV	T-SV	T-SV	T-SV
T-SP	T-SP	T-SP	T-SP	T-SP	T-S	T-S	T-S	T-S	T-S
T-SV	T-SV	T-SV	T-SV	T-SV	T-SPV	T-SPV	T-SPV	T-SPV	T-SPV
T-SPV	T-SPV	T-SPV	T-SPV	T-SPV	T-SV	T-SV	T-SV	T-SV	T-SV

Figure 17 : Position des pots



Figure 18 : Dispositif expérimental en microcosme

III/ DEMONTAGE DES MICROCOSMES

III.1 La plante

A la fin de l'expérimentation, la taille et la largeur de toutes les plantes sont mesurées. Elles sont ensuite coupées au niveau des racines (Figure 19). Chaque plante est récoltée individuellement. La collecte des feuilles et des tiges s'effectue séparément (Figure 20). Elles sont ensuite transvasées dans un sac en papier où leur poids frais est mesuré à l'aide d'une balance de précision, puis séchées à l'étuve à 60°C pour évaluer leur poids sec.

III.2 Les échantillons de sol

Après la récolte des plantes, les pots sont apportés au laboratoire de l'Université de Sciences Naturelles (Thu Duc), et vidés. Leur contenu est étalé sur une bâche en plastique (Figure 21). Les vers de terre sont collectés, rincés à l'eau distillée, pesés et puis séchés à 60°C (Figure 22). Une fois les vers enlevés, le contenu des pots est séché à l'air libre dans une salle munie de ventilateurs durant un minimum de sept jours (Figure 23). Il est alors possible de séparer les agrégats de la drilosphère et les agrégats racinaires du sol non travaillé (Figure 24). Les échantillons sont ensuite broyés et tamisés à 2 mm afin de les homogénéiser (Figure 25).



Figure 19 : Récolte des parties aériennes

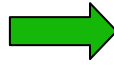


Figure 20 : Séparation des feuilles et des tiges de la plante



Figure 21 : Démontage des microcosmes

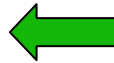


Figure 22 : Extraction des vers



Figure 23 : Séchage



Agrégat racinaire

Agrégat du ver

Figure 24 : Types d'agrégats

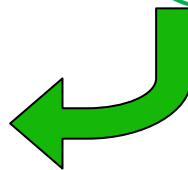


Figure 25 : Broyage

IV/ ANALYSES PHYSIQUES ET CHIMIQUES

IV.1 Propriétés physiques et chimiques

Les analyses physiques et chimiques ont été réalisées au Laboratoire d'analyse de l'Université d'Agronomie et de Foresterie d'Ho Chi Minh Ville, Vietnam. Les mesures et les méthodes utilisées (modifiées avec conditions standards au laboratoire, TCVN) sont regroupées dans le Tableau 4 ci-dessous:

Paramètre mesuré	Méthode
pH eau	-
Matière organique (g.kg^{-1})	Méthode Chiurin
Capacité d'échange cationique (CEC) (cMol.kg^{-1})	Méthode IRRI.ASL
Azote organique (g.kg^{-1})	Méthode Kjeldhal
Azote disponibilité (N_2O_5) (g.kg^{-1})	Méthode Kjeldhal
Phosphore total et disponibilité (P_2O_5) (g.kg^{-1})	Spectrocolorimétrie
Potassium total et échangeable (K_2O) (g.kg^{-1})	Spectrométrie de flamme

Tableau 4 : Les paramètres physico-chimiques mesurés

IV.2 Teneur en plomb des plantes

Les feuilles, les tiges et les racines des plantes sont pesées puis séchées à l'étuve, la teneur en plomb étant estimée par g de poids sec. La teneur en plomb a été déterminée au laboratoire d'analyses chimiques de l'Université d'Agronomie et de Foresterie d'Ho Chi Minh ville à l'aide d'un spectromètre d'absorption atomique (Spectro AA220) (Figure 26).

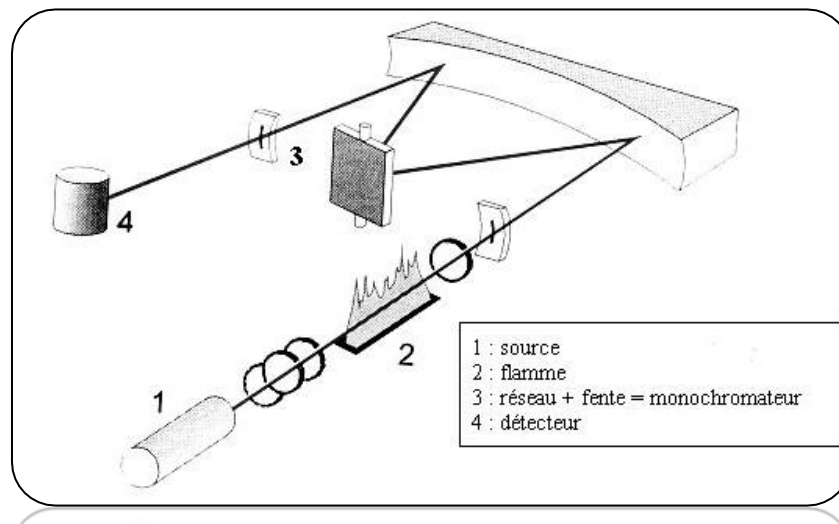


Figure 26 : Spectromètre d'absorption atomique

V/ TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES

V.1 DOSAGES ENZYMATIQUES

V.1.1 Préparation des solutions de sol

Afin de « réveiller » la microflore tellurique du sol, quatre grammes d'échantillon de sol sont ajoutés à 600 µl d'eau distillée et sont ensuite placés en incubation pendant 48h dans une étuve à 25°C (Tabatabai *et al.*, 1994). Pour obtenir des solutions de sol à 1 g.ml⁻¹, on ajoute, après incubation, 4 ml d'eau distillée dans les flacons, qui sont ensuite placés sous agitation magnétique à température ambiante.

Dans le cadre de cette étude, neuf activités enzymatiques ont été recherchées. Pour chaque dosage, 3 essais, 2 témoins enzyme, 1 témoin réactif et 1 témoin substrat sont réalisés.

V.1.2 Dosage des phosphatases (acide et alcaline)

Les activités phosphatases ont été effectuées selon la technique de Nannipieri *et al.* (1995). Deux classes de phosphatases peuvent être distinguées selon leur pH optimum d'activité : les phosphatases alcaline et acide. Les activités phosphatases ont donc été mesurées à deux pH différents : pH 4 pour les acides et pH 9 pour les alcalines. Le milieu réactionnel est composé de 0,1 ml de solution enzymatique, 0,1 ml de substrat et 0,4 ml du tampon Mac Ilvain à pH 4 et tampon Borate à pH 9. Les conditions de réaction standard sont : incubation sous agitation à 37°C pendant 15 min (pour les acides) et 60 min (pour les alcalines), la réaction est arrêtée par l'addition de 100µl de CaCl₂ 0,5N et 400µl de NaOH 1N. Les tubes contenant le mélange sont ensuite centrifugés à 12000 g pendant 5 min. La lecture s'effectue au spectrophotomètre (Genesys 5, BIOLOCK) à une longueur d'ondes de 450 nm et l'activité enzymatique est exprimée en µg de phénol libéré par g de sol sec et par heure.

V.1.3 Dosage des polysaccharidases :

La mesure de l'activité enzymatique est basée sur le dosage des sucres réducteurs produits par l'hydrolyse du substrat (amylase, xylanase et carboxyméthylcellulase) par une technique colorimétrique modifiée par Deng et Tabatabai (1994) et Badiane *et al.* (2001). Pour mesurer les activités polysaccharidases, 0,3 ml de solution de sol sont mélangés à 0,1 ml

de tampon Mc Ilvain pH 5,8 et 0,3 ml de solution substrat (1%). Les tubes sont incubés sous agitation à 37°C pendant 2 heures puis centrifugés 3 min à 15000 t/m. 250 µl de surnageant sont utilisés pour déterminer les quantités de sucres réducteurs produits en utilisant les réactifs de Somogyi (1945) et Nelson (1944). La DO est mesurée à 650 nm. Les activités enzymatiques sont exprimées en µg de sucres réducteurs produits par heure et par gramme de sol.

V.1.4 Dosage des hétérosidases :

Deux hétérosides ont été testés le PNP β-glucoside et le PNP N-acétyl glucosamine. Ils permettent de rendre compte de l'hydrolyse de certaines liaisons glucosidiques présentes dans la plupart des composés polysaccharidiques.

La méthode de révélation est celle décrite par Rouland *et al.* (1986). Pour chaque échantillon, 0,1 ml de sol est incubé pendant 2 heures à 37°C avec 0,4 ml de tampon Mc Ilvain pH 5,8 et 0,1 ml de substrat (10%). La réaction est arrêtée par 3 ml de Na₂CO₃ 2%. La DO est mesurée à 400 nm. L'activité enzymatique est basée sur le dosage des PNP libérés dans le milieu sous l'action de l'enzyme. Elle est exprimée en µg de phénol libéré par heure et par gramme de sol sec.

V.1.5 Dosage des uréases :

Le dosage est effectué selon la technique de Kandeler et Gerber (1988) qui utilise l'urée comme substrat. Après incubation, l'ammoniaque produit par l'hydrolyse de l'urée est dosé par un réactif contenant du dichloroisocyanurate. La DO est ensuite mesurée à 660 nm. Les activités enzymatiques sont exprimées en unité (U) qui correspond à la quantité d'azote libérée (en µg) par gramme de sol sec et par heure.

V.1.6 Dosage de la fluorescéine diacétate hydrolase (FDA)

Le dosage est effectué selon la technique de Schnürer *et al.* (1982). Chaque échantillon de 0,1 ml de sol est incubé pendant 2 heures à 37°C avec 1,5 ml de tampon (pH = 5,8) et 25 µl de diacétate de fluorescéine à 2 mg.ml⁻¹ dans un tube d'ependorff. Les tubes sont ensuite centrifugés à 4°C à 15000 tr.min⁻¹. 750 µl de surnageant sont transférés dans de nouveaux tubes auxquels sont ajoutés 750 µl d'acétone ; puis les tubes sont centrifugés pendant 5 min à 15000 tr.min⁻¹. La DO est mesurée à 490 nm.

V.2 CULTURE MICROBIENNE ET PROFIL PHYSIOLOGIQUE

V.2.1 Numération bactérienne

5 g de chaque échantillon sont placés dans un erlenmeyer stérile de 100 ml contenant 45 ml d'eau physiologique stérile (9 g de NaCl/l d'eau distillée) et mis en suspension à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 30 min. La suspension est ensuite décantée pendant 20 min, puis le surnageant est prélevé, il constitue la dilution 10^{-1} . A partir de cette suspension, des dilutions décimales sont effectuées jusqu'à 10^{-8} . Le milieu utilisé est le milieu NB (NB : extrait de bacto beef, 3 g.l⁻¹ ; bacto pepton, 5 g.l⁻¹, agar, 15 g.l⁻¹), un milieu non spécifique pour bactéries auquel a été ajouté un antifongique (Nystatine).

Ce milieu est ensemencé avec les différentes dilutions précédemment réalisées ; pour chaque dilution, 3 répétitions sont effectuées. Les tubes à essai sont bouchés au coton cardé et incubés à 25°C dans un incubateur thermostaté (ROTATEST, BIOBLOCK). Au bout d'une semaine, les tubes présentant une croissance sont notés « positifs » et le nombre le plus probable de microorganismes capables d'utiliser le substrat proposé dans les conditions de culture est estimé en utilisant le tableau de McCrady (1918) en annexe 1.

V.2.2 Numération fongique

Le milieu Sabouraud (10 g.l⁻¹ de peptone, 40 g.l⁻¹ de glucose et 20 g.l⁻¹ d'agar) est stérilisé dans un autoclave à 120°C pendant 20 minutes. Une fois tiédi, un antibiotique, le chloramphénicol est ajouté à la dose 500 mg.l⁻¹ afin d'inhiber la croissance bactérienne. Le milieu est ensuite réparti dans des boîtes de Pétri carrées de 12 cm de côté.

Cinq grammes de chacun des échantillons sont remis en suspension séparément dans 50 ml d'eau physiologique (9 g.l⁻¹ NaCl). Les suspensions-mères ainsi obtenues sont agitées pendant 3 heures à température ambiante. Des dilutions successives de 10^{-1} à 10^{-3} sont réalisées à partir des suspensions-mères et 100 µl de chacune sont étalés dans les boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé de Sabouraud.

Trois boîtes sont réalisées pour chaque dilution. Les boîtes de pétri ensemencées sont incubées, à l'obscurité, dans une étuve thermostatée à 28°C en aérobiose. Après trois jours de

culture, un dénombrement des colonies et une numération des types morphologiques observés sont effectués. La distinction morphologique des colonies est basée sur des critères macroscopiques de taille, forme, surface, contour, couleur de colonie, formation de spores (forme et couleur), diffusion de pigments dans le milieu, couleur de l'envers de la culture. Ces données morphologiques sont présentées en annexe 2. Les souches intéressantes sont ensuite repiquées sur milieu de Sabouraud pour obtenir des isolats.

V.2.3 Profil physiologique - BIOLOG

Afin d'activer les communautés bactériennes, 5g de chaque échantillon sont préalablement incubés avec 750 µl d'eau distillée dans une étuve à 25°C pendant 48h. Puis, 100 ml d'eau physiologique stérile (9 g de NaCl/l d'eau distillée) sont ajoutés et l'ensemble est mis en suspension à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 30 min à 500 rpm. Les suspensions sont ensuite centrifugées à 800 rpm à température ambiante pendant 30 min. Les surnageants obtenus sont transférés dans de nouveaux flacons et centrifugés encore une fois à la vitesse de 3000 rpm pendant 3 min. Les surnageants finaux sont récupérés.

Des plaques BIOLOG GN2 MicroPlate™ (AES laboratoire, France) sont inoculées à raison de 150 µl de surnageant dans chacun des 96 puits à l'aide d'une pipette multicanaux et sous faible agitation. Les plaques GN2 favorisent le développement des bactéries Gram négatives. Chaque puits contient une source de carbone différente et du chlore de tetrazolium qui va être réduit en un composé violet absorbant à 595 nm, le formazon, lorsque la source de carbone est métabolisée. Les microplaques sont incubées à 25°C. Les lectures à 595 nm sont effectuées à l'aide d'un lecteur de microplaque (EL800-PC, BioTek) toutes les 24 h pendant 150 h.

VI/ TECHNIQUES MOLECULAIRES

VI.1 Extraction ADN à partir de souches fongiques pures

L'extraction de l'ADN des souches pures a été effectuée selon une méthode d'extraction directe qui consiste en une lyse physique et chimique suivie de phases d'extraction au phénol et de précipitation à l'Isopropanol. Une seule colonie de chaque champignon (culture de 7 jours) est prélevée à la surface du milieu de culture solide avec une

spatule stérile et transférée dans un tube eppendorf stérile de 2 ml. Pour éliminer l'agar, 1 g de CsCl est ajouté dans le tube eppendorf, le mélange est ensuite centrifugé à 13000 g pendant 10 minutes. La plus grande partie du mycélium se trouve à la surface de la solution CsCl et peut être prélevée. Les mycéliums sont placés au congélateur à -20°C pour le stockage.

Environ 250 à 300 mg de mycélium sont broyés dans les tubes Eppendorfs de 2 ml contenant 800 µl de tampon CTAB 2% (CTAB, NaCl 5 M, EDTA 0,5 M, et Tris HCl 1 M pH 8) et des billes de zirconium à l'aide d'un beadbeater (Retsch® MM 200, Germany) réglé à 30 Hz. Cette étape est suivie d'une incubation à 65°C pendant 1 heure. Les tubes sont ensuite centrifugés à 12000 g pendant 4 min, à 4°C. Un volume de Phénol Chloroforme Isoamyl (P:C:I/25:24:1) est ajouté au surnageant, puis le tout est homogénéisé lentement pendant 5 min. Le mélange est à nouveau centrifugé (12000 g, 4 min, 4°C) et 600 µl de la phase aqueuse sont placés dans un 'Phase Lock Gel Tube' avec un volume de Chloroforme Isoamyl (C:I/24:1), puis les tubes sont lentement homogénéisés avant d'être centrifugés à nouveau (12000 g, 4 min, 4°C). 500 µl de la phase aqueuse sont ensuite prélevés puis placés dans un Eppendorf de 1,5 ml. La précipitation s'effectue avec 2 volumes d'Isopropanol à -20°C pendant 1 heure. Une nouvelle homogénéisation est effectuée, suivie par une centrifugation à 12000 g pendant 30 min à 4°C. Après récupération de la phase supérieure, le culot contenant l'ADN est lavé dans 500 µl d'éthanol 70°C froid, puis centrifugé à 12000 g pendant 4 min, à 4°C. Le culot est ensuite séché à température ambiante (pendant 15 min) puis suspendu dans 25 µl de tampon TE 1X.

VI.2 Extraction de l'ADN génomique total du sol et des agrégats

L'ADN total des échantillons a été extrait selon la méthode de Porteous *et al.* (1997) légèrement modifiée pour être adaptée à nos échantillons. 1 g de sol est placé dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml. Les tubes sont placés à -20°C pendant 3 heures puis le sol est broyé avec des pilons stériles. Dans les tubes sont ensuite ajoutés 1 ml de solution de lyse stérile (NaCl 0,25 M, EDTA 0,1 M, pH 8) 80 µl de Guanidine isothiocyanate 5 M, 90 µl de SDS 20% et des billes de zirconium. Les suspensions ainsi obtenues sont homogénéisées à l'aide d'un beadbeater (Retsch® MM 200, Germany) réglé à 25 Hz. Les tubes sont ensuite placés à 68°C pendant 1 heure puis refroidis dans un bain d'eau froide. L'ADN est récupéré dans 600 µl de surnageant après centrifugation à 13000 g (12057 rpm) pendant 15 min. 75 µl d'Acétate de potassium 5 M et 250 µl de polyéthylène glycol (PEG) 40% sont ajoutés à l'ADN obtenu

après la lyse cellulaire. La précipitation s'effectue à 4°C pendant 3 heures, elle est suivie d'une centrifugation à 13000 g pendant 15 min. Après la récupération de la phase supérieure, le culot est à nouveau suspendu dans 900 µl de CTAB 2% (NaCl 1,4 M, EDTA 0,1 M, CTAB 2%) qui permet de complexer les acides nucléiques. 900 µl de chloroforme sont ajoutés pour la déprotéinisation après incubation pendant 15 min à 68°C. Le mélange est agité doucement puis centrifugé à 13000 g pendant 10 min à température ambiante. La phase aqueuse contenant l'ADN est récupérée. L'ADN est concentré par plusieurs phases de précipitation : dans 600 µl d'isopropanol à -20°C pendant 30 min puis dans 450 µl d'acétate d'ammonium à 2,5 M et 1 ml d'éthanol 95° à -20°C pendant 1 à 3 heures. Après une dernière centrifugation, le culot est récupéré, lavé dans 1 ml d'éthanol 70° puis recentrifugé à 13000 g pendant 5 min. Le culot séché est remis en suspension dans 25 µl du tampon TE 1X.

VI.3 Contrôle et purification de l'ADN extrait

La pureté de l'ADN extrait est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop (ND-1000 UV-Vis Spectrophotometre, Labtech). Les protéines absorbent à 280 nm, les composés humiques et phénoliques à 230 nm et l'ADN à 260 nm. Ensuite, une étape de purification permet d'éliminer les composés humiques et les autres contaminants à l'aide des kits Spin Column S-400 HR (Amersham).

Les colonnes de purification sont vortexées afin d'homogénéiser la résine puis centrifugées à deux reprises (3000 rpm, 1 min et 4°C) libérant ainsi le tampon initialement présent dans les colonnes. L'ADN est ensuite déposé au centre et en surface de la résine puis après une nouvelle centrifugation (3000 rpm, 2 min et 4°C), le contenu pur des colonnes est récupéré dans un tube Eppendorf stérile. L'ADN ainsi purifié est quantifié au Nanodrop.

VI.4 Amplification de l'ADN par Polymerase Chain Reaction (PCR)

L'amplification d'ADN est effectuée avec de la Taq Polymérase Ready-To-Go (Amersham Pharmacia) dans 25 µl d'un milieu réactionnel contenant 0,25 µM de chaque primer et 50 ng d'ADN matrice. L'amplification est réalisée à l'aide d'un thermocycleur (Eppendorf). En fonction des couples d'amorce utilisées (bactéries et champignons) (Tableau 5A et B), les conditions de températures et le nombre de cycles sont présentés dans les Tableaux 6A et B.

L'amplification est contrôlée en déposant 5 μ l de produit PCR dans les puits d'un gel d'agarose à 1,5 % suivi d'une migration à 100 V pendant 60 min. Le gel est ensuite coloré 15 min au BET (bromure d'éthidium), rincé dans de l'eau distillée pendant 15 min également puis photographié sous UV.

Amorce	Séquence (5' → 3')	Référence
*338f	GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG	Lane <i>et al.</i> (1991)
518	ATT ACC GCG GCT GCT GG	Muyzer <i>et al.</i> (1993)
**rpoB1698f	AAC ATC GGT TTG ATC AAC	Dahllöf <i>et al.</i> (2000)
rpoB2041r	CGT TGC ATG TTG GTA CCC AT	Dahllöf <i>et al.</i> (2000)
*gc clamp	5'- CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G - 3'	
**gc clamp	5'- CGC CCC CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC C - 3'	

Tableau 5A : Amorces utilisées pour l'amplification de l'ADNr bactérien

Amorce	Séquence (5' → 3')	Référence
403f	GTG AAA TTG TTG TTG AAA GGG AA	Sandhu <i>et al.</i> (1995)
662r	GGA CTC CTT GGT CCG TGT T	Sandhu <i>et al.</i> (1995)
*ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	White <i>et al.</i> (1990)
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White <i>et al.</i> (1990)
*gc clamp	5'- CGCCCCGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG - 3'	

gc clamp attaché à l'extrémité 5' de la séquence du primer (Sheffield *et al.*, 1992)

Tableau 5B : Amorces utilisés pour l'amplification de l'ADNr fongique

Couple d'amorce	Etape d'amplification	Température (°C)	Temps	Nombre de cycles
338f/518r	Dénaturation initiale	94	5 min	30
	Dénaturation	94	1 min	
	Hybridation	65	1 min	
	Elongation	72	3 min	
	Elongation final	72	10 min	
1698f/2041r	Dénaturation initiale	94	5 min	10
	Dénaturation	94	60 sec	
	Hybridation	40	90 sec	
	Elongation	72	120 sec	
	Dénaturation	94	60 sec	25
	Hybridation	50	90 sec	
	Elongation	72	120 sec	
Elongation final	72	15 min		

Tableau 6A : Conditions d'amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR) pour les bactéries

Couple d'amorce	Etape d'amplification	Température (°C)	Temps	Nombre de cycles
403f/662r	Dénaturation initiale	94	5 min	30
	Dénaturation	94	45 sec	
	Hybridation	60	45 sec	
	Elongation	72	1 min	
	Elongation final	72	30 min	
ITS1/ITS4	Dénaturation initiale	94	30 sec	35
	Dénaturation	94	30 sec	
	Hybridation	50	1 min	
	Elongation	72	2 min	
	Elongation final	72	10 min	

Tableau 6B : Conditions d'amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR) pour les champignons

VI.5 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

Après l'amplification, 15 µl de produits PCR avec 5 µl de bleu de charge sont déposés sur un gel de polyacrylamide à 8% avec un gradient linéaire de dénaturant chimique de 30% à 60% constitué par de l'urée à une concentration de 7 M et du formamide à 40%. Le gel est préparé avec un Gradient Mixer (Roth Karlsruhe, Allemagne) connecté à une pompe péristaltique. Le gel est ensuite déposé dans une cuve de migration (D-Code Universal Mutation Detection System, Bio-Rad, Californie, USA) reliée à un générateur (PROLABO, Fontenaysous-Bois, France). Après 16 heures de migration à 75 Volts dans un tampon TAE 1X à une température constante de 60°C, les gels sont révélés au SYBERGREEN pendant 30 minutes au froid 4°C, puis rincés 2 fois avec de l'eau milliQ et photographiés avec le système UV (Fischer Bioblock Scientific, Illkirch, France) en utilisant le logiciel BiocaptMW (Vilber-Lourmat, France). Les bandes de DGGE sont analysées grâce au logiciel GelCompar II (Applied Maths, Sint-Martens, Belgique).

VI.6 Identification et analyse des produits d'amplification

Les séquences obtenues sont comparées à celles déjà répertoriées dans la banque de gènes du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) à l'aide de l'option 'BLAST search'. Les pourcentages de similarité sont ensuite déterminés entre les séquences isolées au cours de cette étude et les séquences les plus proches répertoriées dans GenBank ou RDPII (Ribosomal Data Project). Les séquences sont considérées similaires lorsqu'elles ont un pourcentage de similarité au moins égal à 97% (Wang *et al.*, 1997).

VII. Analyse statistique

Des analyses de variance (ANOVA) ont été réalisées avec le logiciel STATGRAPHICS afin de comparer les différentes données obtenues. Le test Tukey HSD a été utilisé pour toutes les comparaisons multiples au seuil de 5%. L'analyse en composante principale (ACP) a également été réalisée avec le package ADE-4.

PARTIE C : RESULTATS

Chapitre C-I : Effet des vers sur la croissance de *Lantana camara* et sur la phytoextraction du Pb

Dans le cadre de cette thèse, une expérimentation en pots a été menée sur le terrain (HCMV - Vietnam) avec une plante hyperaccumulatrice (*Lantana camara* L.) (Diep, 2003) et un ver de terre (*Pontoscolex corethrurus*) dans un sol contaminé par l'ajout d'une solution de Pb à deux concentrations de 500 et 1000 mg.kg⁻¹. Le suivi du ver de terre, la croissance de la plante, les teneurs en métaux lourds de ses parties végétatives et racinaires ont été suivies au cours du temps en fonction des différentes situations expérimentales.

A/ *Pontoscolex corethrurus*

A.1 Survie

Deux durées d'expérimentations ont été testées : un et deux mois. Lors de la mise en place de l'expérimentation, dix vers de terre sont placés dans chaque pot. A la fin de l'expérimentation, les vers survivants ont été comptés et pesés. Une mortalité importante (> 50%) des vers a été observée au bout de deux mois, c'est pourquoi nos analyses n'ont porté que sur l'expérimentation d'un mois.

Au bout d'un mois, le taux moyen de survie du ver est de 88% (Tableau 7). Il n'existe aucune différence significative entre les expérimentations sans plante avec ou sans plomb. Ceci indique que le ver de terre, *Pontoscolex corethrurus* résiste sans symptôme visible d'intoxication aux deux taux de contamination par le plomb à savoir 500 mg.kg⁻¹ et 1000 mg.kg⁻¹. Par contre, les vers de terre ont présenté une survie significativement plus faible (70%) dans les pots contenant la plante phytoremédiatrice et le taux maximum de Pb.

Traitement	Nombre de ver (ver/pot)		% Vivant
	Avant d'expérimentation	Après d'expérimentation	
Non-Pb, vers	10	9,00 ± 0,0 (a)	90,00
Non-Pb, plante et vers	10	9,00 ± 1,0 (a)	90,00
500 mg.kg ⁻¹ Pb, vers	10	9,67 ± 0,6 (a)	96,67
500 mg.kg ⁻¹ Pb, plante et vers	10	9,67 ± 0,6 (a)	96,67
1000 mg.kg ⁻¹ Pb, vers	10	8,67 ± 1,1 (a)	86,67
1000 mg.kg ⁻¹ Pb, plante et vers	10	7,00 ± 1,0 (b)	70,00

Tableau 7 : Nombre de vers récoltés après un mois traité au plomb

A.2 Production de structures biogéniques turricules

L'activité des vers se traduit au niveau du sol par la production de structures biogéniques, de turricules, épigés ou hypogés, et de galeries. L'importance des structures produites permet d'une part d'estimer la « bonne santé » des vers de terre, d'autre part, ces structures étant le siège d'une forte activité microbienne, leur importance influe sur l'activité biologique du sol (Lavelle, 1988 ; Lavelle et Spain, 2001).

A la fin de l'expérimentation, les structures biogéniques produites par les plantes et les vers ont été collectées et triées selon les méthodes décrites précédemment (cf. Matériel et Méthodes). Cependant, l'activité des vers ayant été très importante, dans les pots expérimentaux contenant *L. camara*, certaines structures mixtes n'ont pu être différenciées.

Traitement	Agrégat de drilosphère Poids (g)	Agrégat mixte (drilosphère et racinaire associés)-Poids(g)	Total Poids (g)
Non-Pb, ver	1961 ± 484 (b)	-	1961
Non-Pb, plante et ver	1413 ± 583 (a)	1078 ± 119	2491
500 mg.kg ⁻¹ Pb, ver	3412 ± 280 (c)	-	3412
500 mg.kg ⁻¹ Pb, plante et ver	1383 ± 569 (a)	1025 ± 43	2408
1000 mg.kg ⁻¹ Pb, ver	2323 ± 87 (b)	-	2323
1000 mg.kg ⁻¹ Pb, plante et ver	1533 ± 351 (a)	859 ± 312	2392

Tableau 8 : Proportion des agrégats

Dans le système SV (sol-ver), le poids des turricules obtenus avec une pollution à 500 mg.kg⁻¹ est plus élevé de manière significative que ceux des turricules des pots non traités et des pots traités à 1000 mg.kg⁻¹. Aucune différence significative n'a pas pu être notée entre les poids des turricules des pots traités au plomb et des pots non traités dans le système SPV (sol-plante-ver).

Par ailleurs, en présence de *Lantana camara* la production de turricules par les vers est inférieure dans tous les traitements à ce que l'on observe en absence de plante (Tableau 8). Cependant si l'on ajoute les agrégats mixtes, on retrouve des chiffres voisins de ce qui est observé dans les pots sans plante. Il est donc probable que la diminution observée du poids des structures produites par les vers soit plus due à une difficulté technique de différenciation des structures qu'à une baisse d'activité des vers.

B/ *Lantana camara*

Durant toute la période de l'expérimentation, une observation visuelle (décoloration, jaunissement, pigmentation, nécroses, flétrissement...) et une mesure de la croissance de la partie aérienne des plantes (nombre de feuilles, de rameaux, longueur et largeur du pied) est réalisée chaque semaine.

B.1 Observation des plantes

Au cours de l'expérience, 1 plante sur les 5 contaminées au Pb 1000 mg.kg^{-1} et sans vers est morte (Figure 27). Après seulement une semaine, l'aspect extérieur de cette plante est modifié : les feuilles commencent à se faner, puis des taches brunes apparaissent, les feuilles ensuite noircissent et tombent. Nous formulons ici l'hypothèse que l'état de « santé » de cette plantes était peut-être faible par rapport aux autres et qu'elle a donc été plus sensible à la forte concentration en plomb. Pour le reste de notre étude, cette plante a été éliminée des analyses.

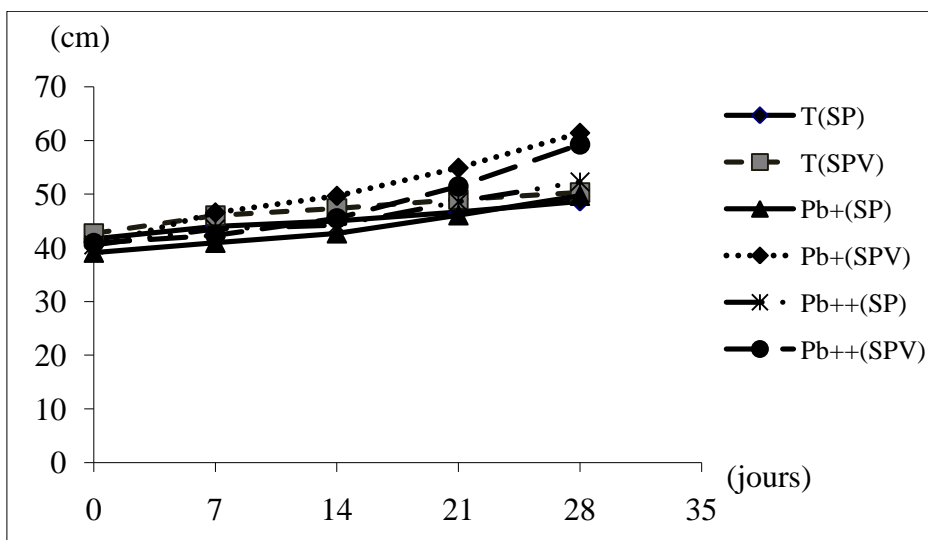


Figure 27 : Plante sensible à la concentration de 1000 mg.kg^{-1}
(sans ver de terre)

B.2 Suivi de la croissance des plantes

Durant toute la période de l'expérimentation, une mesure de la croissance en largeur et en hauteur des plantes est réalisée chaque semaine (Figure 28 a et b).

(a) Hauteur



(b) Largeur

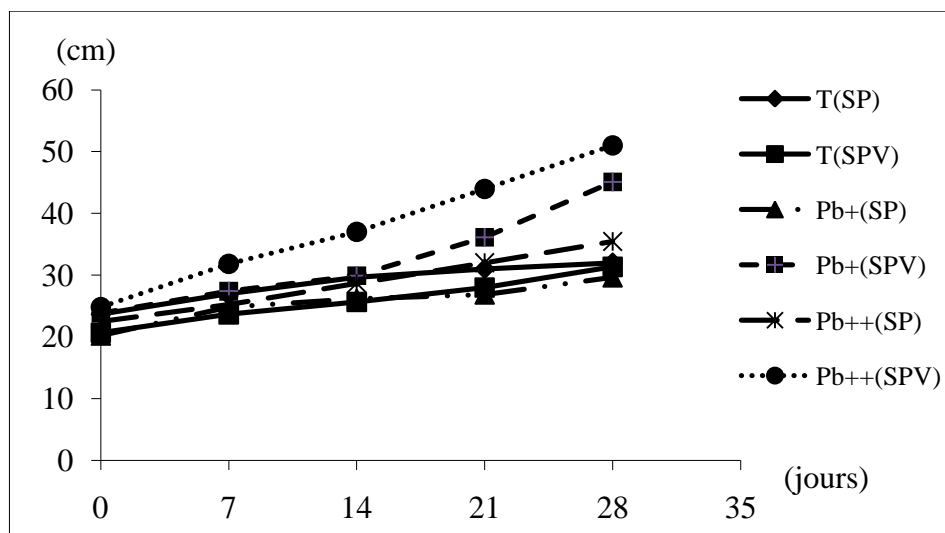


Figure 28 : Suivi de croissance de la plante (a) Hauteur, (b) Largeur

Mis à part le cas signalé de la plante qui est morte, tous les *L. camara* se sont développés régulièrement indépendamment de la présence de plomb. La croissance de la plante augmente régulièrement avec le temps, la croissance en largeur étant plus nette que la croissance en hauteur ce qui est normal pour une plante buissonnante.

B.3 Comparaison des croissances en fin d'expérimentation

A la fin de l'expérimentation, une mesure de la taille et de la largeur de toutes les plantes a été réalisée (Figure 29).

(a) Le système SP (Sol-Plante)

Aucune différence significative n'a pu être notée entre le taux de croissance en hauteur des plantes traitées au Pb 1000 ppm, et des plantes non traitées. Par contre la croissance en largeur est plus importante pour les plantes qui poussent en présence de Pb, indépendamment de la dose.

(b) Le système SPV (Sol-Plante-Ver)

Les plantes sont significativement plus développées dans les pots qui ont reçu une solution de Pb. Il n'y a aucune différence significative de croissance entre les plantes soumises aux deux doses de plomb.

(c) Comparaison des systèmes SP et SPV

En absence de Pb, il n'existe que peu de différences entre la croissance des plantes avec ou sans vers de terre. Par contre lorsque le sol est pollué au Pb, les plantes présentent une croissance significativement plus importante dans les pots contenant des vers de terre que dans ceux où ils sont absents.

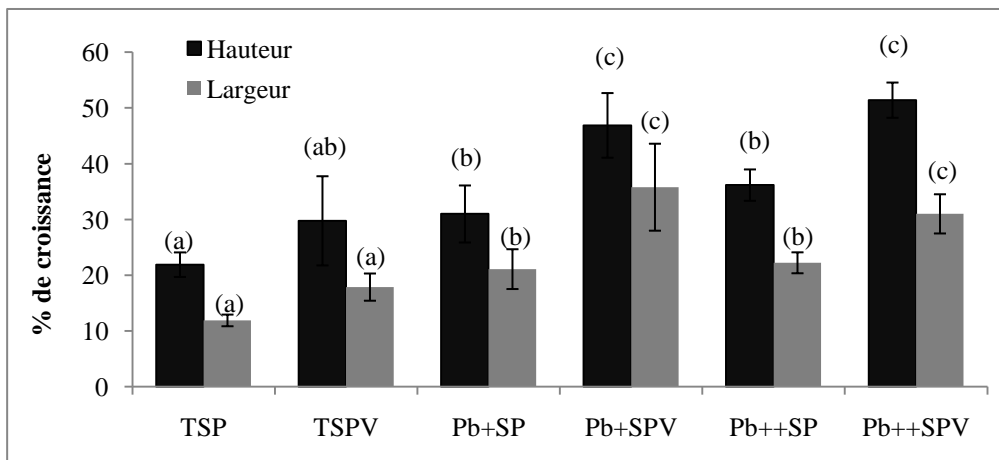


Figure 29 : Pourcentage de croissance de la hauteur et de la largeur des plantes
 Pb+ et Pb++ : les traitements soumis à 500 et 1000 mg.kg⁻¹ du Pb
 SP : Sol + Plante ; SPV : Sol + Plante + Ver

B.4 Etude de la biomasse

En fin d'expérimentation, les parties aériennes et racinaires de la plante sont récoltées séparément, séchées et pesées (Figure 30).

(a) Le système SP

La biomasse de la tige et celle des racines sont significativement plus élevées dans les pots ayant reçu une solution de Pb quelle qu'en soit la concentration (500 ou 1000 mg.kg⁻¹). La biomasse foliaire n'est pas modifiée par les traitements au Pb.

(b) Le système SPV

Comme pour le système SP, aucune différence significative n'a pu être notée entre la biomasse foliaire des pots contenant du Pb ou n'en contenant pas. Par contre les biomasses de tiges et de racines des plantes ayant reçu du Pb aux deux concentrations sont significativement plus importantes que celles obtenues dans les pots témoins.

(c) Comparaison SP et SPV

Aucune différence significative n'apparaît chez les plantes témoins sans Pb cultivées avec ou sans vers. Par ailleurs, les plantes ayant poussé en présence de vers de terre, sur des sols pollués au Pb, présentent des biomasses aériennes et racinaires plus importantes que les plantes cultivées sans vers. Concernant la biomasse des tiges, il existe aussi une différence significative entre les deux doses de Pb, la biomasse la plus élevée étant obtenue avec 500 mg.kg⁻¹.

Ainsi, la présence de vers dans le sol témoin ne stimule pas la croissance des plantes. Par contre, un net effet bénéfique des vers s'observe lorsque les plantes sont cultivées sur des sols traités au plomb.

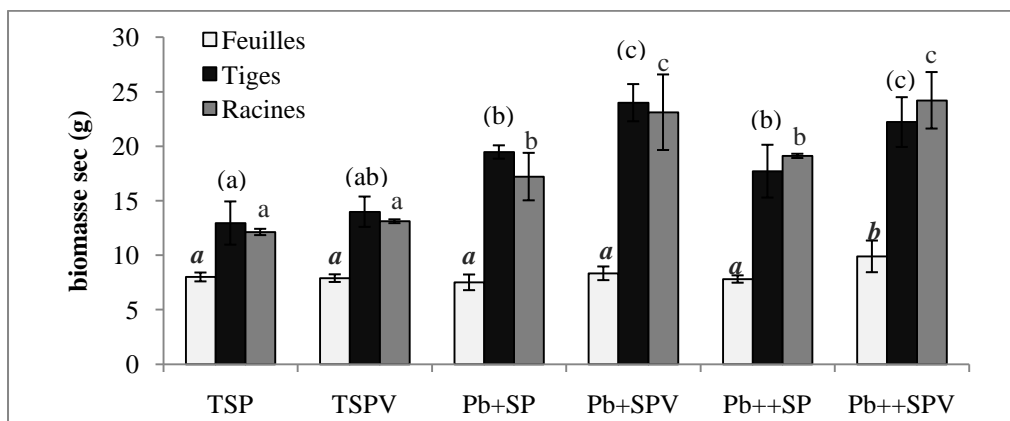


Figure 30 : Biomasse fraîches des feuilles, des tiges et des racines des plantes

C/ Article 1 : Impact de la présence du vers, *Pontoscolex corethrurus* sur l'absorption de plomb par la plante, *Lantana camara*

Résumé

L'influence d'une espèce de ver de terre endogé, *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae), sur la croissance et les capacités de phytoextraction du plomb par *Lantana camara* (Verbenaceae) a été étudiée sur un sol contaminé artificiellement par 500 ou 1000 mg Pb kg⁻¹. L'activité des vers de terre augmente significativement la biomasse des parties aériennes et souterraines des *L. camara* cultivés en présence de Pb (1,75 et 1,71 fois plus élevée pour des teneurs en Pb de 500 mg.kg⁻¹, 1,63 et 1,27 fois plus élevée pour des teneurs en Pb de 1000 mg.kg⁻¹) alors que leur présence ne modifie pas significativement la croissance des plantes cultivées sur des sols non pollués. Lorsque les plantes sont cultivées en présence de *P. corethrurus*, la quantité de Pb extraite par *L. camara* est multipliée par 2 avec 500mg Pb kg⁻¹ et par 3 avec 1000 mg Pb kg⁻¹.

**Ces résultats ont fait l'objet d'une publication sous presse
à "Biology and Fertility of Soil"
EFFECTS OF *PONTOSCOLEX CORETHRURUS* (*Glossoscolecidae*) ON LEAD
ABSORPTION BY *LANTANA CAMARA L.* (*Verbenacea*)**

HUYNH Thi My Dung, DIEP My Hanh, PANDO Anne, PHAM-Thi Anh-Thu,
ROULAND-LEFEVRE Corinne

Abstract

The effects of the endogeic earthworm, *Pontoscolex corethrurus* (*Glossoscolecidae*), on the growth and lead phytoextraction process of *Lantana camara* (*Verbenaceae*) were studied on soil artificially contaminated with 500 or 1000 mg Pb kg⁻¹. Earthworm activity significantly increased the shoot and root biomass in soils contaminated with lead (1.75 and 1.71 times higher for 500 mg Pb kg⁻¹, 1.63 and 1.27 times higher for 1000 mg Pb kg⁻¹, respectively). However, the effect of earthworms on plant growth was not significant in soils not contaminated with lead. The lead phytoextraction by *L. camara* was also higher in the soils with earthworms, with the total lead uptake higher by factors of 2.96 and 2.03 at the two different contamination levels.

Key words: *Pontoscolex corethrurus*, *Lantana camara*, Heavy metal, Phytoextraction.

1. Introduction

Over the past few decades, the mining industry has produced a large amount of acid, metal-rich waste which has often created a serious risk to the soil environment (1). The nature and extent of this contamination is highly variable, depending on the nature of each mine's ore body and its associated geological strata and climate (2). It is, therefore, important to make an accurate assessment of the availability and toxicity of heavy metals in each polluted soil.

Phytoextraction is a technology that uses plants to extract metals from contaminated soils and accumulate them in harvestable parts which can then be removed from the site (3,4). This appears to be a cost-effective, non-intrusive and environmentally friendly technique compared to conventional techniques and promises to be a phytotechnology with great potential for solving the problem of soils polluted with metals (5). Improving the phytoextraction process is a primary goal of current research. There are several avenues of study for increasing the efficiency of remediation. (i) Identify new hyperaccumulator species with the requisite properties such as high biomass, high metal uptake and ease of propagation. (ii) Increase the biomass of the hyperaccumulator plant by adding fertilizer or using plant growth hormones (e.g. IAA, gibberellins or cytokinin), associating them with Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) (6,7). (iii) Inoculate the soil with a bacterial community improving the availability of the metals (8) and/or with Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) (9). (iv) Increase the metal content in the plant by the addition of chelating agents such as glycoetherdiamine tetra-acetic acid (EGTA) or NTA (nitrilotriacetic acid) (7,10,11).

Little is known about how the relationships between roots, microorganisms and soil fauna in the rhizosphere affect plant growth and metal uptake. Only a few studies have been carried out into microorganism-assisted metal extraction by plants. Braud et al. (8) showed that inoculating the soil with free cells of *R. metallidurans* gave a five-fold increase in Cr accumulation in maize shoots and inoculating the soil with immobilized *P. aeruginosa* cells gave five-fold and three-fold increases in Cr and Pb uptake, respectively. There have been no studies on the effects of soil fauna on phytoremediation. Earthworms are important components of the rhizosphere ecosystem and can significantly increase plant production by improving soil fertility and nutrient cycling (12), although other interactions (e.g. between earthworms and root pathogens or beneficial soil microorganisms) may also affect plants (13). Some earthworms (for example *Lumbricus terrestris*, *Lumbricus rubellus*, or *Aporrectodea*

caliginosa) can survive in soils polluted with heavy metals and can even accumulate heavy metals such as Cd, Pb, Cu and Zn (14-16). Earthworms can also increase metal availability in soil by burrowing and casting and can, therefore, modify the efficiency of phytoremediation (17). The presence of earthworms can also increase Zn availability (18), although the authors suggested that the main reason for the increase in Zn uptake by the plants was probably the increase in the production of dry matter stimulated by earthworms.

Lantana camara L., which is an hyperaccumulating plant owing to its remarkable capacity to extract lead and cadmium from polluted soils in Vietnam (19), has been suggested as a model species for research on phytoextraction of metals. However, the species *Pontoscolex corethrurus* (Oligochaeta, Glossoscolecidae), which is an endogenous tropical earthworm, is very common in wetlands in Vietnam in both polluted and unpolluted areas. The burrowing and casting activities of this species have considerable impact on soil structure (20). Moreover, this species plays an important role on the rates of mineral N availability for plants, the assimilation of phosphorous and in the recycling of other nutrients and could, therefore, be involved in phytoextraction of metals (21,22).

This study sets out to determine the impact of the *Pontoscolex corethrurus* earthworm on *Lantana camara* growth and the phytoextraction process in soil artificially contaminated with lead at different levels.

2. Materials and methods

2.1. Soil collection and characterization

Unpolluted soil was collected from the A1 horizon in the grounds of the Phu An Ecomuseum, Binh Duong Province, Vietnam. It was an acid (pH=5), sandy (19.9% sand, 72.2% silt, and 7.9% clay) soil with an intermediate fertility of 34.2% OM, 4.9% total N, 7.9% P and tested negative for heavy metal pollution. The soil was sieved to < 5 mm, air-dried and mixed to obtain homogenous soil samples. Experimental pots (microcosms) were filled with 10 kg of dry soil. The soil was artificially contaminated with lead $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ at 500 mg.kg⁻¹ and 1000 mg.kg⁻¹ dry weight (DW). The soil's field capacity was determined using five additional microcosms by weighing the pots after draining the soil for 24 hours.

2.2. Biological material

At the Phu An Ecomuseum, 200 seedlings were planted in plastic pots ($V=5$ L) in a mixture of grey soil, manure and coconut fiber (1/3, 1/3, 1/3). After one month, seedlings of similar size (40cm high, 20 cm diameter) were transferred to the microcosms. The plants were grown on outside under a single set of conditions - day/night, temperature and water (300 ml in the morning and 200 ml in the evening). To remove variations due to lighting, the pots were covered by a bamboo roof and the pots were randomly distributed.

Earthworms, *P. corethrurus*, were hand-collected from grassland in Bien Hoa, (Dong Nai Province) that had not been contaminated with heavy metals. The earthworms were kept in the Bien Hoa soil in plastic boxes for 1 week to monitor their health before starting the experiments. Ten adult earthworms (± 10 g) were put into each pot to provide a density of 100 g m^{-2} as for a previous experiment (unpublished results).

2.3. Experimental design

The experiment was carried out using three processes combined with three levels of lead contamination in five replicates for each. The processes were soil + plant (P), soil + earthworm (E) and soil + plant + earthworm (PE). The levels of lead contamination were control without lead (nPb), soil contaminated with 500 mg.kg^{-1} lead (lPb) and soil contaminated with 1000 mg.kg^{-1} lead (hPb). The experiment was carried out for one month.

2.4. Harvesting and soil sampling

The shoots were removed by cutting above the soil surface and the fresh biomass was assayed immediately. For each replicate, the bamboo was individually harvested and the leaves and stems were collected separately. They were then put in paper bags and dried at 60°C for one week. The contents of the pots were transferred onto a large plastic sheet. The earthworms were removed, weighed and kept in 90% alcohol for further analysis. The soil from each pot was kept in laboratory conditions for separation of plant and earthworm aggregates (23). Before the aggregates were separated, dry roots were removed from the soil, washed twice in ultra-pure water, dried and weighed. The plant aggregates in the rhizosphere and the earthworm casts in the drilosphere were separated, sieved and kept for further analysis (biochemical and molecular) not presented in this paper.

2.5. Lead analysis

The shoots and roots were washed thoroughly in deionized water to remove soil particles. They were then oven-dried at 70°C for 48 hours and their dry weights recorded. Subsamples of dried plant tissue were digested in a mixture of HNO₃/HClO₄ and the lead concentration in the sample was determined by AAS (atomic absorption spectrophotometry, Varian Spectra AA220).

2.6. Statistical analysis

Differences between the contamination levels and processes (nPb-E, nPb-P, nPb-PE, IPb-E, IPb-P, IPb-PE, hPb-E, hPb-P and hPb-PE) were analyzed by one-way ANOVA (STATGRAPHICS, Centurion) followed by Tukey's HSP test to establish the significance of the differences among means at the $P < 0.05$ level.

3. Results

3.1. Plant biomass

The average shoot and root dry biomass was significantly ($P < 0.05$) higher for soil contaminated with lead than for the controls (Table 1). The lower lead concentration (500 mg.kg⁻¹) gave a higher biomass (g DW pot⁻¹) than the higher concentration (1000 mg.kg⁻¹). However, the ratio between dry weights of the stems and the dry weights of the leaves was also higher for lead contaminated soil, indicating that, while the biomass of the stems was significantly higher for lead contaminated soil, the biomass of the leaves did not depend on the contamination.

For plants cultivated with earthworms, the shoot and root biomass was significantly higher ($P < 0.05$) than in the absence of earthworms (Table 1). The average difference in biomass of the shoots and roots did not depend significantly on the lead concentration (500 mg.kg⁻¹ or 1000 mg.kg⁻¹)

3.2. *Lantana camara* metal uptake

AAS analysis of the mineral content of the roots and shoots of the controls showed that they were lead-free (Table 2). However, plants grown in lead contaminated soils accumulated an average of 946.83 mg and 1645.90 mg of lead per kg of dry root material for 500 mg.kg⁻¹

and 1000 mg.kg⁻¹ lead respectively. The lead concentration in the shoots was significantly lower than in the roots, regardless of the concentration of lead. However, the ratio of lead translocated to the aerial parts (TF = concentration in the shoots / concentration in the roots) was 0.053 (500 mg.kg⁻¹) and 0.152 (1000 mg.kg⁻¹) which is significantly dependent on the concentration of lead in the soil.

Inoculating the soil with earthworms resulted in a positive increase in the quantity of accumulated lead in the roots and in the shoots (Table 2). This increase was significant for both concentrations of lead. In the presence of earthworms, the total lead uptake in the shoots and roots was 3-fold and 2-fold higher at lead concentrations of 500 mg.kg⁻¹ and 1000 mg.kg⁻¹ respectively.

The TF was also significantly higher in the presence of earthworms for the soil with 1000 mg.kg⁻¹ lead.

4. Discussion

The survival rate observed for the plants growing in lead contaminated soil after one month, the absence of visible damage to the leaves and the significant increase in growth confirmed the high metal tolerance of *Lantana camara* (Verbenaceae). In lead contaminated soil, *Lantana camara* achieved a higher biomass than the controls. These results can be compared to those of Epelde et al. (24) for the hyperaccumulator plant *Thlaspi caerulescens* which, when exposed to Cd and Zn showed higher biomass and values of photosynthetic pigments than those observed in controls.

At first, *Lantana camara* accumulated lead in its roots and then the lead was transferred towards the aerial parts where it was also accumulated in large quantities. For both concentrations of lead in the soil, the shoot-to-root lead concentration ratio was less than 1. This is a lower value than expected for hyperaccumulator plants which typically have a shoot-to-root metal concentration ratio of more than 1 (25). However, the potential of *Lantana camara* (Verbenaceae) for lead extraction was only discovered very recently by Diep (19) and so there are few studies of its metal tolerance and phytoextraction potential. Further studies on *L. camara* physiology, currently underway, may explain this difference in the shoot-to root lead ratio.

This study shows that the efficiency of *L. camara* phytoextraction depends on the concentration of lead in the soil. Similarly, the Zn uptake by *T. caerulea* increased linearly according to Zn concentration in the 1-1000 mmol m⁻³ range, but concentrations greater than 1000 mmol m⁻³ resulted in toxicity and decreased Zn uptake (26). In this study, the total lead values (shoot and root) and the shoot-to-root lead concentration ratio were higher at 1000 mg Pb kg⁻¹ than those at 500 mg Pb kg⁻¹. This result suggested that, even at this higher concentration, lead was favorable for the growth of *L. camara*.

Although the abundance of earthworms in the microcosms was higher than the average abundance of 20 g.m⁻² observed in the field (27) and a little lower than the 127 g.m⁻² used for *Millsonia anomala* by Blouin et al. (28), after one month, most of the earthworms were still alive (> 90%) and the soils had been completely burrowed by earthworms. This indicated that *P. corethrurus* had a high tolerance to lead ions in these experimental conditions. This tolerance could be due, as suggested by Morgan et al. (14), to the ability of earthworms to accumulate metal in their tissues and to detoxify using mechanisms such as binding and storing the lead in metallothionein.

In uncontaminated soils, the effect of earthworms on the plant growth was not significant. However, several mechanisms by which earthworms modify plant growth directly and indirectly have been studied. Blouin et al. (28) determined five reasons which could be invoked to explain the positive effects of earthworms: (i) increased mineralization of organic matter in the soil, increasing nutrient availability (e.g. phosphorus availability), (ii) modification of the soil structure to change water and oxygen availability for plants, (iii) production of plant growth stimulating microorganisms, (iv) dispersal of microorganisms antagonistic to root pathogens and (v) stimulation of symbionts. The lack of effect on the growth of *L. camara* in the presence of *P. corethrurus* could be explained by the absence of pathogens in this experiment, the special metabolism of the plant that makes it useful for remediation and the low volume pots that could limit beneficial effect of earthworms on soil structure.

In the microcosms contaminated with lead, the presence of *P. corethrurus* resulted in increased shoot and root biomass as well as increased lead uptake by *P. corethrurus*. These results agreed with those of Wang et al. (18) who reported increased Zn phytoextraction by ryegrass and Indian mustard when the soil was inoculated with the earthworm *Pheretima* sp.

Other studies have shown that earthworms can influence the metal availability in soil by mixing deep soils; humus and biological material in the earthworm gut (29). Furthermore, lead has been shown to have low mobility in soil (less than Cd and Zn) and to form organic complexes which make it unavailable for plants (30). Ma et al. (17) demonstrated that the concentration of available Pb was increased by up to 48.2% by earthworm inoculation and Chen (31) suggested that earthworm burrowing and feeding activities increased metal bioavailability.

In conclusion, *Lantana camara* proved its capacity to grow well in soil contaminated with a high lead concentration. Efficient phytoextraction needs hyperextracting plants to remove heavy metals from polluted soils but also a high shoot-to-root for accumulating metals in the harvestable parts (32). The remediation efficiency also depends on the amount of aboveground biomass and the bioavailability of metals (33). This study shows that *P. corethrurus* earthworms survived in lead polluted soils and that their activities improved plant growth and phytoextraction of Pb. They also had a positive effect on the root biomass and TF. These results clearly demonstrate that the association of *P. corethrurus* and *L. camara* has considerable potential as an efficient lead phytoextractor. Studies are now being carried out to gain a better understanding of the relationships between plant and earthworm and improve their remediation efficiency.

Acknowledgements

This work was funded by IRD, Institut de Recherche pour le Développement in France. We should like to thank Mrs. DIEP My-Hanh (Phu An Bamboo Village, Binh Duong Province, Vietnam) for helping during our experiments and providing the *Lantana camara* plants. Our thanks also go to the University of Agriculture and Forestry of Ho Chi Minh City in Vietnam for chemical and physical analysis.

References

- (1) A.S. Sheoran, V. Sheoran, Heavy metal removal mechanism of acid mine drainage in wetlands: A critical review. *Minerals Engineering* 19 (2006) 105-116.
- (2) D.B. Johnson, K.B. Halberg, Acid mine drainage remediation options: a review. *Science of the Total Environment* 338 (2005) 3-14.
- (3) K. Shah, J.M. Nongkynrih, Metal hyperaccumulation and bioremediation. *Biologia Plantarum* 51 (2007) 618-634.
- (4) S.P. McGrath, Phytoextraction for soil remediation. In R.R. Brooks (ed.) *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. CAB Int., Wallingford, UK, 1998, pp. 261-287.
- (5) D.J. Glass, Economic potential of phytoremediation. In Raskin I. and Ensley B.D. (ed.). *Phytoremediation of toxic metals*. John Wiley and Son, New York, 2000, pp.15-31.
- (6) Y. Ma, M. Rajkumar, H. Freitas, Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by *Brassica juncea*. *Journal of Environmental Management* 90 (2009) 831-837.
- (7) A.C. Monstant, C. Tang, A.J.M. Baker, The effect of nitrogen form on rhizosphere soil pH and zinc phytoextraction by *Thlaspi caerulescens*. *Chemosphere* 73 (2008) 635-642.
- (8) A. Braud, K. Jézéquel, S. Bazot T. Lebeau, Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb- contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. *Chemosphere* 74 (2009) 280-286.
- (9) E.T. Pawlowska, L.R. Chaney, M. Chin, I. Charvat, Effects of metal phytoextraction practices on the Indigenous community of arbuscular mycorrhizal fungi at a metal contaminated landfill. *Applied and Environmental Microbiology* (2000) 2526-2530.
- (10) A. Kayser, K. Wenger, A. Keller, W. Attinger, W. Felix, S.K. Gupta, R. Schulin, Enhancement of phytoextraction of Zn, Cd and Cu from calcareous soil: the use of NTA and sulfur amendments. *Environmental Science and Technology* 34 (2000) 1778-1783.
- (11) N. Finzgar, D. Lestan, The two-phase leaching of Pb, Zn and Cd contaminated soil using EDTA and electrochemical treatment of the washing solution. *Chemosphere* 73 (2008) 1484-1491.
- (12) G.G. Brown, C.A. Edwards, L. Brussaard, How earthworm affect plant growth: burrowing into the mechanisms. In: Edwards, C.A. (Ed.), *Earthworm Ecology*. CRC Press, Boca Raton, USA, 2004, pp.13-49.
- (13) S. Scheu, Effects of earthworms on plant growth: patterns and perspectives. *Pedobiologia* 47 (2003) 846–856.

- (14) J.E. Morgan, A.J. Morgan, The accumulation of metals (Cd, Cu, Pb, Zn and Ca) by two ecologically contrasting earthworm species (*Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa*): implications for ecotoxicological testing. *Applied Soil Ecology* 13 (1999) 9-20.
- (15) R. Kızılkaya, Cu and Zn accumulation in earthworm *Lumbricus terrestris* L. in sewage sludge amended soil and fractions of Cu and Zn in casts and surrounding soil. *Ecol. Eng.* 22 (2004) 141–151.
- (16) R. Kızılkaya, The role of different organic wastes on zinc bioaccumulation by earthworm *Lumbricus terrestris* L. (Oligochaeta) in successive Zn added soil. *Ecol. Eng.* 25 (2005) 322–331.
- (17) Y. Ma, Dickinson, N.M., Wong, M.H., Toxicity of Pb/Zn mine tailings to the earthworm *Pheretima* sp. and the effects of burrowing on the metal availability. *Biol. Fertil. Soils* 36 (2002) 79-86.
- (18) D. Wang, H. Li, Effect of earthworms on the phytoremediation of zinc-polluted soil by ryegrass and Indian mustard. *Biol. Fertil. Soils* 43 (2006) 120-123.
- (19) M.H. Diep, Study of some plants that have a potential of the accumulation Pb and Cd from polluted soils in Vietnam. *Biotechnology Review* 3 (2005) 503-508.
- (20) E. Blanchard, P. Lavelle, E. braudeau, Y. Le Bissonais, C. Valentin, regulation of soil structure by geophagous earthworm activities in humid savannas of Cote d’Ivoire. *Soil Soil. Biochem.* 29 (1997) 431-439.
- (21) B. Pashanasi, P. Lavelle, J. Alegre, F. Charpentier, Effect of the endogeic earthworm *Pontoscolex corethrurus* on soil chemical characteristics and plant growth in a low-input tropical agroecosystem. *Soil Biol. Biochem.* 28 (1996) 801-810.
- (22) E. Barros, A. Neves, E. Blanchart, E.C.M. Fernandes, E. Wandelli, P. Lavelle, Soil macrofauna community of Amazonian agroforestry systems. *Pedobiologia* 47 (2003) 267-274.
- (23) E. Velasquez, C. Pelosi, D. Brunet, M. Grimaldi, M. Martins, A.C. Rendeiro, E. Barrios, P. Lavelle, This ped is my ped: Visual separation and near infrared spectra allow determination of the origins of soil macroaggregates. *Pedobiologia* 51 (2007) 75-87.
- (24) L. Epelde, J.M. Becerril, J. Hernandez-Allica, O. Barrutia, C. Garbisu, Functional diversity as indicator of the recovery of soil health derived from *Thlaspi caerulescens* growth and metal phytoextraction. *Applied Soil Ecology* 39 (2008) 299-310.
- (25) S.P. McGrath, F.J. Zhao, Phytoextraction of metals and metalloid from contaminated soils. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14 (2003) 277-282.

- (26) Z.G. Shen, F.J. Zhao, S.P. McGrath, Uptake and transport of zinc in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and the non-hyperaccumulator *Thlaspi ochroleucum*. *Plant, Cell and Environment* 20 (1997) 898-906.
- (27) P. Lavelle, Les vers de terre de la savane de Lamto (Côte d'Ivoire): peuplements, populations et fonctions dans l'écosystème. Thèse d'état, Laboratoire de zoologie de l'ENS, Paris 6, Paris, 1978.
- (28) M. Blouin, S. Barot, P. Lavelle, Earthworms (*Millsonia anomala*, Megascolecidae) do not increase rice growth through enhanced nitrogen mineralization. *Soil Biol. Biochem.* 38 (2006) 2063–2068.
- (29) X. Yu, J. Cheng, M.H. Wong, Earthworm-mycorrhiza interaction on Cd uptake and growth of ryegrass. *Soil Biol. Biochem.* 37 (2005) 195-201.
- (30) E. Orłowska, Sz. Zubek, A. Jurkiewicz, G. Szarek-Łukaszewska, K. Turnau, Influence of restoration on arbuscular mycorrhiza of *Biscutella laevigata* L. (Brassicaceae) and *Plantago lanceolata* L. (Plantaginaceae) from calamine spoil mounds. *Mycorrhiza* 12 (2002) 153-160.
- (31) J.M. Chen, M.H. Wong, Effects of earthworms on Zn fractionation in soils. *Biol. Fertil. Soils* 36 (2002) 72-78.
- (32) D. E. Salt, R.D. Smith, I. Raskin, Phytoremediation. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49 (1998) 643–68.
- (33) A.G. Khan, C. Kuek, T.M. Chaudhry, C.S. Khoo, W.J. Hayes, Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 41 (2000) 197–207.

Table 1: Leaves, stems, shoot and root biomass at the end of the phytoextraction experiment (g DW/plant/pot) of *Lantana camara* in control non-polluted and metal polluted.

	Leaves (g DW/plant/pot)	Stems (g DW/plant/pot)	Shoot (g DW/plant/pot)	Root (g DW/plant/pot)
Non-Pb, plant	8,00 ± 0,41 (b)	12,94 ± 1,98 (c)	21.61 ± 1.6 (c)	12.13 ± 0.3 (c)
Non-Pb, plant and earthworm	7,89 ± 0,35 (bc)	13,98 ± 1,39 (c)	21.88 ± 2.5 (bc)	13.11 ± 0.2 (c)
Low Pb, plant	7,51 ± 0,72 (c)	19,46 ± 0,61 (ab)	24.64 ± 2.7 (b)	17.21 ± 2.1 (b)
Low Pb, plant and earthworm	8,34 ± 0,63 (ab)	23,99 ± 1,71 (a)	28.33 ± 2.3 (a)	23.11 ± 3.5 (a)
High Pb, plant	7,81 ± 0,34 (bc)	17,71 ± 2,42 (b)	24.55 ± 2.4 (b)	19.11 ± 0.2 (b)
High Pb, plant and earthworm	9,89 ± 1,45 (a)	22,21 ± 2,28 (a)	27.77 ± 1.74 (a)	24.21 ± 2.6 (a)

For each biomass value, numbers followed with the different letters are significantly different ($P < 0.05$) according to Tukey's HSP-test. Mean values ($n = 3$) ± standard error

Table 2: Metal concentration (mg kg^{-1} DW) in the shoot and root of *Lantana camara* in control non-polluted and metal polluted.

	Pb (mg kg^{-1}) in shoot	Pb (mg kg^{-1}) in root
Non-Pb, plant	6.72 ± 1.6 (e)	7.86 ± 6.9 (a)
Non-Pb, plant and earthworm	1.87 ± 0.1 (e)	2.57 ± 1.3 (a)
Low Pb, plant	52.59 ± 10.6 (d)	946.83 ± 375.1 (b)
Low Pb, plant and earthworm	144.89 ± 23.5 (c)	2816.60 ± 1955.1 (c)
High Pb, plant	225.97 ± 74.9 (b)	1645.90 ± 590.9 (a)
High Pb, plant and earthworm	522.77 ± 135.1 (a)	3284.08 ± 328.1 (e)

For each metal concentration value, numbers followed with the different letters are significantly different ($P < 0.05$) according to Tukey's HSP-test. Mean values ($n = 3$) ± standard deviation

DISCUSSION

Le fort taux de survie observé, après un mois, pour les plantes poussant dans un sol contaminé par du plomb, l'absence de dommages visibles sur les feuilles et l'augmentation significative de la croissance confirme la tolérance au plomb de *Lantana camara* (Verbenaceae). Dans un sol contaminé par du plomb, *Lantana camara* atteint une biomasse plus élevée que les témoins. Ces résultats peuvent être comparés à ceux d'Epelde *et al.* (2008) pour la plante hyperaccumulatrice *Thlaspi caerulescens* qui, lorsqu'elle est exposée à des pollutions au Cd et au Zn montre une biomasse et des valeurs de ses pigments photosynthétiques supérieures à celles observées chez les témoins.

Tout d'abord, *Lantana camara* accumule le plomb dans ses racines puis celui-ci est transféré vers les parties aériennes où il est également accumulé en grande quantité. Pour les deux concentrations de plomb, le rapport shoot-to-root de la concentration en plomb est inférieur à 1. C'est une valeur plus faible que prévue pour une plante hyperaccumulatrice ; celles-ci ont généralement un rapport de shoot-to-root supérieur à 1 (McGrath et Zhao, 2003). Toutefois, le potentiel de *Lantana camara* (Verbenaceae) en tant que plante phytoextractrice de plomb a été découvert très récemment par Diep (2005) et il y a encore peu d'études sur sa tolérance aux métaux et sur son potentiel de phytoextraction. D'autres études sur la physiologie de *L. camara*, actuellement en cours, pourraient expliquer cette faible valeur de transfert du métal des racines vers les parties aériennes.

Cette étude montre que l'efficacité de *L. camara* en phytoextraction dépend de la concentration de plomb dans le sol. De même, l'absorption du Zn par *T. caerulescens* augmente linéairement en fonction de la concentration en zinc entre 1 à 1000 mmol m⁻³, mais des concentrations supérieures à 1000 mmol m⁻³ entraînent une certaine toxicité et subséquemment une diminution de l'absorption de Zn (Shen *et al.*, 1997). Dans cette étude, les valeurs de plomb total (les tiges et les racines) et le rapport shoot-to-root sont plus élevées à 1000 mg Pb kg⁻¹ que ceux à 500 mg Pb kg⁻¹. Ce résultat suggère que, même à cette concentration élevée, le plomb est favorable à la croissance de *L. camara*.

Bien que l'abondance des vers de terre dans les microcosmes ait été plus élevée que l'abondance moyenne de 20 g.m⁻² observée sur le terrain (Lavelle, 1978) et un peu moindre que les 127 g.m⁻² utilisé pour *Millsonia anomala* par Blouin *et al.* (2006), après un mois, la

plupart des vers de terre étaient encore en vie (environ 90%) et les sols avaient été totalement manipulés par les vers de terre. Cela indique que *P. corethrurus* a une grande tolérance au plomb dans ces conditions expérimentales. Cette tolérance peut être due, comme suggéré par Morgan et Morgan (1999), à la capacité des vers de terre à accumuler des métaux dans leurs tissus et à décontaminer les sols grâce à des mécanismes tels que la liaison et le stockage du plomb dans les métallothionéines.

Dans les sols non contaminés, l'effet des vers de terre sur la croissance de la plante n'a pas été significatif. Pourtant, plusieurs mécanismes par lesquels les vers de terre modifient la croissance des plantes, directement et indirectement, ont été mis en évidence. Blouin *et al.* (2006) proposent cinq raisons qui pourraient être invoqués pour expliquer les effets positifs des vers de terre : (i) une augmentation de la minéralisation de la matière organique dans le sol, en augmentant la disponibilité des nutriments (par exemple la disponibilité du phosphore), (ii) une modification de la structure du sol entraînant une modification de la disponibilité de l'eau et de l'oxygène pour les plantes, (iii) la production de microorganismes pouvant stimuler la croissance des végétaux, (iv) la dispersion de microorganismes pathogènes pour les racines et (v) la stimulation de symbiotes. L'absence d'effet de la présence de *P. corethrurus* sur la croissance de *L. camara* pourrait s'expliquer par l'absence de pathogènes dans cette expérience, le métabolisme particulier de cette plante phytoremédiatrice et les pots de faible volume qui pourraient limiter l'effet bénéfique des vers de terre sur la structure du sol.

Dans les microcosmes contaminés au plomb, la présence de *P. corethrurus* conduit à un accroissement de la biomasse des racines et des parties aériennes ainsi qu'à une augmentation de l'absorption de plomb. Ces résultats sont en accord avec ceux de Wang et Li (2006) qui signalent une augmentation de la phytoextraction du Zn par le ray-grass et la moutarde indienne lorsque le sol est inoculé avec le ver de terre *Pheretima* sp. D'autres études ont montré que les vers de terre peuvent influencer la disponibilité des métaux dans le sol en mélangeant dans leur tube digestif des sols profonds, de l'humus et du matériel biologique (Xu *et al.*, 2005). Il a également été montré que le plomb a une faible mobilité dans le sol (moins mobile que le Cd ou le Zn) et une capacité à former des complexes organiques qui le rendent indisponible pour les plantes (Orlowska *et al.*, 2002). Ma *et al.* (2002) indiquent que la concentration en plomb biodisponible peut être augmentée de 48,2 % en présence de vers

de terre et Chen et Wong (2002) suggèrent que les activités souterraines des vers de terre augmente la biodisponibilité des métaux.

En conclusion, *Lantana camara* a prouvé sa capacité à se développer dans des sols contaminés avec une forte concentration de plomb. Pour une phytoextraction efficace, il faut des plantes hyper-extractrices pour éliminer les métaux lourds de sols pollués, mais aussi un haut rapport de transfert des racines vers les parties aériennes afin d'accumuler un maximum de métal dans les parties exploitables (Salt *et al.*, 1998). L'efficacité de la dépollution dépend aussi de la quantité de biomasse aérienne et de la biodisponibilité des métaux (Khan *et al.*, 2000). Cette étude montre que le ver de terre *P. corethrurus* a parfaitement survécu dans des sols pollués au plomb et que son activité biologique a amélioré la croissance des plantes et la phytoextraction du plomb. Ils ont également eu un effet positif sur la biomasse des racines. Ces résultats démontrent clairement que l'association *P. corethrurus* et *L. camara* a un potentiel considérable pour la décontamination de sols pollués au plomb.

La suite de notre étude vise à acquérir une meilleure compréhension des relations entre la plante et le ver de terre afin d'améliorer leur efficacité de dépollution.

Chapitre C-II : Caractérisation physico-chimique et activités biologiques des agrégats racinaires

Dans le chapitre précédent, nous avons mis en évidence l'influence bénéfique de l'activité des vers de terre sur la croissance et les capacités de phytoextraction du *Lantana camara*. Dans ce deuxième chapitre, nous avons souhaité nous intéresser aux mécanismes par lesquels les vers de terre peuvent agir sur la plante. C'est pourquoi nous avons focalisé notre étude sur la comparaison entre les agrégats racinaires, formés par la plante en présence ou non de vers, dont la composition physico-chimique ainsi que l'activité biologique peuvent directement influencer sur la physiologie de la plante.

A/ Comparaison des propriétés physico-chimiques des agrégats racinaires obtenus dans les différents types d'expérimentation

Les échantillons sélectionnés pour cette étude sont les agrégats racinaires associés à *Lantana camara*. La comparaison des agrégats a porté sur les 9 propriétés suivantes : pH, capacité d'échange cationique (CEC), matière organique (MO), l'azote, le phosphore et le potassium (N-P-K) total, et N-P-K disponibles (Tableau 9) d'échantillons de sol prélevés en dehors de la rhizosphère ou de la drilosphère (sol, S), d'échantillons de sol remanié par les vers, « les turricules » (agrégats des vers, AgV) et d'autre part de sol sous l'influence de la racine de la plante, « la rhizosphère » (agrégats racinaires des plantes, AgP).

Echantillon	pH	CEC (cmol/kg)	M.O (g/kg)	Ntotal (g/kg)	Protal (g/kg)	Ktotal (g/kg)	N dis(mg/100g)	Pdis (mg/100g)	Kdis (mg/100g)
S/T/SP	4,98 ± 0,12	5,23 ± 0,00	2,31 ± 0,20	4,04 ± 0,04	0,84 ± 0,04	0,10 ± 0,02	235,76 ± 8,7	52,17 ± 6,72	7,88 ± 0,58
S/T/SV	4,92 ± 0,01	6,03 ± 0,04	3,84 ± 0,04	4,90 ± 0,04	1,10 ± 0,09	0,17 ± 0,01	477,89 ± 0,19	91,89 ± 2,13	23,74 ± 0,98
S/T/SPV	4,99 ± 0,07	5,26 ± 0,04	2,09 ± 0,23	4,35 ± 0,07	0,76 ± 0,08	0,09 ± 0,01	153,29 ± 4,85	59,10 ± 3,73	8,36 ± 0,81
S/Pb+/SP	5,56 ± 0,07	4,63 ± 0,19	1,41 ± 0,34	3,88 ± 0,04	2,25 ± 0,45	0,06 ± 0,00	267,66 ± 29,91	219,05 ± 25,20	11,32 ± 0,92
S/Pb+/SV	5,49 ± 0,04	8,82 ± 0,33	4,17 ± 0,40	4,97 ± 0,14	2,74 ± 0,13	0,77 ± 0,07	285,60 ± 34,04	382,62 ± 20,37	18,95 ± 0,38
S/Pb+/SPV	5,58 ± 0,13	4,71 ± 0,41	2,44 ± 0,52	4,03 ± 0,04	2,91 ± 0,68	1,14 ± 0,14	230,36 ± 21,53	150,61 ± 33,50	17,21 ± 0,57
S/Pb++/SP	5,49 ± 0,12	4,65 ± 0,21	1,59 ± 0,34	4,08 ± 0,00	1,70 ± 0,60	0,98 ± 0,13	244,72 ± 22,01	138,05 ± 50,70	10,27 ± 0,20
S/Pb++/SV	5,54 ± 0,01	8,98 ± 0,29	6,91 ± 0,27	4,99 ± 0,17	2,84 ± 0,26	1,22 ± 0,07	301,64 ± 5,5	331,74 ± 10,85	17,68 ± 0,20
S/Pb++/SPV	5,61 ± 0,16	4,87 ± 0,35	1,44 ± 0,34	3,12 ± 0,14	1,30 ± 0,14	0,36 ± 0,27	249,58 ± 30,58	150,61 ± 33,50	10,99 ± 0,99
AgV/T/SV	4,92 ± 0,03	6,03 ± 0,09	3,84 ± 0,13	4,90 ± 0,12	1,10 ± 0,23	0,17 ± 0,01	477,89 ± 18,00	91,89 ± 3,03	23,74 ± 1,81
AgV/T/SPV	4,99 ± 0,06	5,93 ± 0,07	2,79 ± 0,40	4,90 ± 0,10	0,92 ± 0,04	0,20 ± 0,00	532,79 ± 41,34	86,80 ± 5,31	19,80 ± 0,36
AgV/Pb+/SV	5,49 ± 0,07	8,82 ± 0,42	4,17 ± 0,44	4,97 ± 0,30	2,74 ± 0,15	0,77 ± 0,05	285,60 ± 54,68	382,62 ± 4,13	18,95 ± 0,73
AgV/Pb+/SPV	5,65 ± 0,12	9,23 ± 0,05	12,83 ± 1,66	6,94 ± 0,74	3,80 ± 0,18	1,69 ± 0,10	310,06 ± 33,55	298,63 ± 18,86	29,37 ± 3,29
AgV/Pb++/SV	5,54 ± 0,01	8,98 ± 0,67	6,91 ± 0,88	4,99 ± 0,13	2,84 ± 0,03	1,22 ± 0,10	301,64 ± 15,30	331,74 ± 12,45	17,68 ± 0,57
AgV/Pb++/SPV	5,61 ± 0,10	9,61 ± 0,31	10,88 ± 0,17	5,09 ± 0,56	3,84 ± 0,02	1,44 ± 0,29	337,55 ± 89,93	298,63 ± 18,86	21,01 ± 4,71
AgP/T/SP	5,01 ± 0,04	5,62 ± 0,03	3,21 ± 0,03	4,55 ± 0,01	0,92 ± 0,07	0,12 ± 0,01	297,90 ± 20,46	80,65 ± 7,49	12,17 ± 1,00
AgP/T/SPV	5,04 ± 0,02	5,67 ± 0,03	3,27 ± 0,06	4,99 ± 0,23	1,03 ± 0,14	0,16 ± 0,01	221,73 ± 16,02	72,63 ± 0,85	14,30 ± 1,54
AgP/Pb+/SP	5,77 ± 0,06	6,52 ± 0,43	6,74 ± 0,54	4,67 ± 0,05	3,79 ± 0,10	0,79 ± 0,07	323,36 ± 29,90	395,20 ± 62,19	18,22 ± 1,63
AgP/Pb+/SPV	5,52 ± 0,04	7,67 ± 0,17	11,34 ± 0,93	5,86 ± 0,66	3,51 ± 0,01	1,47 ± 0,04	267,82 ± 0,84	329,60 ± 31,20	21,11 ± 1,62
AgP/Pb++/SP	5,66 ± 0,04	6,53 ± 0,26	9,38 ± 0,41	5,54 ± 0,37	3,99 ± 0,16	1,07 ± 0,21	308,07 ± 25,38	420,47 ± 55,83	14,68 ± 0,60
AgP/Pb++/SPV	5,48 ± 0,02	7,66 ± 0,04	12,42 ± 1,19	7,22 ± 0,82	3,54 ± 0,21	1,45 ± 0,19	242,15 ± 26,18	329,60 ± 31,20	18,81 ± 1,08

Tableau 9 : Les paramètres chimiques des sols (S), agrégats des vers (AgV), agrégats racinaires (AgP) des différents traitements au plomb (T, Pb+, Pb++) des différents traitements : Sol + Plante (SP) ; Sol + Ver (SV) ; Sol + Plante + Ver (SPV)

A.1 Comparaison entre les échantillons du sol et les agrégats (racinaire, AgP et drilosphère, AgV)

L'analyse en composante principale (ACP) à partir des 9 variables (Tableau 9) a donné un cercle de corrélation dont les deux axes expliquent 76,90% de l'inertie totale (58,90% pour l'axe 1 et 18% pour l'axe 2) (Figure 30A). Sur l'ACP, l'axe 1 sépare les échantillons en fonction de leur teneur en éléments chimiques, et l'axe 2 sépare les échantillons riches en MO, N et CEC de ceux qui contiennent du K et du P.

La projection des objets montre une différenciation significative ($p < 0,001$) entre les agrégats et le sol, les deux types d'agrégats (AgV et AgP) étant plus riches en éléments chimiques. Les agrégats racinaires et les turricules sont également significativement séparés par l'axe 2, les turricules étant plus riches en N et K disponible et en MO (Figure 30B).

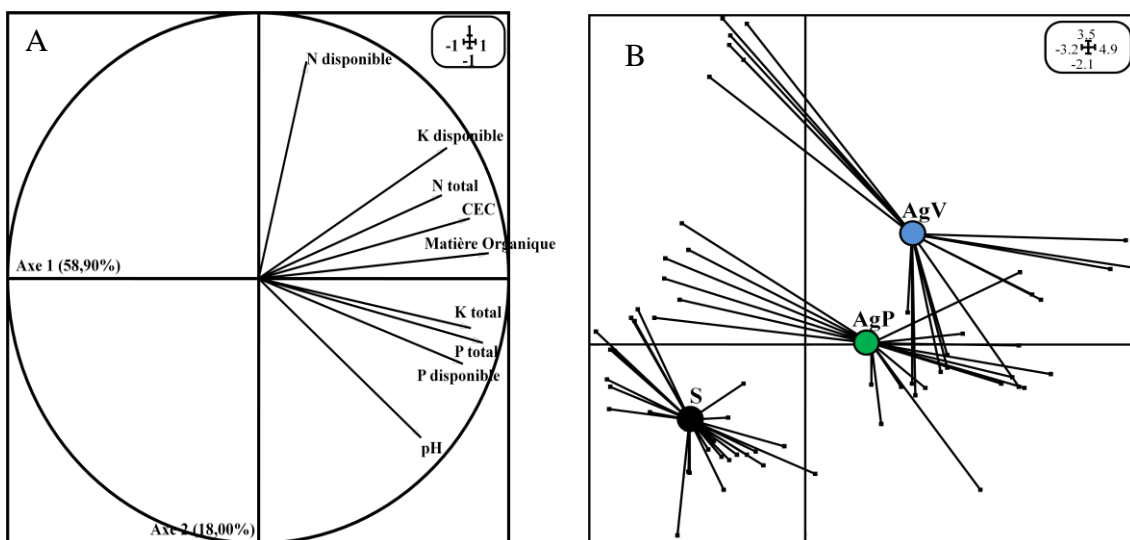


Figure 30 : (A) Cercle de corrélation des caractéristiques chimiques (ACP)
(B) Comparaison entre les échantillons du sol et des agrégats

A.2. Comparaison entre les différents types d'agrégats racinaires

Compte tenu des observations précédentes, les agrégats racinaires ont fait l'objet d'une étude particulière qui a conduit à la rédaction d'un article soumis à **Pedobiologia**.

A.2.1 pH

Après 1 mois d'expérimentation, le pH des agrégats racinaires est plus acide dans les sols non pollués. Dans les sols pollués, la valeur de pH des agrégats racinaires obtenus dans le système sans vers de terre est également significativement plus acide que lorsqu'il y a des vers de terre (Figure 31).

A.2.2 Cations échangeables (CEC) et matière organique (MO)

Les (CEC) et la MO ont des valeurs significativement plus élevées dans les traitements avec Pb que sans. Par ailleurs, dans le sol pollué, les agrégats racinaires des traitements avec vers de terre ont aussi, pour ces deux paramètres, des valeurs significativement plus élevées qu'en l'absence de vers de terre (Figure 31).

A.2.3 N, P, K total

A la fin de l'expérimentation, la teneur en azote total des agrégats racinaires avec 1000 mg.kg⁻¹ Pb est légèrement plus élevée que dans le témoin, qu'il y ait ou non présence de vers ; alors que le P et le K sont beaucoup plus abondants d'une part en présence de Pb et d'autre part en présence de vers (Figure 31).

A.2.4 N, P, K disponibles

Il est intéressant de noter qu'en ce qui concerne l'N et le P disponibles, l'effet P est moins marqué, les différences entre agrégats pollués et non pollués n'étant sensibles qu'en présence de vers. Par ailleurs, indépendamment de la teneur en Pb, N et P disponibles sont toujours plus faibles en présence de vers.

Le K disponible ne présente pas la même distribution. En présence de Pb, les échantillons obtenus soumis à l'activité de vers ont une valeur de K supérieure à celles des échantillons sans vers (Figure 31).

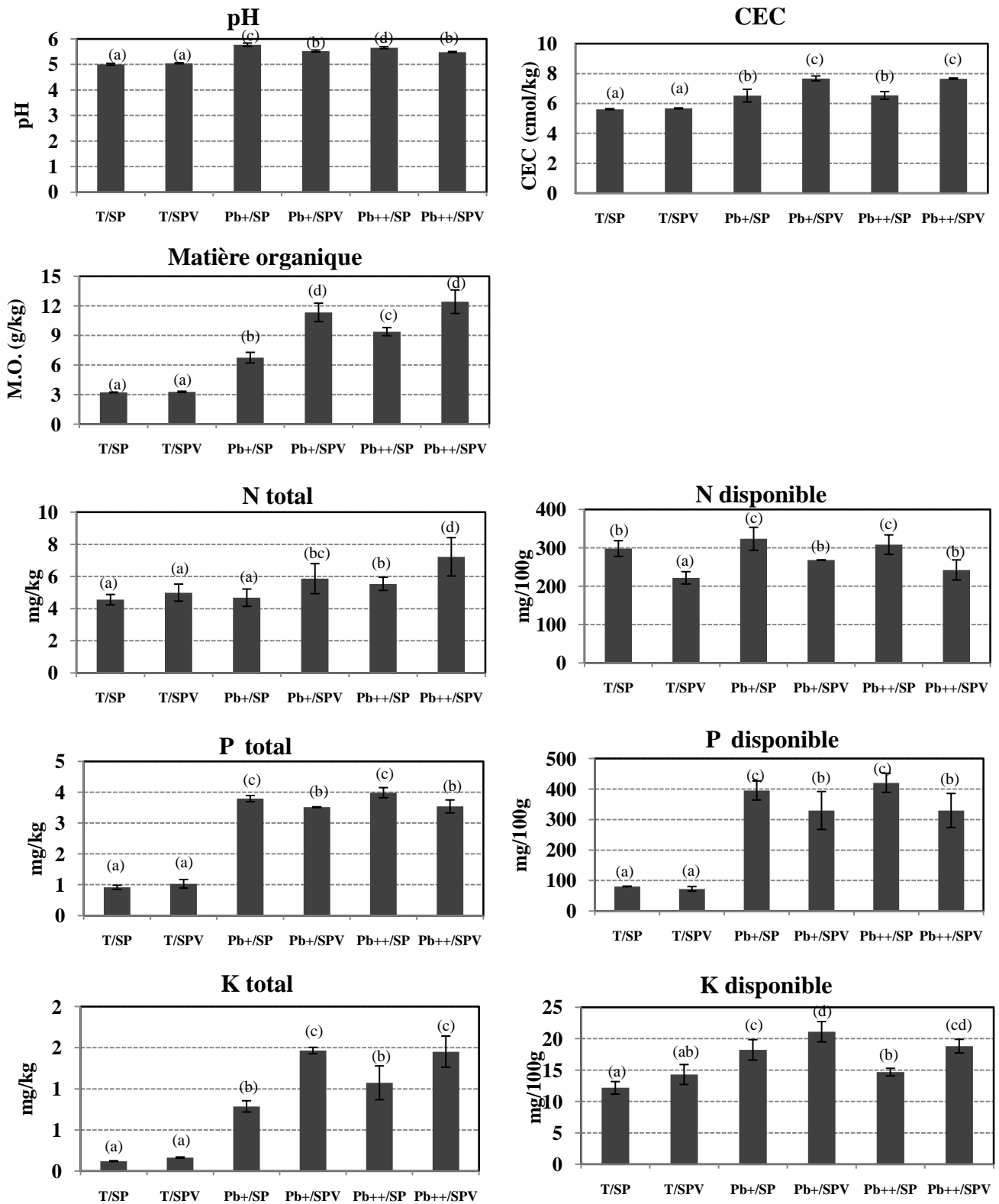


Figure 31 : Les compositions chimiques des agrégats racinaires des différents traitements avec ou sans plomb/ avec ou sans vers

A.2.5 Comparaison entre les agrégats racinaires obtenus en présence ou non de *Pontoscolex corethrus*

L'ACP réalisée à partir des données du tableau 9 (page 72) montre des oppositions entre les différents échantillons. Les 2 premiers axes du cercle de corrélation (Figure 32A) expliquent 88,89% de l'inertie totale (67,93% pour l'axe 1 et 20,96% pour l'axe 2). L'analyse discriminante réalisée sur 1000 permutations montre que l'analyse est significative ($p < 0,001$).

La place des échantillons sur les axes (Figure 32B) montre que les agrégats issus des sols pollués au Pb sont clairement séparés des échantillons non pollués par des valeurs plus élevées de l'ensemble des paramètres testés. Les agrégats racinaires obtenus en présence de vers sont aussi séparés indépendamment de ceux obtenus dans les expérimentations sans vers. Ils sont caractérisés par de plus fortes valeurs de K, CEC, MO et N total, les agrégats racinaires obtenus en absence de vers étant plus riches en P et N disponible.

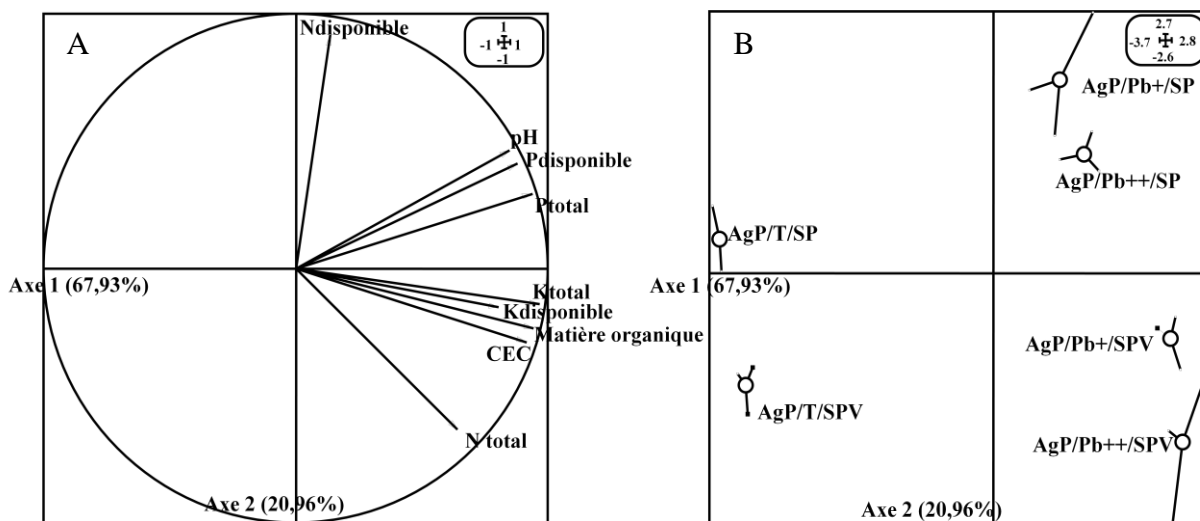


Figure 32 : Analyse en Composante Principale des paramètres chimiques des agrégats racinaires des différents traitements (A) Cercle des corrélations, (B) Plan factoriel.

A.3 Discussion

Des recherches antérieures ont montré que la présence de vers de terre peut augmenter considérablement la croissance des plantes, mais le rôle de la faune du sol dans la modification de la biodisponibilité des métaux dans le sol par rapport à la croissance des plantes est mal compris (Haimi et Enbork, 1991).

Le processus de phytoextraction des métaux dépend de la biodisponibilité du métal dans le sol (Brown *et al.*, 1995a) or cette biodisponibilité peut être influencée par de multiples facteurs (abiotiques et biotiques) dans l'environnement contaminé. Par ailleurs, il est bien connu que les vers de terre influencent fortement les propriétés physiques et chimiques du sol, leur rôle est donc à prendre en considération dans la biodisponibilité des métaux.

Dans les sols pollués au plomb, *Lantana camara* se développe bien et la phytoextraction du plomb induit un pH nettement plus élevé que ceux trouvés dans les sols non-pollués. Ces résultats peuvent être comparés à ceux d'Epelde *et al.* (2008) pour la plante hyperaccumulatrice *Thlaspi caerulescens* qui, lorsqu'elle croît en présence de Cd ou de Zn, augmente significativement le pH du sol. Le pH du sol est, en effet, l'un des facteurs clés qui influent sur la mobilité des métaux lourds dans le sol. L'équilibre entre les phases solides et en solution du métal dans le sol est maintenu par le pH du sol selon des voies différentes :

- (1) une augmentation du pH du sol peut conduire à la précipitation des métaux sous forme d'hydroxydes métalliques (Paulose *et al.*, 2006) ;
- (2) entraîner une augmentation de l'adsorption de cations ce qui augmente la charge négative ;
- (3) conduire à la formation de formes hydroxy des cations métalliques qui ont une plus grande affinité pour les sites d'absorption que les cations métalliques (Naidu *et al.*, 1994). Dans nos expériences, l'augmentation du pH du sol serait liée à la diminution de la toxicité et donc à la concurrence entre les formes Pb et PbOH⁺.

Par ailleurs, nous avons pu montrer qu'au contraire, la présence de *P. corethrurus* dans les sols diminuait de façon significative le pH. Une observation similaire a été effectuée par d'autres auteurs (Cheng et Wong, 2002 ; Yu et Cheng, 2003), qui signalent que dans un sol contaminé au Zn, l'activité des vers de terre entraîne une diminution du pH du sol (0,2 - 0,5 unités). En théorie, la diminution de pH d'un sol riche en métaux devrait augmenter leur biodisponibilité. Effectivement, Sanders *et al.* (1986) ont montré que si le pH du sol diminue d'une unité, la concentration de métal libre augmente d'un facteur 2, et par conséquent améliore le processus de phytoextraction (Sanders *et al.*, 1986). Toutefois, la baisse de pH du sol pourrait affecter négativement la fonction biologique des sols des écosystèmes et à terme la santé de la plante.

L'activité de *P. corethrurus* dans les sols a amélioré de façon significative la capacité d'échange cationique (CEC) ainsi que la quantité de matière organique (MO) dans les sols pollués au plomb alors que cette augmentation n'a pas été significative dans les sols non pollués. Ces résultats sont à mettre en relation avec l'augmentation, observée en présence de vers (cf chapitre C-I), de la biomasse de la plante dans le sol pollué et non dans le non pollué. Ainsi, Dandan *et al.* (2007) signalent que le corps des vers de terre ainsi que leurs constructions, galeries ou turricules, sont enrichis en acides aminés et protéines ce qui peut expliquer l'augmentation de la MO dans nos expérimentations avec vers.

En ce qui concerne la disponibilité des éléments nutritifs comme l'N et le P, nous avons constaté qu'il diminuait significativement en présence des vers de terre. Ceci peut s'expliquer de deux manières :

(1) Les activités des vers de terre augmentent, dans un premier temps, les nutriments disponibles, tels que N et P, la croissance des plantes est améliorée grâce à cette disponibilité accrue d'éléments minéraux puis, dans un deuxième temps, le prélèvement par les plantes devient trop important et le taux de nutriments disponibles se raréfie.

(2) Les activités des vers de terre améliorent la croissance des plantes et l'absorption des métaux par des mécanismes différents c'est à dire sans passer par une augmentation de la disponibilité des éléments nutritifs et l'accélération de

croissance de la plante entraîne, comme dans le premier cas, un prélèvement accru sur les éléments minéraux du sol.

B/ Activités enzymatiques

Au cours de cette étude, neuf enzymes impliquées dans les différents cycles biogéochimiques du carbone, du phosphore et de l'azote ont été examinées. Les activités enzymatiques sont exposées dans le Tableau 10.

Enzymes	Fonctions	Origines	
Dépolymérase	Scission des polymères en unités monomériques ou dimériques		
Enzymes catalysant l'hydrolyse des liaisons glucidiques	Cellulase	Hydrolyse de la cellulose	Bactéries, champignons
	Amylase	Hydrolyse de l'amidon	Bactéries, champignons
	Xylanase	Hydrolyse des xylandes	Microorganismes, plantes, et animaux
	β -glucosidase	Hydrolyse de certaine liaison glucosidique	Bactéries, champignons
	Minéralisation des monomères et oligomères organiques		
Minéralisation des composés phosphorés	Phosphatase acide	Phosphate organique → orthophosphate	Exsudats racinaires
	Phosphatase alcaline		Bactéries, champignons mycorhiziens
Minéralisation des composés azotés	Uréase	Urée → NH_3 et CO_2	Microorganismes, plantes, et animaux
	N-acétyl-glucosaminase	Hydrolyse de N-acétyl- β -glucosamine	
Activité totale	FDA – Diacétate de fluorescéine		

Tableau 10 : Les activités enzymatiques étudiées

B.1 Comparaison entre les échantillons de sol et les agrégats

Comme précédemment, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux agrégats racinaires de *L. camara*. Cependant, la comparaison entre les différents types d'agrégats (racinaires et drilosphères) et les échantillons de sols prélevés hors de la rhizosphère et de la drilosphère a été également réalisée pour les 9 enzymes.

Le cercle de corrélation réalisé à partir de nos données (Tableau 11) présente deux axes qui expliquent 55,58 % de l'inertie totale (38,03 % pour l'axe 1 et 17,55 % pour l'axe 2) (Figure 33A). Sur l'ACP, les axes 1 et 2 séparent d'une part, l'intensité des activités enzymatiques et d'autre part, les activités hétérosidases (β -glucosidase, N-acétyl-glucosaminase) des activités polysaccharidases (amylase, cellulase, xylanase) (Figure 33B).

Sur ces axes, nos échantillons se différencient en deux groupes : les échantillons de sol se distinguent des agrégats par de plus faibles activités enzymatiques, excepté pour l'amylase. Les deux types d'agrégats sont différenciés entre eux principalement là aussi par l'intensité des activités enzymatiques, les agrégats racinaires étant globalement plus actifs que les turricules sauf pour l'amylase.

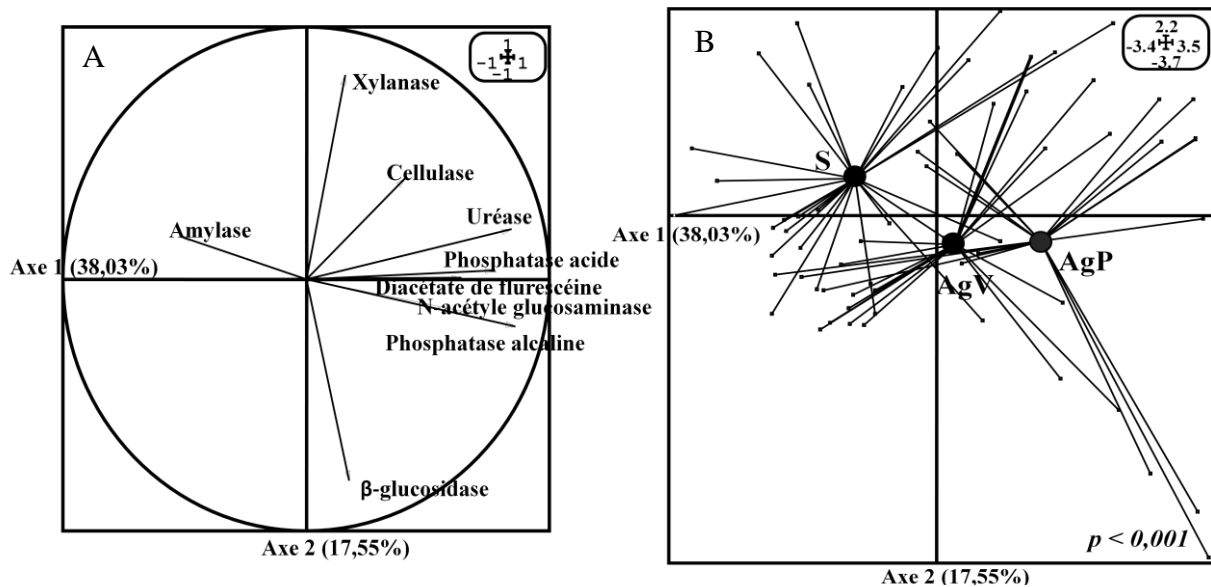


Figure 33 : (A) Cercle de corrélation des activités enzymatiques (ACP)
(B) Comparaison entre les échantillons du sol et des agrégats

Echantillon	ACP	ALP	AMY	NAG	GLU	URE	FDA	XYL	CEL
S/T/SP	7,12 ± 0,77	40,85 ± 4,48	13,77 ± 2,30	4,39 ± 0,29	5,29 ± 1,36	1,98 ± 0,07	0,17 ± 0,05	1,66 ± 0,38	4,09 ± 1,21
S/T/SV	7,72 ± 0,68	40,79 ± 4,99	5,57 ± 1,12	3,56 ± 0,52	3,54 ± 0,48	1,85 ± 0,12	1,32 ± 0,18	3,17 ± 0,02	1,65 ± 0,35
S/T/SPV	14,68 ± 1,94	204,87 ± 35,24	6,65 ± 1,11	5,95 ± 0,52	2,93 ± 0,97	5,54 ± 0,36	1,22 ± 0,26	8,33 ± 1,32	4,67 ± 0,89
S/Pb+/SP	5,70 ± 1,05	59,68 ± 5,42	33,56 ± 2,03	4,01 ± 0,43	4,55 ± 0,92	1,91 ± 0,32	0,37 ± 0,06	3,47 ± 1,50	1,81 ± 0,88
S/Pb+/SV	5,03 ± 0,32	72,96 ± 4,21	13,17 ± 2,81	2,88 ± 0,85	4,51 ± 0,86	1,61 ± 0,17	1,11 ± 0,08	9,08 ± 1,08	3,81 ± 1,02
S/Pb+/SPV	11,69 ± 0,63	55,03 ± 6,11	10,33 ± 0,52	3,46 ± 0,62	2,46 ± 0,17	6,28 ± 0,91	2,51 ± 0,55	6,30 ± 0,38	1,96 ± 0,53
S/Pb++/SP	6,06 ± 2,07	191,38 ± 7,20	4,33 ± 0,14	4,49 ± 0,34	5,69 ± 1,32	2,21 ± 0,13	0,28 ± 0,06	2,92 ± 1,24	2,56 ± 0,64
S/Pb++/SV	2,63 ± 1,63	59,05 ± 4,68	1,74 ± 0,50	4,50 ± 0,24	3,30 ± 0,85	1,96 ± 0,09	1,05 ± 0,41	1,57 ± 0,30	1,11 ± 0,33
S/Pb++/SPV	13,12 ± 3,13	106,77 ± 13,12	3,90 ± 0,33	4,30 ± 0,05	4,75 ± 0,99	5,04 ± 0,88	2,58 ± 0,40	2,43 ± 0,51	1,04 ± 0,22
AgV/T/SV	11,08 ± 1,03	39,52 ± 7,98	5,51 ± 0,16	5,80 ± 0,21	6,66 ± 1,08	1,83 ± 0,10	0,89 ± 0,22	3,33 ± 0,29	2,85 ± 0,69
AgV/T/SPV	16,45 ± 0,63	181,61 ± 11,88	7,36 ± 1,28	8,71 ± 1,03	3,08 ± 0,86	5,60 ± 0,57	1,43 ± 0,11	3,26 ± 0,50	10,13 ± 0,99
AgV/Pb+/SV	8,25 ± 0,26	38,89 ± 7,62	7,70 ± 1,21	6,30 ± 0,39	5,71 ± 0,90	1,94 ± 0,13	1,06 ± 0,28	4,03 ± 0,97	1,45 ± 0,56
AgV/Pb+/SPV	12,59 ± 0,41	236,56 ± 11,24	3,17 ± 0,52	4,90 ± 0,52	1,93 ± 0,51	5,30 ± 0,86	2,95 ± 0,81	6,62 ± 0,40	0,81 ± 0,29
AgV/Pb++/SV	8,41 ± 0,53	39,15 ± 7,08	4,38 ± 0,81	4,78 ± 0,95	5,48 ± 0,37	2,15 ± 0,14	0,99 ± 0,10	1,30 ± 0,44	1,73 ± 0,10
AgV/Pb++/SPV	18,45 ± 0,47	239,16 ± 17,15	4,61 ± 0,78	7,23 ± 0,94	6,49 ± 1,24	5,13 ± 0,49	2,55 ± 0,21	1,18 ± 0,53	2,03 ± 0,20
AgP/T/SP	40,63 ± 2,23	9,13 ± 1,63	9,76 ± 3,61	5,52 ± 0,40	3,59 ± 0,42	1,97 ± 0,16	0,22 ± 0,13	0,33 ± 0,03	2,81 ± 0,60
AgP/T/SPV	232,22 ± 20,56	17,84 ± 1,09	5,07 ± 0,41	7,14 ± 0,28	4,89 ± 0,59	6,03 ± 0,78	1,59 ± 0,14	4,88 ± 0,78	11,03 ± 0,14
AgP/Pb+/SP	89,31 ± 7,92	16,52 ± 1,71	6,66 ± 1,56	6,79 ± 0,13	4,22 ± 0,71	2,34 ± 0,22	0,39 ± 0,08	7,11 ± 0,92	4,13 ± 0,82
AgP/Pb+/SPV	192,33 ± 24,70	32,33 ± 3,36	2,82 ± 0,08	7,06 ± 1,21	4,41 ± 0,73	5,68 ± 0,43	2,57 ± 0,25	5,29 ± 0,58	3,98 ± 0,69
AgP/Pb++/SP	162,68 ± 15,17	18,58 ± 5,54	6,22 ± 1,44	5,30 ± 0,33	5,16 ± 0,68	2,26 ± 0,06	0,42 ± 0,06	3,97 ± 1,09	5,21 ± 0,15
AgP/Pb++/SPV	209,90 ± 12,94	31,40 ± 1,99	4,36 ± 0,28	6,51 ± 0,64	10,97 ± 1,57	5,81 ± 1,17	2,41 ± 0,03	1,34 ± 0,28	1,24 ± 0,25

Tableau 11 : Les activités enzymatiques des sols (S), agrégats de la drilosphère (AgV), agrégats racinaire (AgP) des différents traitements au plomb (T, Pb+, Pb++) dans les différents traitements : Sol + Plante (SP) ; Sol + Ver (SV) ; Sol + Plante + Ver (SPV)

ACP, phosphatase acide ; ALP, phosphatase alcaline ; AMY, amyrase ; NAG, N-acétyle glucosaminase ; GLU, β-glucosidase ; URE, uréase ; FDA, diacétate de fluorescéine ; XYL, xylanase ; CEL, cellulase

B.2 Action des vers et/ou du Pb sur l'activité biologique des agrégats racinaires

B.2.1 Cycle du carbone

Une hétérosidase, la β -glucosidase et 3 polysaccharidases, l'amylase, la cellulase et la xylanase ont été recherchées.

B.2.1.1 β -glucosidase

Les activités β -glucosidase des agrégats racinaires des expérimentations non polluées ou avec 500 mg.kg⁻¹ ne présentent pas de différences significatives que les vers soient présents ou non. Par contre, l'activité β -glucosidase est nettement plus importante en présence de vers lorsque les sols sont pollués à 1000 mg.kg⁻¹ (Figure 34).

B.2.1.2 Amylase

L'activité amylolytique des agrégats racinaires est significativement plus élevée dans les expérimentations témoins et en l'absence de vers. Pour les sols traités à la dose de 500 mg.kg⁻¹, on observe également une baisse d'activité amylase en présence de vers de terre. Cette différence d'activité enzymatique entre présence et absence de vers n'est plus détectable dans les expérimentations polluées à 1000 mg.kg⁻¹ (Figure 34).

B.2.1.3 Cellulase

Au contraire de l'activité amylase, l'activité cellulase des agrégats racinaires de sol non pollué est beaucoup plus forte en présence de vers. Par contre, dans les sols pollués à 1000 mg.kg⁻¹ la présence de vers diminue significativement cette activité (Figure 34).

B.2.1.4 Xylanase

L'activité xylanase évolue de façon irrégulière. Plus élevée en présence de vers dans les témoins, elle devient ensuite significativement plus faible dans les agrégats racinaires des sols les plus pollués (Figure 34).

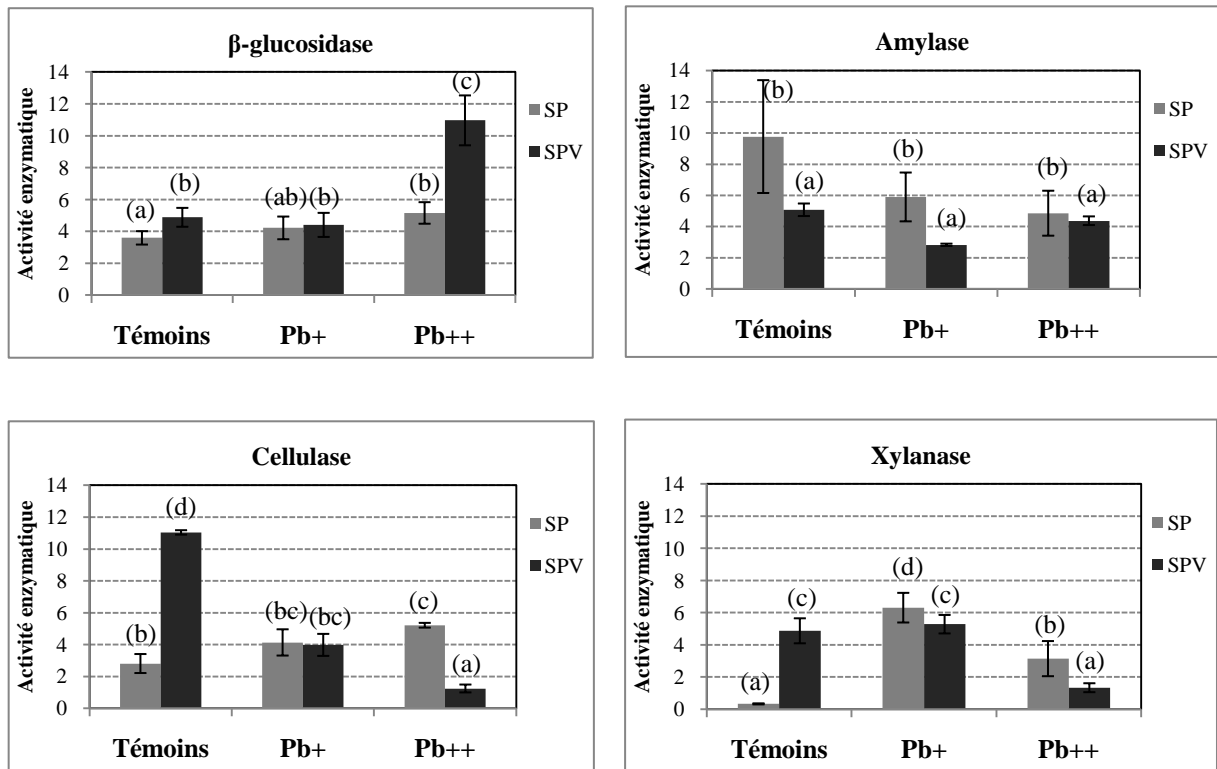


Figure 34 : Activités enzymatique de β-glucosidase, amylase, cellulase et xylanase après un mois d'expérimentation. Pb+ et Pb++ : les traitements soumis à 500 et 1000 mg.kg⁻¹ du Pb
SP : sol + plante ; SPV : sol + plante + ver

B.2.2 Cycle de l'azote

La présence des vers augmente significativement l'activité N-acétyl-glucosaminase des agrégats racinaires mais seulement dans les témoins et les sols pollués à 1000 mg.kg⁻¹. Il n'existe pas de différence significative pour les sols traités à 500 mg.kg⁻¹ (Figure 35).

Quelle que soit la teneur en Pb, l'activité uréase est deux fois plus importante dans les agrégats racinaires en présence de vers (Figure 35).

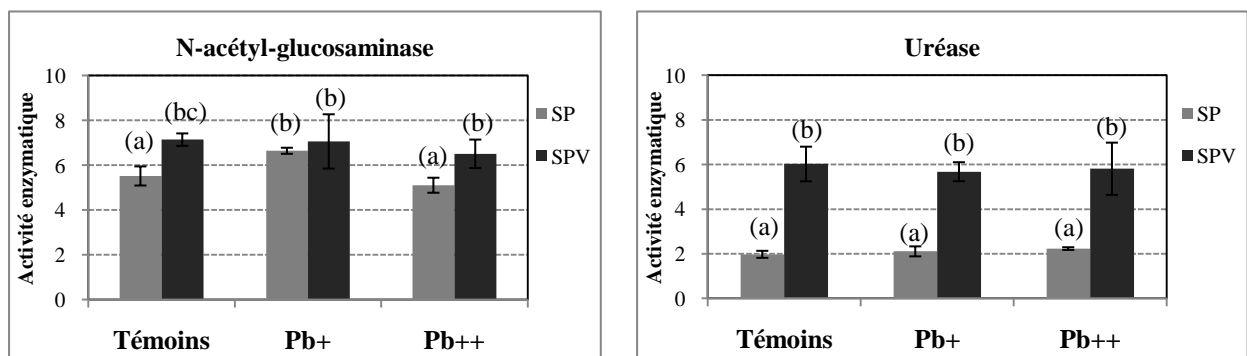


Figure 35: Evolution des N-acétyl-glucosaminase et uréase après un mois d'expérimentation.
Pb+ et Pb++ : les traitements soumis à 500 et 1000 mg.kg⁻¹ du Pb
SP : sol + plante ; SPV : sol + plante + ver

B.2.3 Cycle du phosphore

L'étude des activités phosphatases acides et alcalines (Figure 36) montre qu'elles sont significativement plus élevées en présence de vers que le sol soit pollué au Pb ou non.

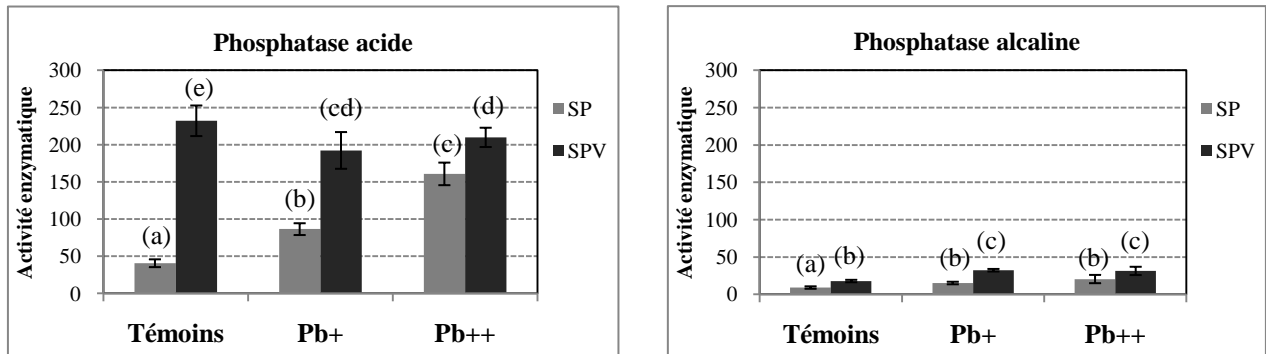


Figure 36 : Evolution des activités phosphatases acides et alcalines après 1 mois d'expérimentation.
Pb+ et Pb++ : les traitements soumis à 500 et 1000 mg.kg⁻¹ du Pb
SP : sol + plante ; SPV : sol + plante + ver

B.2.4 Fluorescéine diacétate hydrolase (FDA)

L'utilisation de la fluorescéine diacétate (3',6'- diacétyl de fluorescéine, FDA) permet d'estimer l'activité enzymatique microbienne globale des sols. Cette enzyme présente, elle aussi, une activité beaucoup plus importante en présence de vers que sans vers et ce indépendamment de la teneur en Pb (Figure 37).

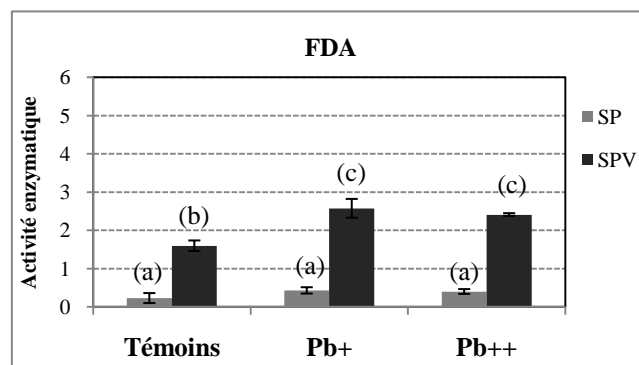


Figure 37 : Evolution des activités FDA après 1 mois d'expérimentation.
Pb+ et Pb++ : les traitements soumis à 500 et 1000 mg.kg⁻¹ du Pb
SP : sol + plante ; SPV : sol + plante + ver

B.2.5 Analyse en composante principale (ACP)

Une analyse en composante principale a été ensuite réalisée avec les différentes activités enzymatiques (variables) des différents échantillons des agrégats racinaires en présence ou absence du ver et/ou du plomb.

Sur l'ACP, les axes 1 et 2 expliquent respectivement 50,24 % et 22,40 % de la variance (Figure 38A). L'axe 1 différencie les échantillons qui ont une forte activité amylase de ceux qui présentent toutes les autres activités. L'axe 2 sépare les échantillons avec une activité élevée pour l'uréase, la phosphatase acide, la cellulase, la xylanase et la N-acétyl-glucosamidase de ceux qui ont des activités FDA, phosphatases alcalines et β -glucosidase.

La représentation des objets montre que les traitements en présence de vers se séparent nettement ($p < 0,00001$) de ceux sans vers de terre par de fortes activités enzymatiques sur l'ensemble des substrats à l'exception de l'amylase (Figure 38B).

La seconde ACP permet de différencier les agrégats racinaires obtenus dans les sols les plus contaminés en présence de vers des deux autres types d'échantillons par des activités moindres sur les polysaccharidases et plus fortes sur le β -glucoside et la phosphatase alcaline (Figure 38C)

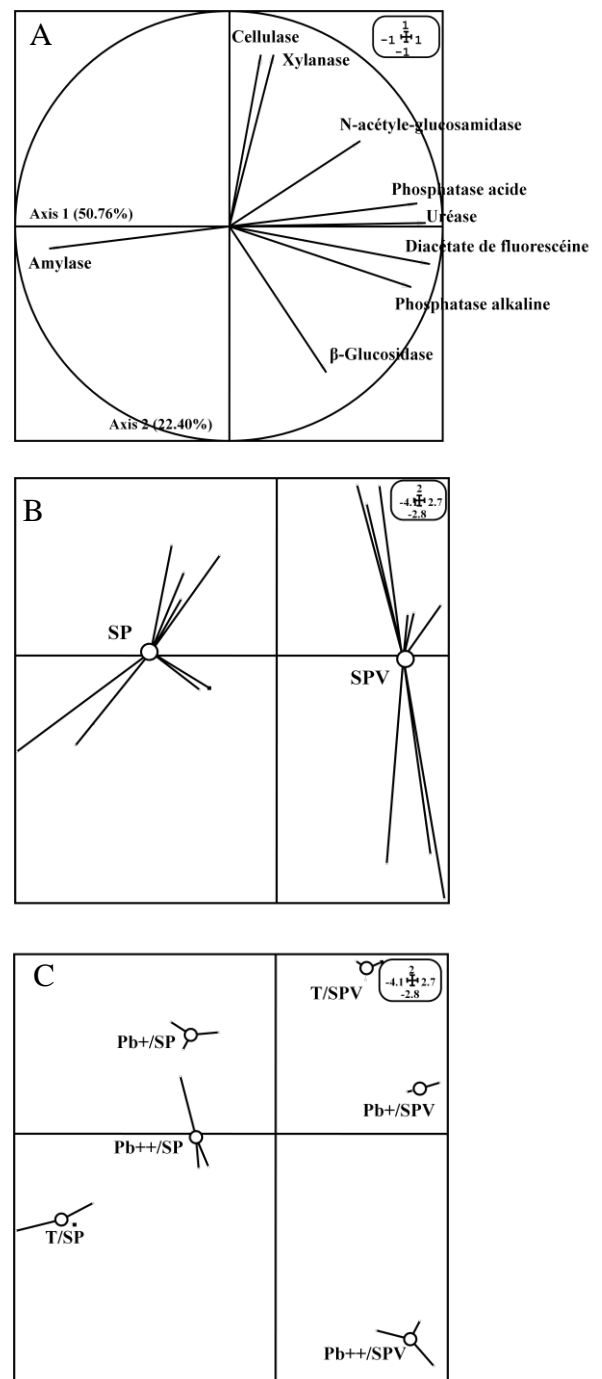


Figure 38 : Résultat de l'analyse ACP.
(A) Cercle de corrélation
(B, C) Comparaison entre les échantillons des agrégats racinaires

B.2.6 Dendrogramme

Le dendrogramme de similarité (Figure 39) permet un classement hiérarchique de nos échantillons. Le profil enzymatique sépare en deux clusters différents les agrégats racinaires des plantes élevées en présence de vers (SPV) de celles dont les pots en étaient dépourvus (SP).

Dans le cluster SPV, les témoins sans plomb forment un groupe séparé des échantillons obtenus en sols pollués. Parmi ceux-ci on peut également différencier les deux taux de pollution 500 mg.kg^{-1} de Pb et 1000 mg.kg^{-1} de Pb.

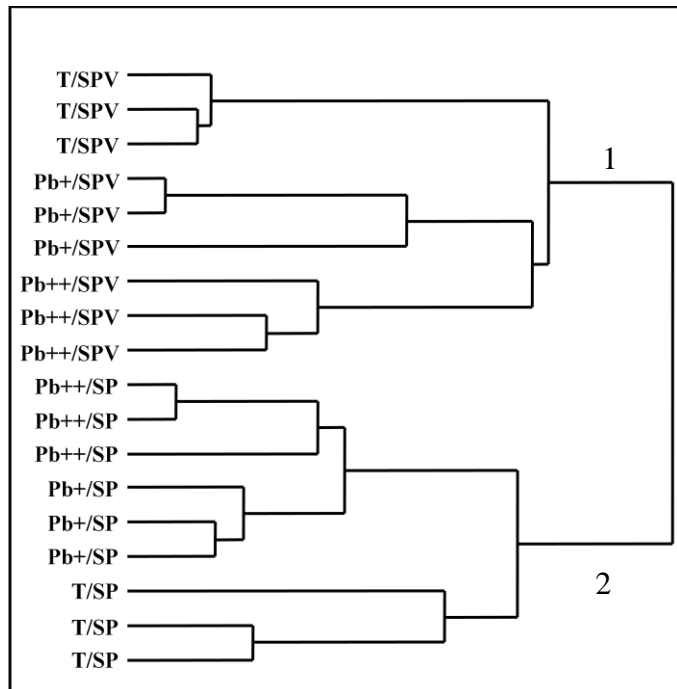


Figure 39 : Dendrogramme de similarité.

Différents traitements: T/SP: sans Pb, plante; T/SPV: sans Pb, plante + ver; Pb+/SP: 500 mg.kg^{-1} Pb, plante; Pb+/SPV: 500 mg.kg^{-1} Pb, plante + ver; Pb++/SP: 1000 mg.kg^{-1} , plante; Pb++/SPV: 1000 mg.kg^{-1} , plante + ver.

Dans le cluster SP, les échantillons se répartissent de façon similaire à ce qui est observé pour SPV avec cependant une séparation plus précoce des échantillons pollués.

B.3 Discussion

L'influence de l'activité biologique des vers de terre sur la croissance d'une plante phytoremédiatrice a été mesurée ici par une approche fonctionnelle : la comparaison des activités enzymatiques des agrégats racinaires en présence ou non de vers de terre. L'activité enzymatique est en effet utilisée comme un indicateur potentiel du fonctionnement biologique des sols et donc de leur qualité (Dick *et al.*, 1996).

Notre étude a porté sur l'activité de neuf enzymes impliquées dans les cycles du C, de l'N et du P. La première observation que nous pouvons faire est que la pollution au plomb n'a pas inhibé les activités enzymatiques du sol contrairement à ce qui a été constaté par d'autres auteurs qui indiquent que les métaux lourds par leur capacité à se lier aux protéines sont des inhibiteurs de la plupart des activités enzymatiques (Dick, 1997).

Quelle que soit la teneur en plomb, les turricules de vers de terre ont des activités enzymatiques plus élevées que le sol témoin. Cette augmentation pourrait être due à une activation de la microflore du sol. Au cours du passage dans les intestins des vers de terre, certains types de microorganismes peuvent augmenter rapidement en densité. Ainsi, Parle (1963) montre que la croissance bactérienne est accrue dans les intestins des vers de terre. Kristufek *et al.* (1992) indiquent également un enrichissement des turricules en hyphes fongiques. De même, Mora *et al.* (2003, 2005) mettent en évidence une augmentation des activités enzymatiques dans les turricules de vers de terre et corrélient ces résultats à une augmentation des biomasses bactériennes et fongiques. Cette observation n'est pas limitée aux turricules ; des activités enzymatiques plus élevées sont également notées dans les parois des galeries (Ponge, 1988).

Dans notre expérimentation, les agrégats racinaires présentent les plus fortes activités enzymatiques, que les plantes se développent sur sols pollués ou non. Ces activités sont cependant modulées par la teneur en Pb du sol comme cela a été noté pour *T. caeruleus* (Epelde *et al.*, 2008) sur certaines enzymes (i.e., β -glucosamidase, l'arylsulfatase, uréase, phosphatase acide et alcaline). Ceci confirme l'importance de la présence de Pb dans la physiologie de la plante.

La comparaison des agrégats racinaires obtenus en présence ou non de vers montrent sans ambiguïté que la présence de vers dans les pots augmente significativement la majeure partie des activités enzymatiques (exception faite de l'amylase) de ces échantillons. C'est la première fois que l'on peut mettre en évidence une augmentation de l'activité enzymatique dans la rhizosphère sous l'influence des vers de terre. Ces résultats peuvent s'expliquer par les interactions plante/microorganismes/vers. Les racines sécrètent dans la rhizosphère une grande variété de composés organiques tels que des acides aminés, des sucres, des composés phénoliques, des polysaccharides et des protéines ; ce sont les exsudats racinaires (Gregory, 2006). Les différences de qualité et de quantité de ces exsudats en changeant les propriétés physico-chimiques du sol peuvent modifier les communautés microbiennes associées aux racines (Flores *et al.*, 1999). Sous l'influence des vers de terre qui sélectionnent les nutriments qu'ils ingèrent et augmentent les flux de nutriments en minéralisant la matière organique, la croissance des plantes peut être améliorée (Butenschoen *et al.*, 2008). C'est ce que nous observons pour *Lantana camara* en présence de *P. corethrurus*. *L. camara* a donc un métabolisme modifié en présence de vers et de plomb, ce qui peut changer la nature de ses exsudats racinaires et donc la structure des communautés microbiennes de la rhizosphère. Ce changement dans la structure et la fonction de la microflore associée aux racines se traduirait par un profil enzymatique modifié. Rappelons que ces profils enzymatiques sont différenciés en fonction de la teneur en plomb de l'échantillon. En effet, on sépare nettement sur l'ACP, les agrégats racinaires obtenus en présence de vers dans les milieux les plus pollués (1000 mg.kg⁻¹ Pb) de ceux récoltés dans les deux autres niveaux de pollution (sans Pb, et 500 mg Pb kg⁻¹), les différences entre les profils enzymatiques étant, dans ce cas, qualitatives et non plus seulement quantitatives.

En conclusion, pour la première fois il est montré que la présence du vers *P. corethrurus* modifie profondément les activités enzymatiques des agrégats racinaires de *Lantana camara* et que ces activités sont de plus modulées par le taux de plomb dans le sol.

Compte tenu de l'importance des communautés microbiennes telluriques dans la constitution de ce profil enzymatique, nous avons entrepris d'en aborder l'étude dans le chapitre suivant.

Chapitre C-III : Etude des communautés microbiennes des agrégats racinaires

Les microorganismes sont les acteurs principaux des grands processus de transformation de la matière et des flux d'énergie dans le sol. L'importance écologique des microorganismes du sol ne se limite pas à leur nombre ou à leur biomasse, même si ces paramètres y contribuent grandement, leur atout principal réside dans leur grande diversité génétique et fonctionnelle. L'écologie microbienne moléculaire a permis ainsi de mettre en évidence une biodiversité remarquable tant procaryotique qu'eucaryotique dans de nombreuses zones du sol telles que la litière, la rhizosphère (sol influencé par les racines) ou la drilosphère (sol influencé par l'activité des vers de terre).

L'action bénéfique de *P. corethrurus* sur la croissance végétale de la plante et sur le processus de phytoextraction du plomb a été clairement démontrée dans la 1ère partie des résultats. Dans le deuxième chapitre, nous avons pu mettre en évidence l'influence de ce ver de terre sur les caractéristiques physico-chimiques du sol ce qui n'est pas sans importance pour la croissance de la plante et ses capacités de phytoextraction du plomb. Enfin, la détermination des activités enzymatiques a également confirmé que la présence de *P. corethrurus* agit sur le fonctionnement biologique du sol agrégé aux racines de *L. camara*. Le fonctionnement biologique du sol étant la résultante des activités des microorganismes telluriques, dans ce dernier chapitre, nous avons cherché à caractériser l'évolution des communautés microbiennes présentes dans les agrégats racinaires sous l'influence des vers de terre.

Les analyses ont donc porté sur les agrégats racinaires, en présence ou non de vers, et à différents niveaux de pollution (T, Pb⁺ et Pb⁺⁺).

A/ Communautés bactériennes

A.1 Densité

La densité des souches bactériennes cultivables (sur milieu NB Agar) (Tableau 12) est significativement plus élevée dans les agrégats racinaires des plantes cultivées avec le ver (7,08 et 7,56 log CFU/g de sol respectivement pour les traitements au plomb à 500 mg.kg⁻¹ et 1000 mg.kg⁻¹) que dans ceux des plantes cultivées sans ver (5,62 log CFU/g du sol). Par

contre, les densités ne sont pas significativement différentes entre les 3 traitements en présence de ver ou entre les 3 traitements sans ver (Figure 40).

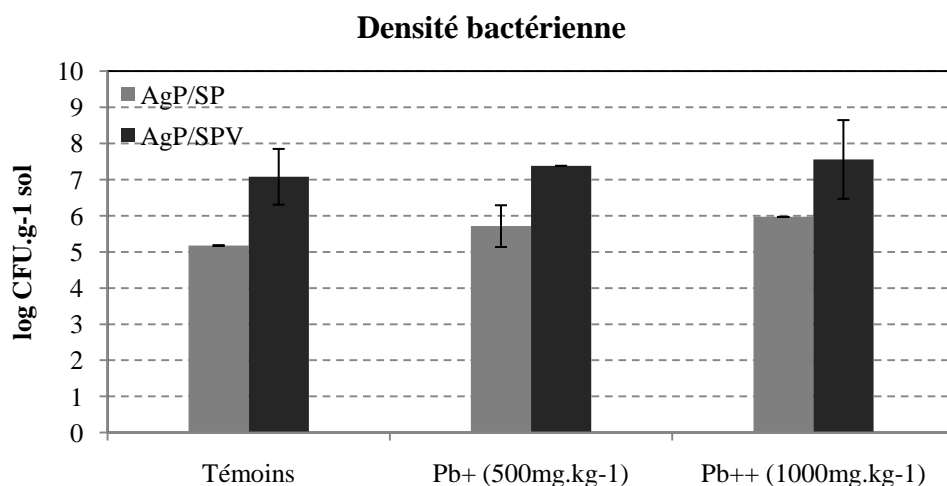


Figure 40 : Densité bactérienne des agrégats racinaires dans différents traitements

Echantillons	Densité bactérienne (logCFU/g sol)
AgP/T/SP	5,18 ± 0,00 (a)
AgP/Pb+/SP	5,71 ± 0,58 (a)
AgP/Pb++/SP	5,97 ± 0,00 (a)
AgP/T/SPV	7,08 ± 0,77 (b)
AgP/Pb+/SPV	7,38 ± 0,00 (b)
AgP/Pb++/SPV	7,56 ± 1,09 (b)

Tableau 12 : Densité bactérienne des agrégats racinaires

A.2 Diversité génétique

Les résultats de la numération bactérienne cultivable montrent donc que la présence de *P. corethrurus* augmente la densité bactérienne. Cependant, la méthode utilisée (culture sur milieu) est restrictive puisque d'une part nombre d'espèces bactériennes ne sont pas cultivables, d'autre part le milieu utilisé, même s'il est généraliste, peut limiter le développement de certaines souches et en favoriser d'autres. C'est pourquoi afin de préciser la structure et la diversité des communautés bactériennes mises en cause nous avons utilisé pour la suite de l'étude une méthode moléculaire palliant les limitations des méthodes

« culture-dépendantes » (Ranjard *et al.*, 2000) : la technique de la PCR-DGGE. Le couple d'amorces utilisé est donné dans la partie matériel et méthodes.

Les résultats présentés ont été obtenus avec un gradient de dénaturation de 30-60% (Figure 41) et un pourcentage d'acrylamide de 8 %. Pour chaque échantillon, 3 répétitions ont été effectuées sur 3 gels différents. Les profils DGGE ont été ensuite analysés par le logiciel GelCompact.

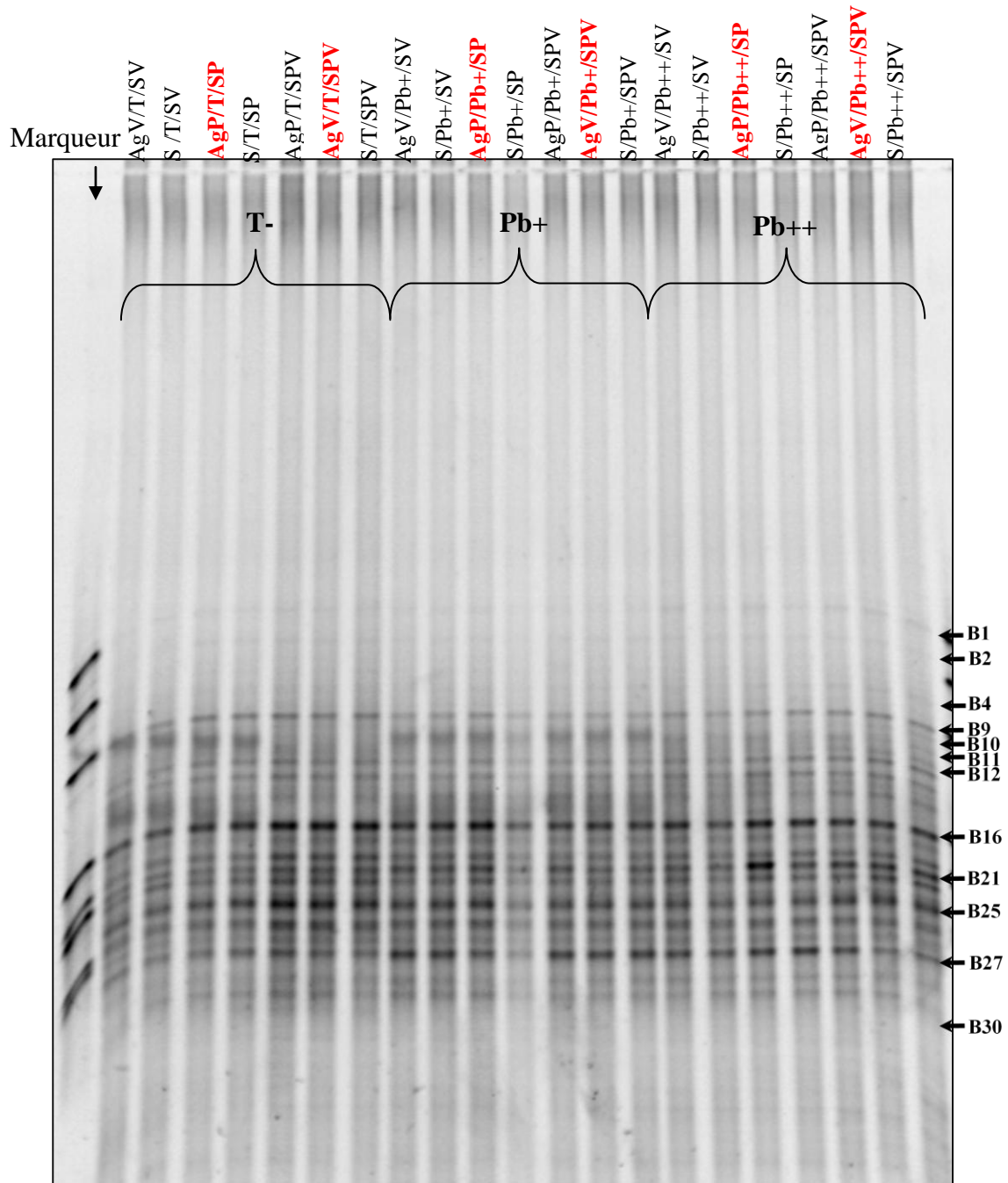


Figure 41 : Les profils DGGE bactériens des agrégats racinaires et des agrégats de la drilosphère (Gradient de migration 30-60%)

Comparaison du profil DGGE entre les agrégats racinaires de la plante cultivée avec ou sans ver de terre

Bien que tous les types d'échantillons aient été traités, nous avons, dans un premier temps, limité notre analyse aux agrégats racinaires (AgP) des systèmes SP et SPV avec les différents traitements au plomb (T, Pb⁺ et Pb⁺⁺).

Quel que soit le traitement, les profils obtenus sont très voisins avec un nombre de bandes qui varie d'environ 20 bandes pour les agrégats racinaires des traitements témoins sans plomb à environ 22 bandes pour ceux des traitements à 1000 mg Pb.

Certaines différences peuvent cependant être observées :

- Les bandes 10 et 12 ne sont présentes que dans les agrégats racinaires des plantes cultivées avec 1000 mg Pb kg⁻¹.
- La bande 11 n'existe que dans les agrégats racinaires des plantes cultivées en présence de vers et avec un taux de Pb⁺⁺.
- Les bandes 21 et 25 présentent une forte intensité dans les agrégats racinaires des plantes cultivées d'une part en absence de vers et avec une forte concentration en plomb et d'autre part dans ceux des plantes cultivées avec vers et sans plomb.

L'analyse en composante principale, réalisée à partir de la disposition et de l'intensité des bandes obtenues sur le gel donne un cercle de corrélation dont les 3 premiers axes expliquent 48,56 % de l'inertie totale (soit 19,61 % ; 17,21 % ; 11,74 % pour les axes 1, 2 et 3, respectivement). Les variables (les bandes détectées) sont représentées dans le cercle des corrélations avec les deux premiers axes en Figure 42A. La disposition des échantillons sur le dendrogramme montre bien qu'il y a une grande différence entre les 3 replicats d'un même système (Figure 42B).

Deux types d'analyse ont été réalisés, l'une en fonction de la présence ou de l'absence de vers (Figure 42C) et l'autre selon la teneur en Pb des échantillons (Figure 42D). L'ACP ne permet pas de séparer les échantillons avec vers de ceux sans vers bien que quelques différences dans le nombre et l'intensité des bandes soient visibles sur le gel. L'analyse discriminante réalisée sur 10000 permutations confirme que la séparation des traitements SP et SPV sur l'ACP n'est pas significative.

Sur la Figure 42D, les échantillons se séparent nettement en fonction de leur concentration en plomb, les échantillons provenant des expérimentations où le taux de Pb était le plus important se différenciant des témoins et des échantillons des expérimentations contaminées par la dose la plus faible de Pb.

Ces résultats indiquent donc d'une part que la présence de Pb modifie les communautés bactériennes associées aux racines de *L. camara*, d'autre part que cette modification n'est pas influencée par la présence de *P. coretrurus*. Ce résultat surprenant, eu égard à la nette influence de ce vers sur la phytoremédiation, nous a conduit à mettre en doute la technique expérimentale. C'est pourquoi nous avons effectué de nombreuses autres PCR-DGGE en modifiant le gradient de migration (40-70%) (Figure 43), le pourcentage d'acrylamide (6 %). D'autres couples des amorces comme rpoB1698f et rpoB2041r qui ciblent la zone du gène rpoB ARN 16S ont été également testés. Tous les résultats nous ont conduits à la même conclusion : l'activité du ver ne modifie pas sensiblement les profils des communautés bactériennes des agrégats racinaires obtenus par la technique de PCR-DGGE.

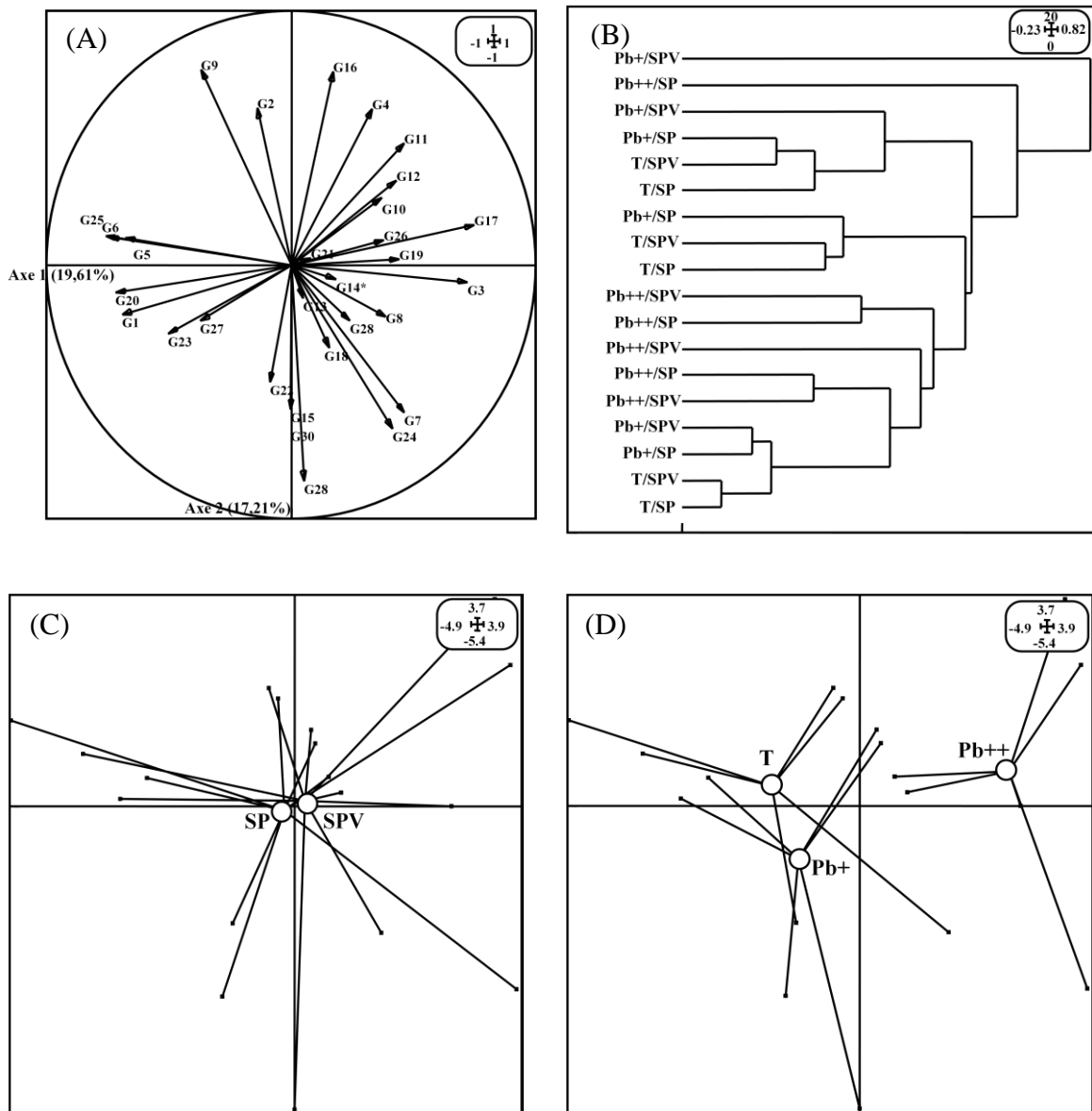


Figure 42 : Analyse en composante principale réalisée à partir de la disposition et de l'intensité des bandes en DGGE entre les agrégats racinaires cultivée avec et sans ver

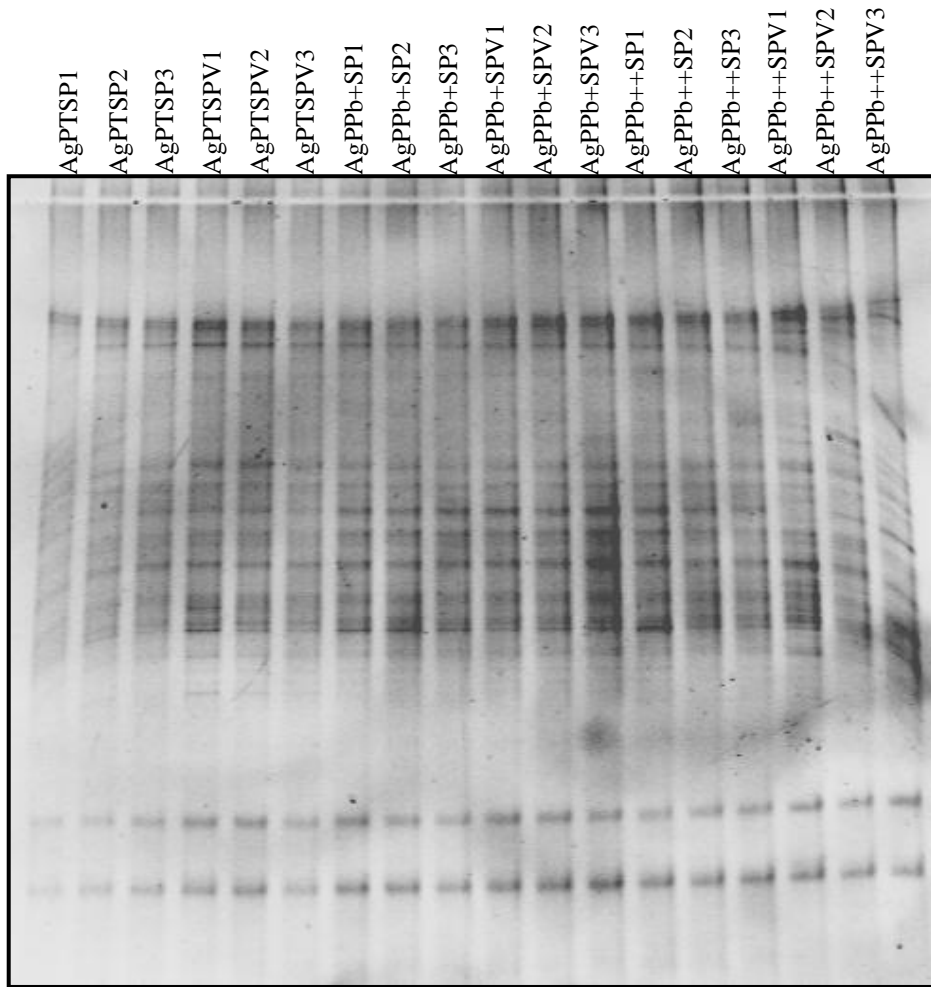


Figure 43 : Profils DGGE des agrégats racinaires dans les traitements avec ou sans ver de terre (avec un gradient de 40-70%)

A.3 Diversité fonctionnelle

Nos premiers résultats ont montré que la présence de vers augmentait significativement les densités bactériennes cultivables ; par contre les analyses des communautés bactériennes n'ont pas permis de conclure quant à une action des vers sur la structure de ces communautés. Il est possible que les vers agissent sur la diversité fonctionnelle Scheu *et al.* (2002) mais non sur la diversité taxonomique (Brown, 1995). De plus, Tiunov et Dobrovolskaya (2002) ont montré l'importance des sources de nourriture dans la modification de la composition des communautés en réponse à la présence de vers. C'est ce que nous avons voulu déterminer en nous intéressant à la détermination des activités métaboliques des souches microbiennes présentes dans les agrégats racinaires. Dans ce but, une méthode d'étude des profils métaboliques a été utilisée : la technique des microplaques BiologTM. 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).

Dans notre étude, les microplates BiologTM GN2 ont été utilisés, ils sont constitués de 96 puits qui contiennent chacun une source de carbone susceptible d'être dégradée par les microorganismes. Les plaques Biolog GN2 ont été conçues pour l'identification des bactéries Gram négatif et contiennent des substrats appropriés pour ce groupe de microorganismes, ce sont les plaques les plus utilisées actuellement pour la recherche en écologie microbienne des microorganismes du sol (Stefanowicz, 2006). Ainsi, Preston-Mafham *et al.* (2002) ont rapporté qu'environ 75 % des travaux scientifiques des 10 dernières années, liés à l'analyse des communautés microbiennes sur les plaques Biolog, ont utilisé des plaques GN.

La technique est décrite en détail dans la partie matériel et méthodes. Au cours de l'incubation, l'utilisation d'une source de carbone entraîne, via un processus respiratoire, la réduction d'un indicateur rédox (INT-Formazan) aboutissant au développement d'une couleur violette détectée par spectrophotométrie.

La valeur d'AWCD (Average Well Colour Development) représente l'activité standardisée des micro-organismes de la communauté testée pour chaque substrat. Pour chaque échantillon, l'analyse comporte ainsi 95 valeurs d'AWCD. L'AWCD est calculée sur la courbe moyenne de croissance et est utilisée pour déterminer la diversité fonctionnelle de

chaque échantillon. 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 (De Fede et Sexstone, 2001).

A.3.1 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 24 h pendant 6 jours (Figure 44).

Quel que soit l'échantillon testé, les courbes tracées à partir des valeurs de l'AWCD ont une évolution parallèle (Figure 44). On observe une augmentation rapide de l'AWCD entre 20 et 72 h, ensuite la progression devient plus lente. La valeur maximale obtenue au bout des 144 h est d'environ 2.

Compte tenu du fait qu'à 72 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.

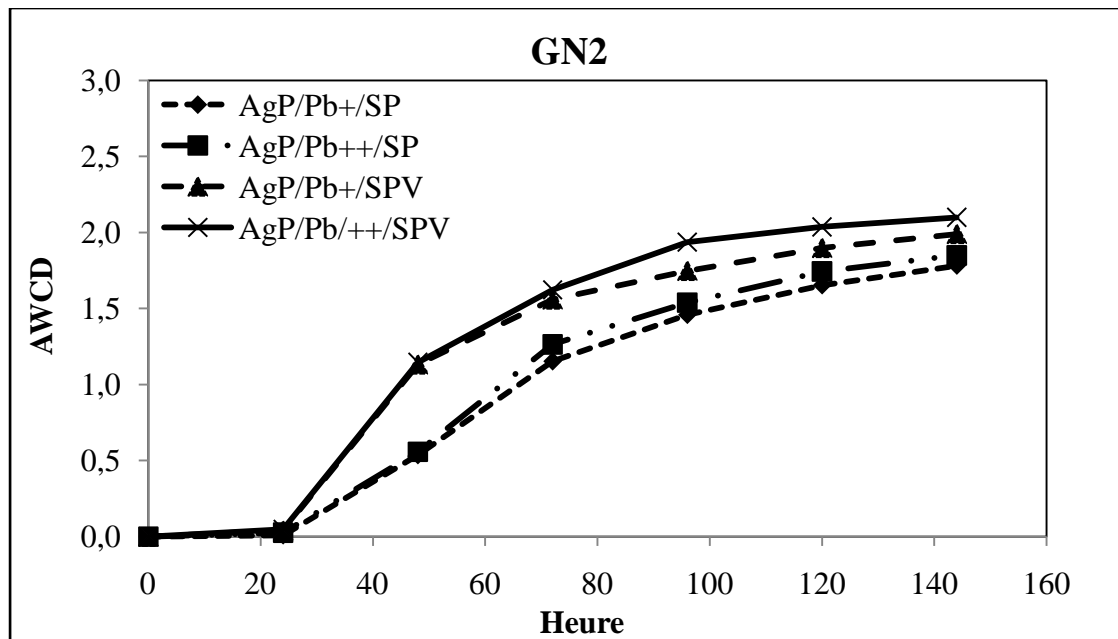


Figure 44 : Evolution de l'AWCD au cours du temps pour la plaque GN2.

A.3.2 Activité totale et AWCD

Les valeurs obtenues à 72 h sont données dans les Tableaux 13A et B en annexe 3. L'activité métabolique globale mesurée apparaît significativement plus élevée dans les agrégats racinaires provenant d'expérimentation avec des vers que sans vers. Dans les deux types d'agrégats, les activités des échantillons les plus pollués sont significativement plus élevées que celles des pollués à 500 mg Pb kg⁻¹ (Tableau 14).

L'AWCD conduit à la même observation, à savoir une activité plus élevée dans les agrégats racinaires récoltés dans les expérimentations avec vers. Par contre, aucune différence significative n'est à noter entre les deux niveaux de pollution (Tableau 14).

A.3.3 Capacités de dégradation et indice de Shannon

La capacité d'utilisation des différents substrats par les communautés bactériennes des agrégats 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.

Les résultats dans le Tableau 14 montrent que la capacité d'utilisation des différents substrats varie de 87,4 % à 75,79 %. Les échantillons issus des cultures avec vers de terre présentent significativement plus d'activités métaboliques diverses que ceux prélevés dans les expérimentations sans vers de terre et le niveau de pollution ne modifie pas leur richesse. Par contre, les activités métaboliques détectées dans les agrégats racinaires des plantes cultivées en absence de vers sont significativement moins nombreuses dans les échantillons pollués à 500 mg Pb kg⁻¹.

Echantillons	Total d'activité ^(a)	AWCD ^(b)	Richesse ^(c)	Indice de Shannon ^(d)
AgPPb+SP	109,47 ± 4,07 (a)	1,15 ± 0,04 (a)	72 ± 1 (a)	4,71 ± 0,14 (a)
AgPPb++SP	120,06 ± 7,38 (b)	1,26 ± 0,08 (a)	75 ± 0 (b)	5,07 ± 0,23 (b)
AgPPb+SPV	148,13 ± 1,17 (c)	1,56 ± 0,01 (b)	82 ± 1 (c)	6,12 ± 0,04 (c)
AgPPb++SPV	162,08 ± 2,31 (d)	1,61 ± 0,11 (b)	83 ± 1 (c)	6,47 ± 0,16 (d)

Tableau 14 : Indice de diversité fonctionnelle des différents traitements avec et sans ver de terre

^(a) Somme moyenne des activités = Somme moyenne des valeurs d'absorption en triple plaques

^(b) Average well color development AWCD = $x(\text{ODi}-\text{ODAi})/95$ avec $\text{ODi} = \text{OD } 590 \text{ nm}$ dans chaque puits

^(c) Substrat richesse = nombre moyen des puits positifs ($\text{DO} > 0,25$)

^(d) Substrat diversité = $-\sum \text{pi}(\ln \text{pi})$, pi = absorption moyenne de chaque substrat/somme moyenne des activités
 $n = 3$, moyenne et écar-type. Les lettres correspondent aux classes résultats.

Les valeurs de l'indice de Shannon confirment les résultats précédents, c'est-à-dire une plus grande diversité des activités dans les échantillons avec vers que sans vers mais également dans les agrégats racinaires issus des milieux les plus pollués par rapport à ceux pollués à 500 mg de Pb.

A.3.4 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 : polymère, amines et amides, carbohydrates, acides organiques, acides aminés, et divers contenant notamment des alcools et des bases nucléiques (cf. Tableau 15 en annexe 4).

Les résultats montrent que la présence des vers de terre entraîne une augmentation significative des activités de tous les groupes de substrats (Figure 45). Les résultats de l'analyse de variance sont les suivants : $F = 49,70$; $P < 0,001$; $F = 25,06$; $P < 0,001$; $F = 52,98$; $P < 0,001$; $F = 104,01$; $P < 0,001$; $F = 54,62$; $P < 0,001$; $F = 142,20$; $P < 0,001$ pour les 7 groupes : polymères, amines amides, carbohydrates, acides organiques, acides aminés, et divers, respectivement. L'action du Pb n'est significative que pour deux groupes de substrat : les acides organiques ($F = 13,06$; $P < 0,01$) et les acides aminés ($F = 7,85$; $P < 0,01$) (Tableau 16).

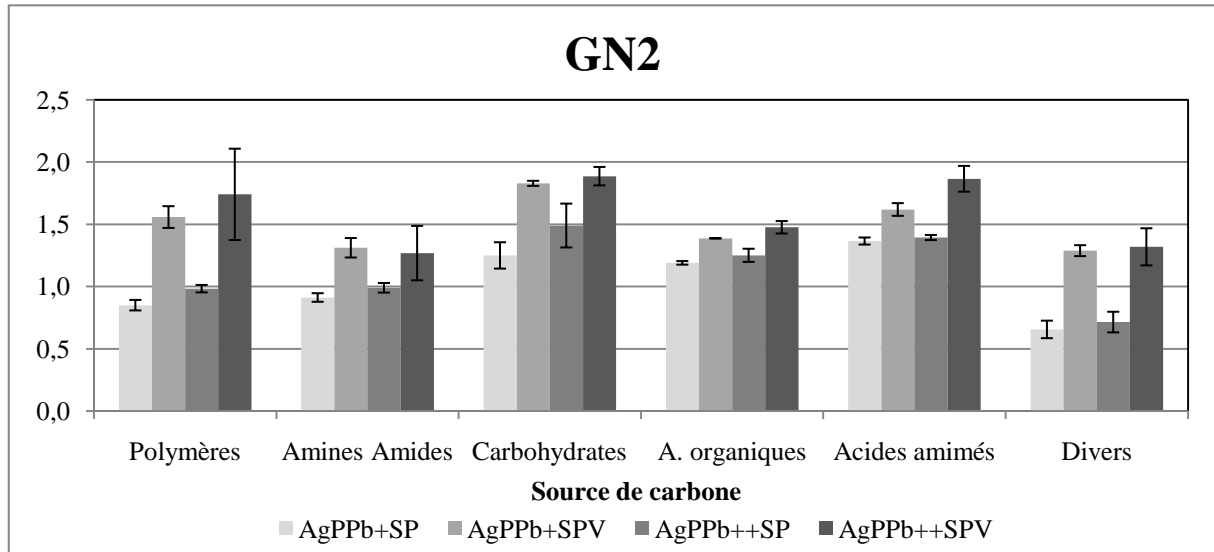


Figure 45 : Les activités des plaques GN2 (moyenne \pm écart-type calculés pour n) par catégories biochimiques (ANOVA à un facteur, $P < 0,05$)

Biolog GN2	Polymères	Acides amides	Carbohydrates	Acides organiques	Acides aminés	Divers
Teneur du Pb	n.s	n.s	n.s	13,06*	7,85*	n.s
Ver	49,70***	25,06***	52,98***	104,01***	54,63***	142,20***

Facteurs	F
Teneur en plomb	451,4***
Ver	4888,66***

Tableau 16 : Résultat ANOVA des effets de teneur en Pb et de ver sur AWCD

*** : significatif avec $P < 0,001$

** : significatif avec $P < 0,05$

* : significatif avec $P < 0,01$

Globalement, le test ANOVA montre un effet significatif positif ($F = 4888,66$; $P < 0,001$) et ($F = 35,57$; $P < 0,001$) de l'inoculation des vers de terre sur les valeurs d'AWCD. La teneur en plomb présente également un effet significatif global positif ($F = 451,4$; $P < 0,001$) sur les valeurs d'AWCD.

A.3.5 Analyse en composante principale des catégories biochimiques

Une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée pour voir si les profils d'activités des différents échantillons étaient dissociés.

Les deux premiers axes de l'ACP expliquent 96,13 % de la variabilité observée (soit 91,26 % et 4,87 % pour les axes 1 et 2, respectivement) (Figure 46A). L'analyse discriminante réalisée sur 10000 permutations montre que l'ACP est fortement significative. Sur l'ACP, les activités de dégradation des différentes catégories de substrats s'opposent seulement sur l'axe 1 en présence/absence (Figure 46B). Les agrégats racinaires obtenus en présence de vers se séparent nettement des autres par de plus fortes activités sur tous les substrats testés. Les agrégats racinaires des plantes cultivées sans vers se regroupent et sont caractérisés par de faibles activités métaboliques sur l'ensemble des substrats. Par contre, les agrégats racinaires élaborés en présence de vers sont séparés en fonction de leur teneur en plomb selon l'axe 2. En effet, les agrégats racinaires des systèmes SPV 500 mg.kg⁻¹Pb se distinguent de ceux traités à 1000 mg.kg⁻¹ par de faibles activités sur les acides aminés, les acides organiques et les carbohydrates.

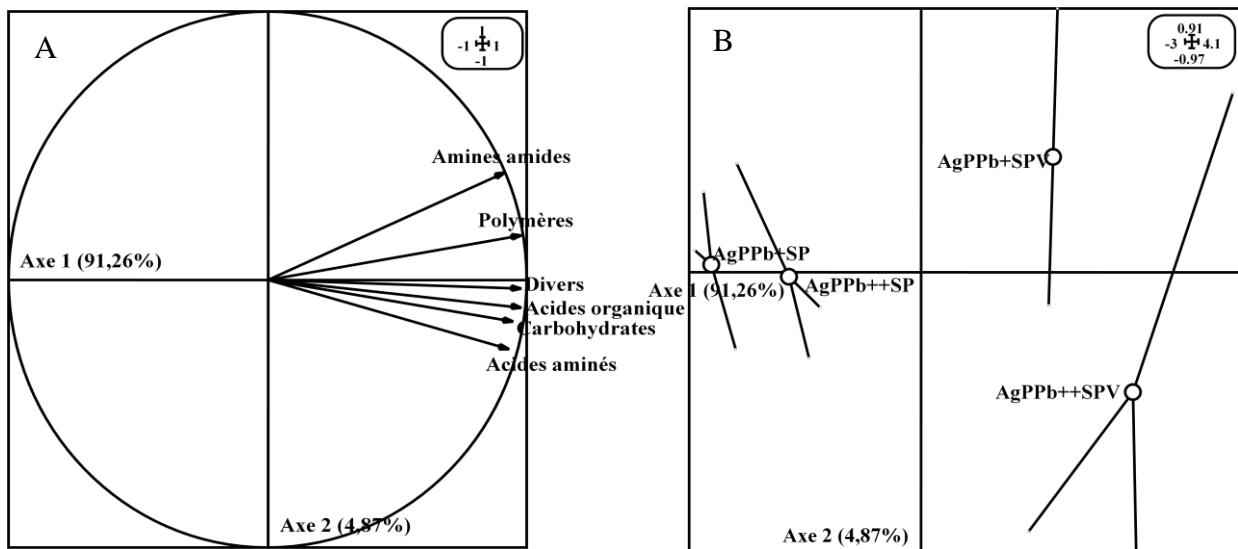


Figure 46 : Analyse en Composante Principale des activités métaboliques des plaques Biolog GN2 par catégorie biochimique (A) Cercle des corrélations, (B) Plan factoriel.

B/ Communauté fongique

B.1 Densité fongique cultivable

La densité fongique des agrégats racinaires est significativement plus élevée dans les agrégats provenant d'expérimentations avec *P. corethrus*. Les agrégats racinaires du témoin sans Pb et avec ver (AgP/T/SPV) présentent la plus forte densité (1,92 logUFC.g⁻¹ de sol) soit 2 fois plus que celle des agrégats racinaires obtenus dans les expérimentations sans ver. En présence de plomb, la densité fongique des agrégats racinaires des plantes cultivées avec ver n'est significativement plus élevée que pour les traitements à 500 mg.kg⁻¹ (Figure 47).

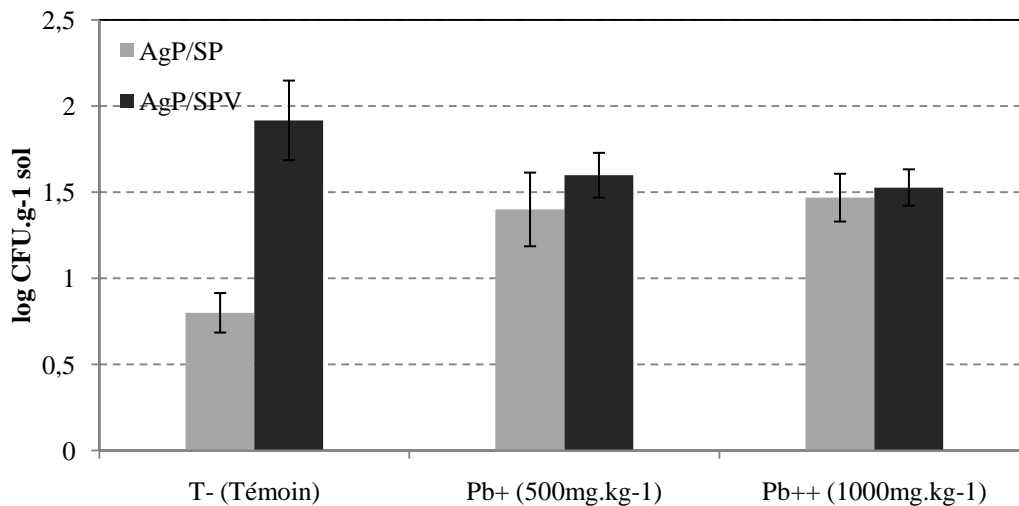


Figure 47 : Densité fongique cultivable des agrégats racinaires dans les différents traitements

Echantillons	Densité fongique (logCFU/g sol)
AgP/T/SP	0,80 ± 0,12 (a)
AgP/Pb+/SP	1,40 ± 0,21 (b)
AgP/Pb++/SP	1,47 ± 0,14 (b)
AgP/T/SPV	1,92 ± 0,23 (d)
AgP/Pb+/SPV	1,60 ± 0,13 (c)
AgP/Pb++/SPV	1,53 ± 0,11 (b)

Tableau 17 : Densité fongique cultivable des agrégats racinaire

B.2 Diversité de la mycoflore cultivable

Sur la base de critères morphologiques, nous avons différencié 41 morphotypes fongiques et noté leur importance relative dans les différents agrégats racinaires (Figure 48).

La plus faible diversité fongique a été obtenue dans les agrégats racinaires des témoins sans ver et non contaminés (AgP/T/SP). Dans ces agrégats, seuls 4 morphotypes sont présents en densité voisine. Toujours sans Pb mais en présence de ver, la diversité augmente fortement avec 24 morphotypes dans les agrégats racinaires. Dans cet échantillon, les souches n°33 et 41 sont largement majoritaires.

En présence de plomb dans les systèmes sans ver, on observe une augmentation de la diversité fongique de 80,95 % et 82,61 % pour les traitements au plomb à 500 mg.kg⁻¹ et 1000 mg.kg⁻¹, respectivement par rapport au témoin sans plomb (Figure 49). L'inoculation du ver a un effet positif sur la diversité, la plus grande diversité fongique (26 morphotypes) étant observée dans les agrégats racinaires des plantes cultivées dans les pots les plus contaminés.

Un certain nombre de souches cultivées (Figure 50) ont été isolées en fonction de leur spécificité pour des analyses taxonomiques ou physiologiques ultérieures.

Il s'agit :

- des souches S16, S24 et S41 dont les densités diminuent lorsque la concentration en Pb augmente,
- de la souche S7 qui n'est présente que dans les pots contaminés à 500 mg.kg⁻¹ et en présence de vers,
- de la souche S22 qui a, en présence de vers, une densité constante indépendante de la teneur en plomb,
- des souches S27 et S40 qui sont les plus fréquentes et les plus nombreuses indépendamment du type d'expérimentation.

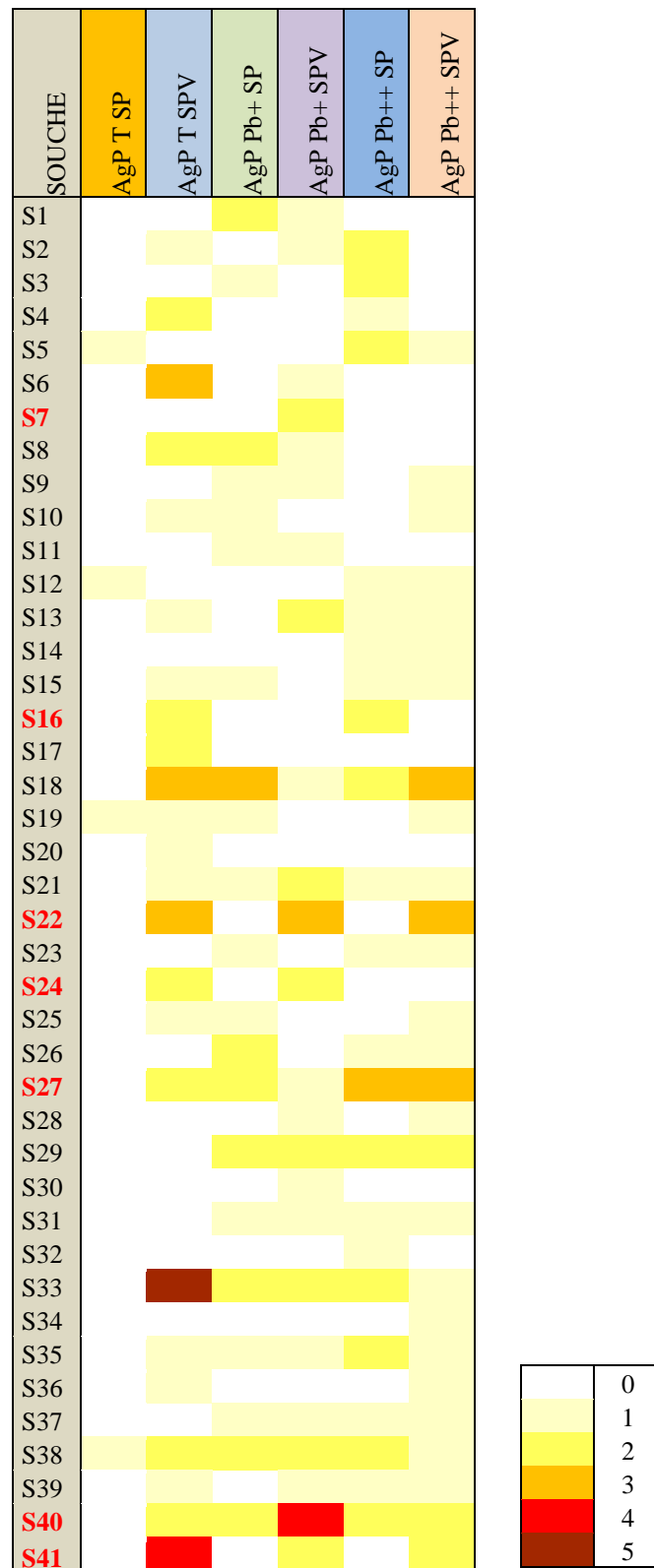


Figure 48 : Morphotypes fongiques, le code couleur est fonction de l'importance relative de chaque morphotype dans l'échantillon

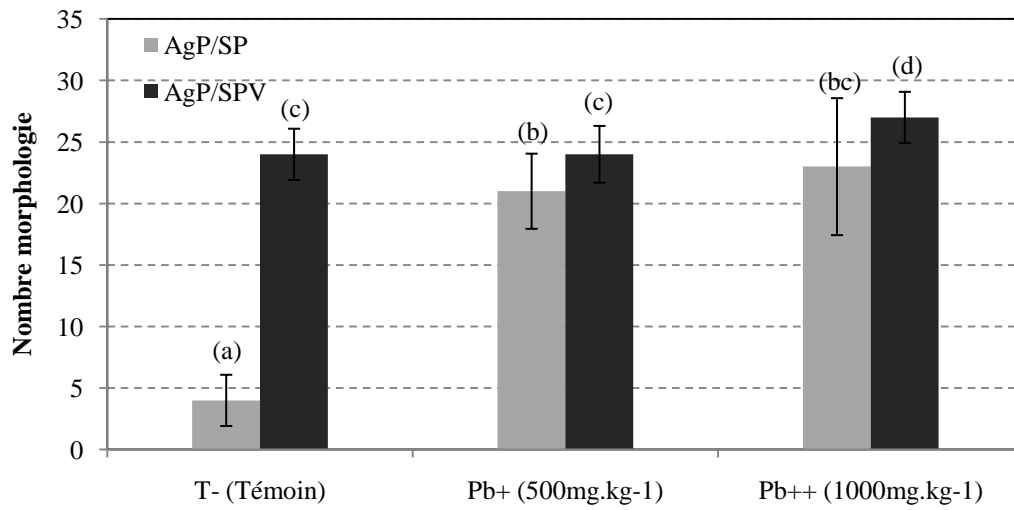


Figure 49 : Diversité morphologique des champignons des agrégats racinaires des différents traitements

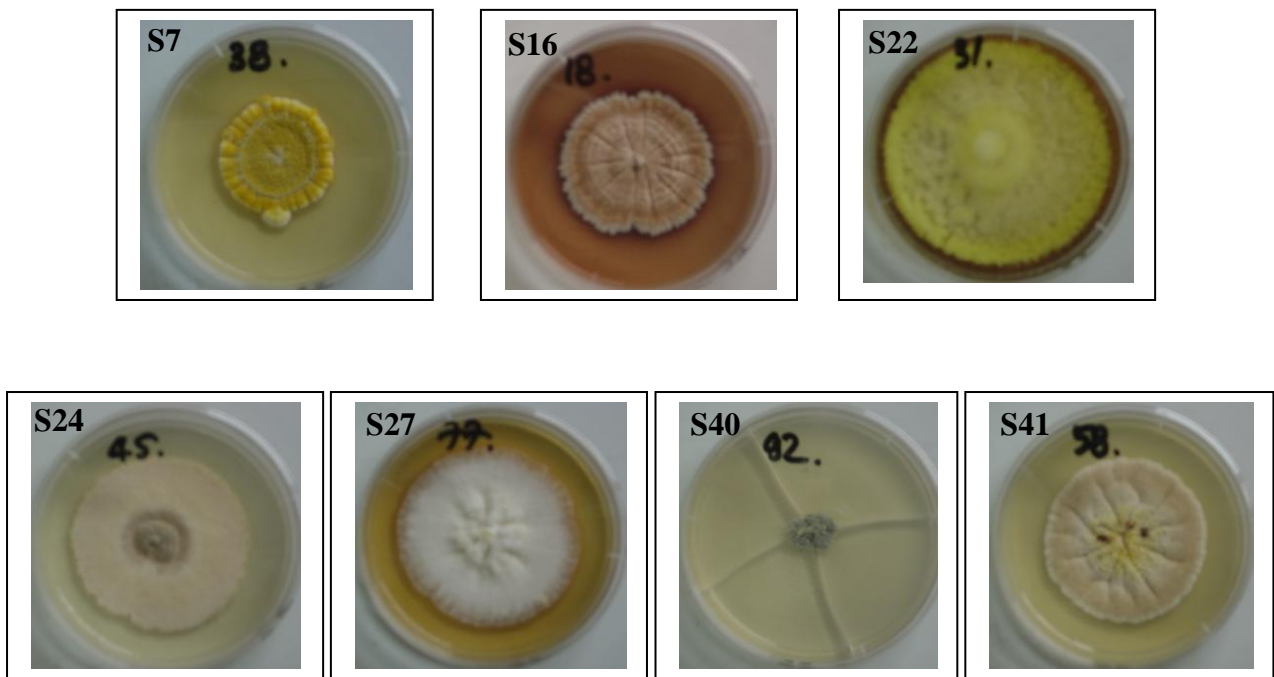


Figure 50 : Morphotypes des 7 souches fongiques sélectionnées

B.3 Détermination taxonomique des 7 souches fongiques sélectionnées

Souche	Espèce	% Similarité	N° GEN BANK
7	<i>Eupenicillium hirayamae</i>	98%	AF 033418
16	<i>Penicillium pimateouiense</i>	97%	AF 037431
22	<i>Aspergillus terreus</i>	98%	EF669580
24	<i>Eupenicillium shearii</i>	98%	AF033420
27	<i>Eupenicillium parvum</i>	98%	AF033460
40	<i>Eupenicillium erubescens</i>	98%	AF033464
41	<i>Eupenicillium rubidorum</i>	98%	AF033462

Tableau 18 : Souches fongiques identifiées

- Les souches S16, S24 et S41 qui sont sensibles à la présence de plomb dans le milieu sont toutes des souches fréquentes dans les sols. Peu de travaux concernent *Penicillium pimateouiense* ; par contre *Eupenicillium shearii* et *Eupenicillium rubidorum* sont citées dans plusieurs travaux comme des champignons coprophages résistant à la chaleur (Krug *et al.*, 2004).
- La souche 7 qui n'est présente que dans les pots faiblement contaminés et en présence de vers est également un *Eupenicillium*, *E. hirayamae* qui est cité comme très fréquent dans le sol et dans l'air (Crissy *et al.*, 1995).
- La souche fongique 22, résistante au plomb, appartient à l'espèce *Aspergillus terreus*, extrêmement commune dans les sols. Cette espèce contribue à la décomposition de la matière organique en raison de ses fortes activités cellulolytique, lipolytique et amylolytique (Hrmová *et al.*, 1990). Elle est signalée comme très résistante aux métaux lourds et facile à cultiver (Dias *et al.*, 2002). Le travail de Abbass et Razak (1991) montre que cette souche fongique est susceptible de produire de la métallothionéine (MT) qui s'associe aux métaux lourds (par exemple sous forme Cd²⁺-métallothionéine) pour former un complexe non toxique pour les organismes vivants.
- Les souches fongiques 27 et 40 qui se maintiennent dans toutes nos conditions expérimentales sont *Eupenicillium parvum* et *E. erubescens*. Ces champignons sont cités dans la littérature comme capables de s'adapter à des conditions environnementales défavorables telles que la dessiccation, l'acidité, la salinité et la présence de métaux (aluminium) (Vyas *et al.*, 2007).

En conclusion, les souches sélectionnées appartiennent toutes à des genres fongiques majeurs dans les sols. Toutes ces espèces sont caractérisées par une croissance rapide et peu exigeante en terme de substrat. Il semble que le milieu de culture utilisé nous ait conduits à avoir une représentation fortement biaisée de la diversité fongique de nos échantillons.

B.4 Etude moléculaire des communautés fongiques

L'étude précédente n'a concerné que les souches fongiques cultivables, une analyse de l'ADN fongique par la technique PCR-DGGE a été entreprise afin d'avoir l'image la plus complète possible de l'évolution de la diversité fongique des agrégats racinaires dans les différents traitements. Le couple d'amorces utilisé est le 403f/662r qui amplifie de manière spécifique une portion d'environ 260 paires de base du 28S fongique. Le gel DGGE (Figure 51) a été obtenu avec un gradient de dénaturation de 40-70 % et la proportion d'acrylamide est de 8 %. Pour chaque échantillon, 3 répétitions ont été effectuées et les profils obtenus en DGGE sont analysés avec le programme TotalLab.

Le profil DGGE a permis d'obtenir une représentation plus complète de la structure et de la diversité génétique de la communauté fongique quand on considère le nombre de bandes et l'indice de Shannon (Tableau 19). Le nombre de bandes le plus élevé a été obtenu dans les agrégats racinaires cultivés avec vers et en présence d'une dose de plomb de 1000 mg.kg^{-1} , avec 27 bandes environ. Tandis que c'est dans les pots témoins sans vers ni plomb que le nombre de bandes est le plus faible avec seulement 18 bandes. Les plantes ayant poussé en présence de vers de terre (SPV), sur des sols pollués au Pb et non pollués, présentent une structure de leur communauté fongique avec un plus grand nombre de bandes et une diversité plus importante donnée par l'indice de Shannon que dans ceux où les vers de terre sont absents (SP).

A partir des profils, un dendrogramme de similarité a été réalisé (Figure 52). Il sépare les agrégats racinaires obtenus en présence de vers des agrégats racinaires sans vers. Par ailleurs, pour les traitements sans vers, il y a une nette séparation entre les agrégats racinaires récoltés dans les expérimentations polluées au Pb et les agrégats provenant des expérimentations sans Pb ou polluées à 500 mg.kg^{-1} , c'est-à-dire qu'en présence d'une forte dose de Pb il y a modification de la communauté fongique.

Le test ANOVA à plusieurs facteurs confirme ces résultats ; il indique clairement que la structure des communautés fongiques (exprimées en nombre de bandes et en indice de Shannon) des agrégats racinaires est significativement corrélée aux facteurs présence/absence de vers et présence/absence de Pb (Tableau 19).

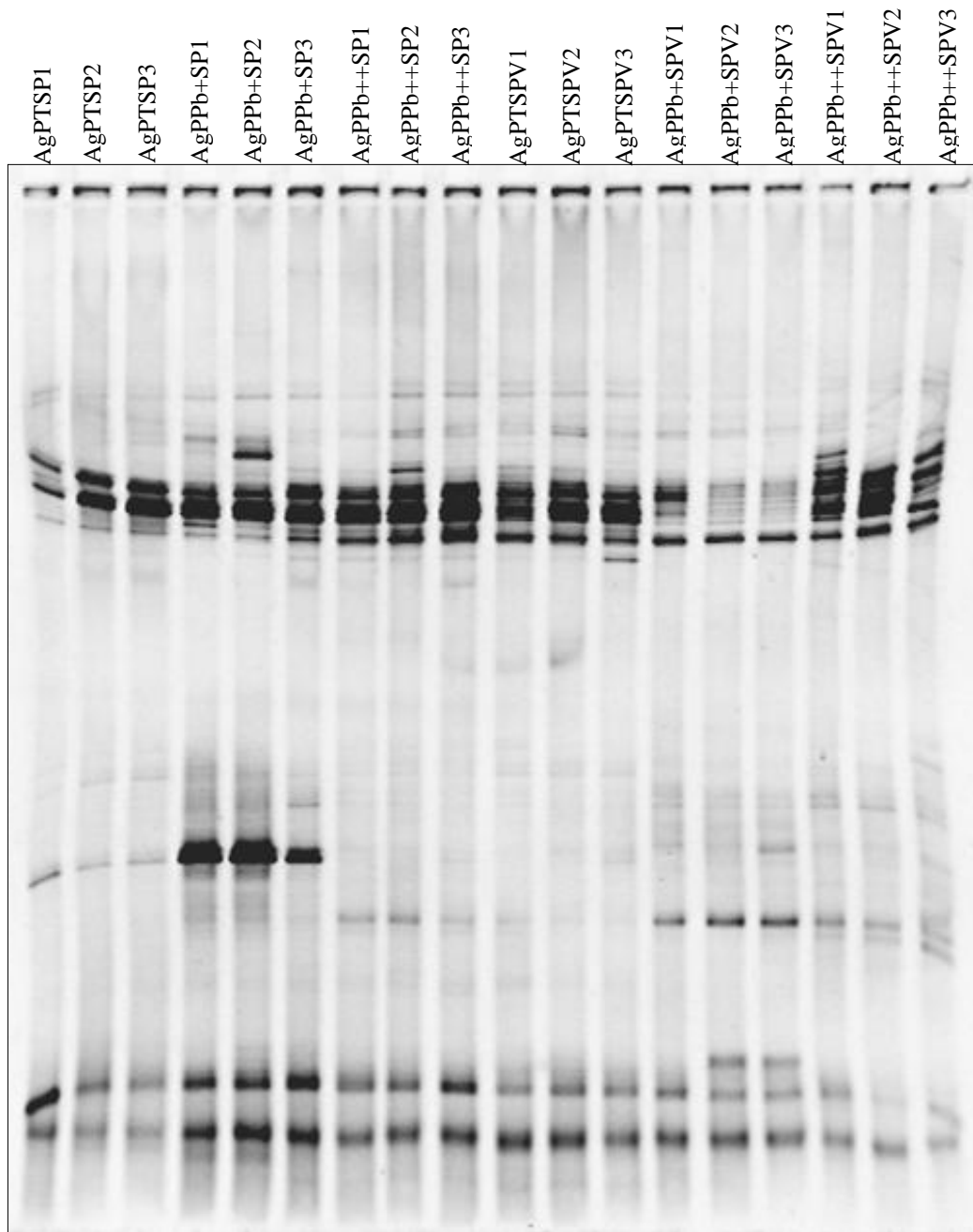


Figure 51 : Les profils DGGE fongique en gradient de dénaturant 40-70% des produits d'amplifications avec les amorces 403f/662r

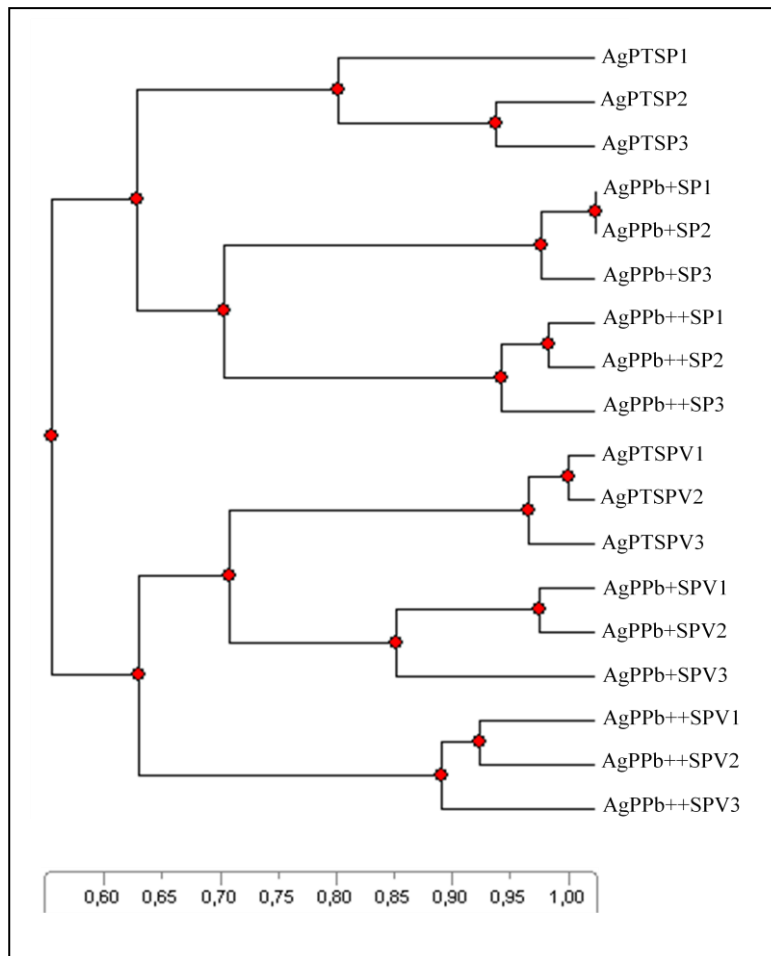


Figure 52 : Dendrogramme de similarité à partir du gel DGGE

Facteur	Nombre des bandes	Indice de Shannon
Teneur en Pb	40,45***	10,31**
Ver de terre	63,91***	72,17**

Tableau 19 : Résultat ANOVA

*** : significative avec $P < 0,001$; ** : significative avec $P < 0,05$; * : significative avec $P < 0,01$

DISCUSSION

1/ Evolution de la microflore bactérienne en présence de plomb et/ou de ver

Les densités bactériennes cultivables des agrégats racinaires quel que soit le niveau de contamination au plomb sont significativement plus élevées en présence de vers. Les valeurs obtenues entre $1,5 \times 10^5$ UFC/g de sol pour les échantillons AgP/T/SP et $1,1 \times 10^8$ UFC/g de sol pour les échantillons AgP/Pb⁺⁺/SPV sont du même ordre de grandeur que celles décrites sur d'autres sites soit entre 10^5 et 10^8 UFC/g sol sec (Powlson *et al.*, 2000). De nombreux auteurs ont signalé que la présence de métaux lourds diminuait la biomasse microbienne soit directement soit en inhibant certaines propriétés biochimiques du sol indispensables à leur survie (Kandeler *et al.*, 1996 ; Smit *et al.*, 1997 ; Bååth *et al.*, 1998 ; Konopka *et al.*, 1999 ; Kuperman et Carreiro, 1997 ; Kelly *et al.*, 1999 ; Ekelund *et al.*, 2003). Cependant l'action des métaux est souvent spécifique, certains microorganismes résistants pouvant survivre à un stress environnemental, alors que d'autres plus sensibles disparaissent en présence de ces nouvelles contraintes (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 ; Landi *et al.*, 2000 ; Fritze *et al.*, 2000). Ceci résulterait du fait que parfois cette baisse de biomasse est limitée dans le temps, elle peut en effet constituer une première réponse à un apport en métal et être ensuite suivie d'un retour à la valeur initiale à plus ou moins long terme (Kelly *et al.*, 1999). 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 (Kelly *et al.*, 1999 ; 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 ; Kuperman et Carreiro, 1997). La biomasse microbienne augmente en effet en présence de plantes, les exsudats racinaires servant de source de carbone et d'énergie pour les microorganismes du sol (Butenschoen *et al.*, 2008). Dans notre cas, la pollution au plomb affecte favorablement le développement de la plante «phytoremédiatrice», ainsi que nous l'avons montré dans le premier chapitre, on peut donc supposer que la présence de plomb en stimulant la croissance

racinaire stimule également la production d'exsudats favorables au développement des colonies microbiennes.

Lorsque les plantes sont cultivées en présence de vers de terre, dans le contexte de la phytoextraction, l'action du ver provoque une augmentation significative de la densité bactérienne des agrégats racinaires de l'ordre de 20% aussi bien dans les traitements sans plomb que dans ceux à 500 mg Pb kg⁻¹ ou 1000 mg Pb kg⁻¹. Ce résultat est très novateur car, si de nombreux travaux montrent que la densité et la diversité des micro-organismes sont modifiées dans les agrégats et les galeries de vers (Parle, 1963a ; Shaw et Pawluk, 1986 ; Scheu, 1987 ; Devliegher et Verstraete, 1997 ; Tiunov et Scheu, 1999 ; Tiunov et Dobrovolskaya, 2002 ; Tiunov et Scheu, 2001 a et b), aucun travail ne s'était encore intéressé à l'influence des vers de terre sur les communautés bactériennes des agrégats racinaires d'une plante « phytoremédiatrice ». Les interactions que les vers entretiennent avec les micro-organismes ont cependant probablement joué un rôle essentiel dans notre étude.

2/ Effet du Pb et/ou du ver sur la structure des communautés bactériennes

D'après les résultats obtenus en PCR-DGGE, la pollution des sols par du plomb a un impact sur ces communautés bactériennes, le changement de structure étant plus net lorsque le niveau de pollution est le plus élevé. Hu *et al.* (2007) ont déjà montré qu'il y avait des différences significatives de la structure des communautés microbiennes dépendant du niveau de contamination en plomb.

Par contre, il apparaît que la structure des communautés bactériennes présentes dans les agrégats racinaires n'est pas modifiée par les activités des vers *P. corethrurus* alors que la densité et l'activité phytoremédiatrice de la plante le sont fortement. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce résultat surprenant :

- Tout d'abord, les techniques de « fingerprint » moléculaire (ou empreintes génétiques) ciblant les acides nucléotides comme les techniques DGGE, TGGE, dépendent de l'extraction des acides nucléides des sols, du choix des amorces et de leur amplification par PCR ; elles sont donc soumises aux biais et limites associés à ces étapes clés (Martin-Laurent *et al.*, 2001 ; Robe *et al.*, 2003 ; Wintzingerode *et al.*, 1997 ; Hongoh *et al.*, 2003) :

- (1) Au mode de conservation des échantillons avant leur analyse (von Winzingerode *et al.*, 1997).
- (2) A l'efficacité de l'extraction qui varie avec le type d'échantillon, le type de microorganisme et leur état physiologique (Moran *et al.*, 1993).
- (3) A l'amplification préférentielle des séquences de certains taxons par rapport à d'autres (Zheng *et al.*, 1996 ; Suziki et Giovannoni, 1996).

➤ Ainsi il est estimé que la technique DGGE ne peut détecter que 1 à 2% des populations microbiennes représentant les espèces dominantes dans un échantillon environnemental (MacNaughton *et al.*, 1999). La combinaison avec une autre technique est nécessaire pour confirmer nos résultats. Parallèlement, les bandes d'ADN doivent être excisées, clonées et séquencées pour une détermination plus précise (Insam, 2001).

➤ Il est possible également que le génome d'une souche bactérienne puisse être modifié à la suite d'une pollution pour retrouver par la suite sa structure initiale. Rasmussen et Sørensen (2001) ont ainsi analysé l'effet du mercure sur la diversité bactérienne en calculant l'indice de Shannon basé sur la quantification du signal de chaque bande DGGE et ils ont pu montrer qu'après une légère diminution initiale de la diversité, celle-ci tendait à augmenter lentement et constamment durant le temps de l'expérience. Ainsi, la diversité bactérienne estimée à la fin de l'inoculation s'est avérée être supérieure à la diversité initiale.

➤ Enfin, la structure des communautés bactériennes initiales dans le sol est abondante et variée mais, lorsque les conditions environnementales ne sont pas favorables, beaucoup d'entre elles sont en dormance (Stenstrom *et al.*, 2001). Ainsi, des bactéries dont la croissance et l'activité sont inhibées par la présence de Pb ne peuvent réagir à la présence des vers de terre (Gutierrez et Jones, 2006 ; Pawlett *et al.*, 2009).

3/ Diversité bactérienne fonctionnelle

La structure taxonomique des communautés bactériennes restant stable dans nos différentes expérimentations, nous avons entrepris de déterminer leur diversité fonctionnelle. Pour cela, les plaques enzymatiques Biolog GN2 qui permettent de déterminer l'activité potentielle des communautés bactériennes ont été utilisées. Ces plaques ont en fait été

conçues pour l'identification des bactéries Gram négatif et contiennent des substrats appropriés pour ce groupe de microorganismes. Analogiquement, les plaques Biolog GP2 sont adaptées à l'identification de bactéries à Gram positif. Ces dernières années, les plaques GN2 et GP2 ont été utilisées pour la recherche en écologie microbienne bien qu'une fois de plus ce type de méthode ne concerne que les bactéries susceptibles de pousser dans le milieu de culture proposée (Konopka *et al.*, 1998). 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). Pourtant, c'est une technique rapide qui fournit bon nombre d'informations sur les communautés bactériennes et qui est donc fréquemment utilisée pour étudier la réponse métabolique des communautés microbiennes de la rhizosphère (Söderberg *et al.*, 2004 ; Baudoin *et al.*, 2001 ; Grayston *et al.*, 1998). La plaque EcoPlates de Biolog a aussi 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 le plus souvent considérablement réduites dans des sols contaminés par les métaux lourds (Knight *et al.*, 1997 ; Kelly et Tate, 1998 ; Ellis *et al.*, 2001). 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 (Heinonsalo *et al.*, 2000 ; Epelde *et al.*, 2008). Dans notre cas, les activités augmentent avec la teneur en Pb, ceci est en accord avec les résultats obtenus avec *T. caeruleus* (Kozdrój et van Elsas, 2000).

Dans notre étude, l'analyse des profils physiologiques avec les plaques Biolog met en évidence que la présence du ver augmente la diversité fonctionnelle bactérienne, Walke et Parkinson (2003) ont fait des observations identiques dans des microcosmes soumis à l'influence du ver de terre *Aporrectodea trapezoides*. Comme la diversité taxonomique est, d'après nos études précédentes, restée stable, elle ne peut expliquer ce résultat. On peut alors formuler l'hypothèse que certaines bactéries ont été stimulées par l'activité des vers de terre soit après passage par le tractus digestif du ver (Kersante *et al.*, 2006 ; Lavelle *et al.*, 1995 ; Martin *et al.*, 1987) soit par une modification du type de matières organiques disponibles (Welke et Parkinson, 2003). Ainsi, l'étude d'un autre ingénieur de l'écosystème, le termite humivore, a montré que la zone du sol influencée par l'activité de ces insectes (termitosphère) contient des composés organiques plus abondants et plus polymérisés que le sol témoin (Lee,

1983 ; Garnier-Sillam *et al.*, 1989 ; Garnier-Sillam et Harry, 1995). Ces matières organiques particulières pourraient favoriser le développement, chez certaines souches bactériennes, d'enzymes spécialisées dans leur dégradation. Une autre étude, portant sur l'effet des larves de *Tipula paludosa* sur la croissance végétale et les communautés microbiennes du sol, a montré par l'observation de leurs profils physiologiques qu'en présence de larves, il y avait une meilleure utilisation des sucres, acides aminés et acides carboxyliques par la microflore tellurique (Dawson *et al.*, 2004). Ces changements résulteraient de l'exsudation de substrats carbonés par des racines lésées par les larves, de l'augmentation du nombre de racines mortes, de la décomposition des larves ou encore de la présence de leurs déjections.

4/ Densité et diversité de la mycoflore en présence de plomb et/ou de ver

En culture, les densités fongiques obtenues pour les différents échantillons sont beaucoup moins élevées que les densités bactériennes. La présence de Pb n'influence pas directement cette densité puisque c'est le témoin sans Pb et sans vers qui a la population fongique la plus basse, les agrégats racinaires des plantes cultivées en présence de Pb étant 2 fois plus riches en champignons cultivables. Ceci est en accord avec les observations de plusieurs auteurs qui signalent que les populations fongiques sont plus tolérantes aux métaux lourds que les bactéries et les actinomycètes (Hiroki *et al.*, 1992 ; Yong-Tao Li *et al.*, 2009).

Les densités fongiques sont plus élevées en présence de vers pour les sols témoins et ceux pollués à 500 mg.kg⁻¹Pb et à 1000 mg.kg⁻¹Pb ; les différences ne sont plus significatives. Les interactions entre champignons et vers de terre ne sont pas bien connues. Certains travaux ont montré que l'activité des vers de type endogé entraîne une diminution des populations bactériennes et fongiques (Kristufek *et al.*, 1992) alors que d'autres notent un fort développement d'hyphes fongiques en surface des turricules de *L. terrestris* et *P. corethrurus* (Parle, 1963b ; Barois, 1987). Teotia *et al.* (1950), au contraire, indiquent qu'il y a plus de bactéries mais moins de champignons dans les turricules de vers que dans les sols.

En ce qui concerne la diversité fongique cultivable, les valeurs sont comprises entre 7 et 91 morphotypes pour respectivement AgP/T/SP et AgP/T/SPV. En présence de vers, parallèlement à l'augmentation de densité fongique, on observe également une augmentation de la diversité des souches cultivées.

La PCR-DGGE montre qu'il y a une restructuration des communautés fongiques sous l'influence du Pb mais également des *P. corethrurus*. Il est connu que la forte concentration en métaux lourds affecte négativement la taille, la diversité et l'activité des communautés fongiques. Par ailleurs, Del Val *et al.* (1999) ont montré que la richesse spécifique et la diversité des champignons arbusculaires mycorhiziens (CAM) mesurée par l'indice de Shannon augmentent dans des sols contaminés au plomb. L'augmentation de la diversité des propagules fongiques pourrait être une réponse au stress et permettre à des espèces fongiques, probablement moins compétitives dans les sols non pollués mais plus résistants à la présence de métaux lourds, de coloniser les racines et de compléter leur cycle de vie (Wardle *et al.*, 1996).

Le rôle des vers de terre sur les communautés fongiques du sol a déjà été décrit. Ainsi, Moody *et al.* (1996) ont montré que les différentes espèces de vers de terre peuvent sélectionner leur nourriture parmi les diverses espèces de champignons du sol. Cela suggère que les vers de terre modifient la structure des communautés fongiques dans les sols, par ce biais ils peuvent également réduire certaines maladies racinaires en consommant des souches fongiques pathogènes (Moody *et al.*, 1996 ; Dash *et al.*, 1986). Ortiz-Ceballos *et al.* (2007) ont étudié l'impact du ver sur les champignons arbusculaires mycorhiziens (CAM). Ils ont montré que les vers de terre peuvent en disperser les spores par ingestion de sol ou en les transportant, attachés à leur cuticule. Ils peuvent également, en construisant leurs galeries, affecter le développement du mycélium et supprimer le contact entre les hyphes et les racines. Cette action sur les CAM peut, soit conduire à une diminution de la biomasse fongique, soit au contraire stimuler le développement de nouvelles souches fongiques par une augmentation de matières organiques disponibles suite à l'activité de consommation du ver.

PARTIE D : DISCUSSION – CONCLUSION

DISCUSSION - CONCLUSION GENERALE

L'objectif de ce travail était d'étudier les interactions entre les plantes « phytoremédiatrices », les vers de terre en tant qu'ingénieurs de l'écosystème et les microorganismes telluriques du sol dans le cas particulier d'une pollution au plomb.

Plusieurs hypothèses ont articulé notre recherche qui a conduit à l'obtention d'un certain nombre de résultats novateurs.

(1) Les métaux lourds, dans notre cas le plomb, ont-ils une influence sur la plante phytoremédiatrice ?

Dans un sol contaminé par du plomb, *Lantana camara* présente une meilleure croissance que dans le sol d'origine et, en fin d'expérimentation, atteint une biomasse plus élevée que les témoins. Ses capacités phytoremédiatrices sont comparables à celles de plantes réputées pour leur forte capacité d'accumulation telles que *Brassicae juncea* (Meyers *et al.*, 2008) et *Lathyrus sativus* (Brunet *et al.*, 2008).

Brunet *et al.* (2008) décrivent deux stratégies principales utilisées par les plantes pour contrer les effets délétères induits par la présence de plomb :

- (1) L'évitement qui consiste à accumuler le plomb dans l'apoplasme. En fait, à la surface des racines, les ions Pb^{2+} se lient aux groupements carboxyles des acides uroniques du mucilage sécrété par les cellules racinaires. Ainsi, celui-ci forme une barrière protectrice du système racinaire. Dans les parois cellulaires, le Pb peut se lier aux groupements carboxyles tels que l'acide galacturonique et l'acide glucuronique. Ces différentes liaisons immobilisent efficacement le Pb dans l'apoplasme.
- (2) La séquestration qui consiste à bloquer le Pb rapidement dans les vacuoles lorsqu'il parvient jusqu'au symplasme. Dans cette stratégie, les structures intracellulaires sont exposées au polluant mais sont peu affectées grâce à une tolérance constitutive des organites cellulaires.

Une étude plus fine de la physiologie de la plante, actuellement en cours, devrait nous permettre de déterminer quelle est la stratégie préférentielle de *Lantana camara*. Cependant, il faut quand même signaler qu'au cours de notre expérimentation, 1 plante sur les 5 se développant dans les sols contaminés avec le taux maximum de plomb (1000 mg Pb kg⁻¹ sol) a arrêté son développement, a jauni puis est morte. Il conviendra de vérifier le taux maximum de Pb supporté par *Lantama camara* en fonction de la taille du plant et de son état physiologique. La nature et la composition du sol sont également à prendre en considération. En effet, les plantes « phytoremédiatrices » ont souvent une capacité particulière à survivre dans des sols carencés en certains éléments nutritifs comme le calcium (White et Broadley, 2003 ; Antosiewicz, 2007).

(2) Quelle est la contribution des vers de terre à la biomasse végétale et à la capacité de phytoremédiation de la plante?

Dans les sols non contaminés, l'effet des vers de terre sur la croissance de la plante n'a pas été significatif mais dans les microcosmes contaminés au plomb, la présence de *P. corethrurus* a conduit à un accroissement de la biomasse des racines et des parties aériennes ainsi qu'à une augmentation de l'absorption de plomb.

Les vers de terre entretiennent avec les plantes des relations très complexes, du fait de la diversité des mécanismes par lesquels ils sont susceptibles d'agir sur elles. Ces mécanismes ont été groupés d'abord par Brown *et al.* (2004) en sept catégories que Blouin *et al.* (2007) ont limité à 5 mécanismes susceptibles d'expliquer l'effet positif des vers :

- (1) La stimulation de la minéralisation de la matière organique du sol
- (2) La dispersion et la stimulation de microorganismes bénéfiques
- (3) La stimulation de production de phytohormones par les microorganismes
- (4) Le contrôle de parasites et de maladies
- (5) Les modifications physiques de la structure des sols

Dans notre travail, la détermination d'un certain nombre de caractéristiques physico-chimiques des agrégats racinaires a montré que l'activité des vers de terre augmente significativement le taux de matière organique, les CEC ainsi que l'azote total et le K total et disponible. Par contre, contrairement à ce qui est souvent décrit dans la littérature (Lavelle *et*

al., 1998), la disponibilité de l'azote et du phosphore est réduite. Ceci pourrait être relié aux résultats des activités enzymatiques qui montrent qu'en présence de vers et de Pb, il y a augmentation des activités enzymatiques liées aux cycles du phosphore et de l'azote dans les agrégats racinaires ce qui pourraient entraîner une diminution de la fraction disponible pour les plantes. Globalement, la présence de *P. corethrurus* augmente les activités enzymatiques dans la rhizosphère ce qui pourrait expliquer la croissance accrue de *L. camara* par le mécanisme (1).

Dans notre premier chapitre, nous avons également pu montrer que l'activité des vers de terre était intense dans les pots expérimentaux. Cette modification de l'agencement des particules physiques conduit à une meilleure circulation de l'air et de l'eau dans le sol et facilite la croissance et la pénétration des racines. Le mécanisme (5) semble ainsi également se vérifier.

En retour, les vers de terre profitent des racines et des exsudats racinaires comme source de nutriment pour survivre et se maintenir dans des milieux pollués, ainsi à la fin de notre expérimentation, la mortalité des vers était inférieure à 10%.

Un autre résultat essentiel de notre étude est que la présence de vers augmente significativement l'accumulation de plomb dans les parties aériennes et racinaires des plantes. Cette action des vers de terre est ici mise en évidence pour la première fois. Ceci pourrait être dû à un effet des vers sur la dynamique du Pb et donc sur sa biodisponibilité pour la plante (Abdul Rida, 1996 ; Devliergheer et Verstraete, 1997). Pour conclure sur cette hypothèse, il faudrait faire une mesure de la teneur en plomb des agrégats racinaires, des turricules et du sol non remanié.

(3) La réponse des communautés microbiennes (bactéries et champignons), dans un contexte complexe plante phytoremédiatrice/ver de terre/métaux lourds, joue-t-elle un rôle sur la croissance de la plante et l'efficacité de l'hyperaccumulation ?

Dans les mécanismes d'action des vers de terre sur la croissance des plantes, leurs interactions avec les communautés microbiennes telluriques sont souvent incriminées (Blouin *et al.*, 2007).

Nos résultats montrent que la biomasse des microorganismes, bactéries et champignons, des agrégats racinaires augmentent significativement en présence de vers. L'activité des vers de terre peut disperser et/ou stimuler des microorganismes bénéfiques. En effet, les microorganismes ont une très faible mobilité dans les sols, les vers par leur activité de bioturbation peuvent mettre les microorganismes telluriques en contact avec de nouvelles ressources qui contribuent à leur essor. La rhizosphère, de taille accrue en présence de vers, fournit une surface de développement plus importante pour la microfaune et la microflore rhizosphériques.

Si nous n'avons pas pu mettre en évidence de différences structurales de nos communautés bactériennes par les analyses en « fingerprint », l'analyse des profils physiologiques par plaques BIOLOG met en évidence que la présence du ver augmente la diversité fonctionnelle bactérienne. En ce qui concerne les communautés fongiques une modification de leur structure taxonomique a par contre clairement été montrée. Les vers de terre en consommant sélectivement certains microorganismes peuvent modifier l'équilibre entre les différentes espèces de microorganismes. Mais, on peut aussi considérer qu'en agissant sur la croissance de la plante et ses capacités de phytoremédiation, les vers de terre modifient la nature des exsudats racinaires et donc des communautés fonctionnelles, bactérienne ou fongique, qui y sont associées (Jakobsen et Rosendahl, 1990 ; Han *et al.*, 2005). A l'inverse, l'action des vers sur la croissance des plantes peut aussi résulter d'une augmentation des bactéries phytostimulantes, qui modifient l'allocation des ressources aux plantes et facilitent leur développement. En effet, certains microorganismes sécrètent des phytohormones ou des composés de structure similaire qui agissent d'une part sur la biomasse végétale et d'autre part, en réduisant les effets toxiques des métaux vis-à-vis de la plante, permettent une phytoextraction plus rapide et plus efficace. C'est le cas en particulier des bactéries PGPB et des champignons producteurs de métallothionéine (MT) (Grandlic *et al.*, 2009 ; Ma *et al.*, 2009 ; Glick *et al.*, 1998).

En conclusion, *Lantana camara* présente une forte tolérance au plomb et des capacités sérieuses de phytoextraction. Le ver, *Pontoscolex corethrurus* présente lui aussi une bonne tolérance au Pb et agit positivement sur la croissance et les capacités de phytoextraction de *L. camara*. L'association du ver *Pontoscolex corethrurus* et de la plante *Lantana camara* a donc un potentiel considérable pour le traitement de zones polluées au plomb.

S'il a été clairement montré au cours de ce travail que l'impact de *P. corethrurus* sur *L. camara* est lié aux modifications quantitatives et qualitatives des communautés de microorganismes telluriques, il est difficile encore de déterminer le rôle et surtout le sens d'action des deux partenaires.

En perspective, afin de préciser les mécanismes mis en jeu, un certain nombre de travaux complémentaires nous paraissent essentiels à réaliser :

(1) Tout d'abord, notre expérimentation a été effectuée dans des volumes de sol réduit et sur des temps limités, une expérimentation de terrain en vraie grandeur doit maintenant être envisagée.

(2) Le dosage du Pb n'a été réalisé que dans les différentes parties de la plante, une analyse comparative des teneurs en Pb des différents types d'agrégats et du sol non remanié devrait nous permettre de préciser le rôle des vers sur la biodisponibilité du Pb dans le sol.

(3) Les différentes techniques utilisées pour l'étude des communautés de microorganismes présentent chacune des limites. L'utilisation 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 phyto-stimulant, devrait également être mise en œuvre.

(4) Comprendre les adaptations métaboliques des *L. camara* soumis aux Pb et aux vers est essentiel c'est pourquoi, en parallèle de notre travail, des recherches en écophysiologie classique et moléculaire sont actuellement en cours afin d'optimiser l'efficacité de l'association *L. camara* et *P. corethrurus* pour la dépollution de sites industriels.

REFERENCES

A

- Abbass, M.I. and Razak, A.A. (1990). Cadmium, selenium and tellurium chelators in *Aspergillus terreus*. *Biological trace element Research* 28, 173-179.
- Abdul Rida, A.M.M. (1996). Concentrations et croissance de Lombriciens et de plantes dans des sols contaminés ou non par Cd, Cu, Fe, Pb et Zn: Interactions plant-sol-lombricien. *Soil. Biol. Biochem.* 28, 1037-1044.
- Adriano, D.C. (2001). Trace elements in terrestrial environments: Biochemistry, bioavailability and risks of metals. Springer-Verlag, New York.
- Antosiewicz, D.M. (2005). Study of calcium-dependent lead-tolerance on plants differing in their level of Ca-deficiency tolerance. *Environ. Pollut.* 134, 23–34.

B

- Bååth, E., Díaz-Raviña, M., Frostegård, Å., Campbell, C.D. (1998). Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 238-245.
- Babich, H. and Stotzky, G. (1980). Environmental factors that influence the toxicity of heavy metals and gaseous pollutants to microorganisms, *Crit. Rev. Microbiol.* 8, 99-145.
- Babich, H. and Stotzky, G. (1977a). Effect of cadmium on fungi and on interactions between fungi and bacteria in soil: influence of clay minerals and pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 1059-1066.
- Babich, H. and Stotzky, G. (1977b). Sensitivity of various bacteria, including actinomycetes and fungi to cadmium and the influence of pH on sensitivity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 681-695.
- Badiane, N.N.Y., Chotte, J.L., Patea, E., Masse, D., Rouland, C. (2001). Use of soil activities to monitor soil quality in the natural and improved fallows in semi-arid tropical regions. *Applied Soil Ecology* 18, 229-238.
- Baize, D. (1997). Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). INRA Editions, Paris, p 408.
- Baker, A.J.M. and Walker, P.L. (1989). Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: Heavy metal tolerance in plants - Evolutionary aspects. Shaw, A. (Eds). CRC Press, 155-177.

- Baker, A.J.M., and Brooks, R.R. (1989). Terrestrial higher plants which hyper accumulate metallic elements – Review of their distribution, ecology, and photochemistry. *Biorecovery* 1, 81-126.
- Baker, A.J.M., and Walker, P.L. (1990). Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: Shaw, J. (Ed.). *Heavy Metal Tolerance in plants: Evolutionary aspects*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 155-178.
- Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Reeves, R.D., Smith, J.A.C. (1999). Metal hyperaccumulator plants: a review of ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal polluted soils. Ed. Terry N and Banuelos G. Lewis Publishers Boca Raton, London, New York, Washington, 85-107.
- Barois, I., Verdier, B., Kaiser, P., Mariotti, A., Rangel, P. and Lavelle, P. (1987). Influence of the tropical earthworm *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae) on the fixation and mineralization of nitrogen. In *on Earthworm*, Eds A.M. Boncivini and P. Omodeo, 151-158. Mucchi, Bologna, Italy.
- 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.
- Belyaeva, O. N., Haynes, R. J. and Birukova, O. A. (2005). Barley yield and soil microbial and enzyme activities as affected by contamination of two soils with lead, zinc or copper. *Biol. Fertil. Soils* 41, 85–94.
- Bengtsson, G., Ek, H., Rundgren S. (1992). Evolutionary response of earthworms to long-term metal exposure. *Oikos* 63, 289–297.
- Beyer, W.N., Chaney, R.L., Mulhern, B.M. (1982). Heavy metal concentrations in earthworms from soil amended with sewage sludge. *J. Environ. Qual.* 11,381–385.
- Binet, F. (1993). Dynamique des peuplements et fonctions des lombriciens en sols cultivés tempérés. Thèse de Doctorat, Université de Rennes 1.
- Binet, F., Curmi, P. (1992). Structural effects of *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta: *Lumbricidae*) on the soil-organic matter system: micromorphological observations and autoradiographs. *Soil Biol. Biochem.* 24, 1519-1523.
- Binet, F., Le Bayon R.C. (1999). Space-time dynamiques in situ of earthworm casts under temperature cultivated soils. *Soil Biol. Biochem.* 31, 85-93.
- Blaylock, M.J., Salt, D.E., Dushenkov, S., Zakharova, O., Gussman, C., Kapulnik, Y., Ensley, B.D., Raskin, I. (1997). Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil applied chelating agents. *Environmental science and Technology* 31, 860-865.

- Blouin, M., Barot, S., Lavelle, P. (2006). Earthworms (*Millsonia anomala*, Megascolecidae) do not increase rice growth through enhanced nitrogen mineralization. *Soil Biol. Biochem.* 38, 2063–2068.
- Blouin, M., Lavelle, P., and Laffray, D. (2007). Drought stress in rice (*Oryza sativa* L.) is enhanced in the presence of compacting earthworm *Millsonia anomala*, *Environmental and Experimental Botany* 60, 352–359.
- Bohlen, J. P. (2002). Earthworms. *Encyclopedia of Soil Science*, 370-373.
- Bouché, M.B. (1977). Stratégies lombriciennes. Soil organisms as components of ecosystems. Swedish Natural Science Research Council Ecological Bulletin, Stockholm 25,122-132.
- Bouché, M.B., and Al-Addan, F. (1997). Earthworms, water infiltration and soil stability: some new assessments. *Soil Biol. Biochem.* 29, 441-452.
- Bourelleir, P.H. and Berthelin, J. (1998). Contamination des sols par les éléments traces: les risques et leur gestion. CR. Acc Sci, 42. Ed. Lavoisier, Paris.
- Brooks, R.R., Lee, J. Reeves, R.D. and Jaffré, T. (1977). Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *Journal of Geochemical Exploration* 7, 49-57.
- Brown, G.G. (1995). How do earthworms affect microflora and faunal community diversity? *Plant and Soil* 170, 209-231.
- Brown, G.G., Barois, I., Lavelle, P. (2000). Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *Eur. J. Soil Biol.* 36, 177–198.
- Brown, G.G., Edwards, C.A., Brussaard, L. (2004). How earthworm affect plant growth: burrowing into the mechanisms. In: Edwards, C.A. (Ed.), *Earthworm Ecology*. CRC Press, Boca Raton, USA, 13-49.
- Brunet, J., Repellin, A., Varrault, G., Terryand, N., Zuily-Fodil, Y. (2008). Lead accumulation in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.): a novel plant for phytoremediation systems? *C. R. Biologies* 331, 859–864.
- Butenschoen, O., Marhan, S., Scheu, S. (2008). Response of soil microorganisms and endogeic earthworms to cutting of grassland plants in a laboratory experiment. *Applied Soil Ecology* 38, 152-160.

C

- Canellas, L.P., Olivares, F.L., Okorokova-Facanha A.L. and Facanha, A.R. (2002). Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiology* 130, 1951-1957.
- 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.
- Chen, J.M., Wong, M.H. (2002). Effects of earthworms on Zn fractionation in soils. *Biol. Fertil. Soils* 36, 72-78.
- Christensen, T.H. (1984). Cadmium soil sorption at low concentrations: I. Effect of time, cadmium load, pH and calcium. *Water Air Soil Pollut.* 21, 105-114.
- Conder, J.M., and R.P. Lanno. (2000). Evaluation of surrogate measures of cadmium, lead, and zinc bioavailability to *Eisenia fetida*. *Chemosphere* 41, 1659–1668.
- Conder, J.M., Lanno, R.P., and Basta, N.T. (2001). Assessment of metal availability in smelter soil using earthworms and chemical extractions. *J. Environ. Qual.* 30, 1231–1237.
- Cooper, E.M., Sims, J.T., Cunnigham, S.D., Huang, J.W., Berti, W.R. (1999). Chelate-assisted phytoextraction of lead from contaminated soil. *Journal of Environmental Quality* 28, 1709-1719.
- Crissy, J.T., Lang, H., and Parish, L.C. (1995). *Manual of Medical Mycology*, Blackwell Sciences, Cambridge, MA.
- Cunningham, S.D., and W.R. Berti, and J.W. Huang. (1995). Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotechnol.* 13, 393-397.

D

- Dahllo I.F., Baillie, H., and Kjelleberg, S. (2000). rpoB-Based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3376–3380.
- Dandan, W., Huixin, L., Feng, H., and Xia, W. (2007). Role of earthworm straw interactions on phytoremediation of Cu contaminated soil by ryegrass. *Acta ecologica sinica* 27, 1292-1299.

- Dash, H.K., Beura, B.N., Dash, M.C. (1986). Gut load, transit time, gut microflora and turnover of soil, plant and fungal material by some tropical earthworms. *Pedobiologia* 29, 13-20.
- Dawson, L.A., Grayston, S.J., Murray, P.J., Ross J.M., Reid E.J., and Treonis, A.M. (2004). Impact of *Tipula paludosa* larvae on plant growth and the soil microbial community. *Applied Soil Ecology* 25, 51-61.
- de Abreu, C.A., de Abreu, M.F., Andrade, J.C. (1998). Distribution of lead in the soil profil evaluated by DTPA and Mehlich-3 solution. *Bragantia* 57, 185-882.
- Dechaine, J., Ruan, H. H., Leon, Y. S. D., and Zou, X. M. (2005). Correlation between earthworms and plant litter decomposition in a tropical wet forest of Puerto Rico. *Pedobiologia* 49, 601-607.
- Del val, C., Barea, J.M., Azcon-aguilar, C. (1999). Diversity of Arbuscular Mycorrhizal fungus populations in heavy metal contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 718-723.
- Deneux-Mustin, S., Roussel-Debet, S., Mustin, C., Henner, P., Munier-Lamy, C., Colle, C., Berthelin, J., Garnier-Laplace, J., Leyval, C. (2003). Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces : influence des micro-organismes du sol. TEC & DOC, Paris.
- Deng, S.P., Tabatabai, M.A. (1994). Colorimetric determination of reducing sugar in soils. *Soil Biol. Biochem.* 26, 473-477.
- Depta, B., Koscielniak, A., Rozen, A. (1999). Food selection as a mechanism of heavy metal resistance in earthworms. *Pedobiologia* 43, 608-614.
- Derouard, L., Tondoh, J., Vilcosqui, L. and Lavelle, P. (1996). Effects of earthworm introduction on soil processes and plant growth. *Soil Biol. Biochem.* 29, 541-545.
- Devliegher, W. and Verstraete, W. (1995). *Lumbricus terrestris* in a soil core experiment: effects of nutrient-enrichment processes (NEP) and gut-associated processes (GAP) on the availability of plant nutrients and heavy metals. *Soil Biol. Biochem.* 28, 489-496.
- Devliegher, W. and Verstraete, W. (1997). Microorganisms and soil physico-chemical conditions in the drilosphere of *Lumbricus terrestris*. *Soil Biol. Biochem.* 29, 1721-1729.
- Dias, M.A., Lacerda, I.C.A., Pimentel, P.F., de Castro, H.F., Rosa, C.A. (2002). Removal of heavy metals by an *Aspergillus terreus* strain immobilized in a polyurethane matrix. *Letters in Applied Microbiology* 34, 46-50.

- Díaz-Roviña, M. and Bååth, E. (1996). Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2970-2977.
- Dick, R.P. (1997). Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. In: Pankhurst C.E., Doube B.M., Gupta V.V.S.R (Eds), *Biological Indicators of Health*. CAB International, Wallingford, 121-156.
- Dick, R.P., Breakwill, D., Turco, R. (1996). Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrating biological indicators. In: Doran J.W., Jone A.J. (Eds). *Handbook of Methods for Assessment of Soil Quality*. Soil Science Society America, Madison, 247-272.
- Diep, M.H. (2005). Study of some plants that have a potential of the accumulation Pb and Cd from polluted soils in Vietnam. *Biotechnology Review* 3, 503-508.
- Diep, M.H (2003). Study of some plants that have a potential of the accumulation Pb and Cd from polluted soils in Vietnam. (As review in Vietnam).
- Doelman, P., Haanstra, L. (1979). Effect of lead on soil respiration and dehydrogenase activity. *Soil Biol. Biochem.* 11, 475-479.
- Doelman, P., Jansen, E., Michels, M. and Van Til, M. (1994). Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. *Biol. Fertil. Soils* 17, 177-184.
- Doube, B.M., Buckerfield, J.C., Kirkegaard, J.A. (1994). Short-term effects of tillage and stubble management on earthworm populations in cropping systems in southern New South Wales. *Aust. J. Agric. Res.* 45, 1587–1600.
- Doube, B.M., Schmidt, O., Killham, K., and Correll, R. (1996). Influence of mineral soil on the palatability of organic matter for lumbricid earthworms: A simple food preference study. *Soil Biol. Biochem.* 29, 569-575.

E

- Edwards, C.A. and Bohlen, P.J. (1996). *Biology and ecology of earthworms*. Chapman & Hall, London pp. 426.
- Edwards, C.A. and Fletcher, K.E. (1988). Interactions between earthworms and microorganisms in organic-matter breakdown. *Agric. Ecosyst. Environ.* 24, 235–247.
- Edwards, C.A. and Arancon, N.Q. (2004). Interactions among organic matter, earthworms and microorganisms in promoting plant growth. In: *Functions and Management of*

- Organic Matter in Agroecosystems. Eds. Magdoff, F., and Weil, R. CRC Press, Boca Raton, FL 11, 327-376.
- Edwards, W.M., Shipitalo, M.J., Owens, L.B., Norton, L.D. (1989). Water and nitrate movement in earthworm burrows within long-term no-till cornfield. *J. Soil Water Conserv.* 44, 240-243.
- Edwards, W.M., Shipitalo, M.J., Traina, S.J., Edwards, C.A., Owens, L.B. (1992). Role of *Lumbricus terrestris* burrows on quality of infiltrating water. *Soil Biol. Biochem.* 24, 1555-1561.
- Ekalund, F., Olsson, S., and Johansen, A. (2003). Changes in the succession and diversity of protozoan and microbial populations in soil spiked with a range of copper concentrations. *Soil Biol. Biochem.*, 35, 1507-1516.
- Ellis, R.J., Neish, B., Trett, M.W., George Best, J., Weightman, A.J., Morgan, P., Fry, J.C. (2001). Comparison of microbial and meiofaunal community analyses for determining impact of heavy metal contamination. *Journal of Microbiological Methods* 45, 171–185.
- Epelde, L., Becerril, J.M., Hernandez-Allica, J., Barrutia, O., Garbisu, C. (2008). Functional diversity as indicator of the recovery of soil health derived from *Thlaspi caerulescens* growth and metal phytoextraction. *Applied Soil Ecology* 39, 299-310.

F

- Flore, H.E., Vivanco, J.M., Loyola-Vargas, V.M. (1999). “Radicle” biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends Plant Sci.* 4, 220-226.
- Foy, C.D., Chaney R.L. and White, M.C. (1978). The physiology of metal toxicity in plants, *Rev. Plant Physiol.* 29, 511-566.
- Friedland, A.J. (1990). Movement of metals through soils and ecosystems. In AJ Shaw (Ed.), *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*. CRC Press: Boca Raton, Floride, USA.
- Fritze, H., Perkiömäki, J., Saarela, U., Katainen, R., Tikka, P., Yrjälä, K., Karp, M., Haimi, J., Romantschuk, M. (2000). Effect of Cd-containing wood ash on the microflora of coniferous forest humus. *FEMS Microbiol. Ecol.* 32, 43-51.

G

- Gadd, J.M. (2000). *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. Raskin. I and Ensley. B.D., John Wiley & Sons, Inc, New York, 304.

- Garbisu, C., Alkorta, I. (2001). Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology* 77, 229-236.
- Garnier-Sillam, E., Harry, M. (1995). Distribution of humic compounds in mounds of some soil feeding termite species of tropical rainforests – Its influence on soil structure stability. *Insectes sociaux* 42, 167-185.
- Garnier-Sillam, E., Renoux, J. et Toutain, F. (1989). Les composés humiques des termitières de *Thoracotermes macrothorax* (humivore) et de *Macrotermes mûlleri* (champignoniste). *Soil Biol. Biochem.* 21, 499-505.
- Ghisalberti, E.L. (2000). *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Fitoterapia* 71, 467-486.
- Giller, E., K., Witter, Ernst. and Mcgrath, P.S. (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils. *Soil. Biol. Biochem.* 30, 1389-1414.
- Glick, B.R. (2003). Phytoremediation: Synergistic Use of Plants and Bacteria to Clean Up the Environment. *Biotechnology Advances* 21, 383-393.
- Glick, B.R., Penrose, D.M., and Li, J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* 190, 63–68.
- Gobat, J.M., Aragno, M., Matthey, W. (1998). Le sol vivant – Base de pédologie – Biologie des sols. Presses polytechniques et universitaires romandes. Collection gérer l’environnement, p 14.
- Godin, P. M., Feinberg, M.H. & Ducauze, C.J. (1985). Modelling of soil contamination by airborne lead and cadmium around several emission sources. *Environ. pollut.* 10, 97-114.
- Gosh, G. and Singh, P. (2005). Comparative uptake and phytoextraction study of soil induced chromium by accumulator and high biomass weed species. *Applied Ecology and Environmental Research* 3, 67-79.
- Goss, M.J. (1991). Consequences of the activity of roots on soil. In *Plant root growth: An ecological perspective*. Ed. D. Atkinson, 171-186. Blackwell Scientific Publications, London.
- Grandlic, C.J., Palmer, M.W. and Maier, R.M. (2009). Optimization of plant growth-promoting bacteria-assisted phytostabilization of mine tailings. *Soil Biol. Biochem.* 41, 1734-1740.
- Grayston, S.J., Wang, S., Campbell, C.D., Edwards, A.C. (1998). Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 30, 369-378.

- Gregory, P.J. (2006). Roots, rhizosphere and soil: the route to a better understanding of soil science? *European Journal of Soil Science* 57, 2-12.
- Gutierrez, J.L., Jones, C.G. (2006). Physical ecosystem engineers as agents of biogeochemical heterogeneity. *Bioscience* 56, 227–236.

H

- Haanstra, L. and Doelman, P. (1991). An ecological dose-response model approach to short- and long-term effects of heavy metals on arylsulphatase activity in soil. *Biol. Fert. Soils* 11, 18-23.
- Haimi, J. and Einbork, M. (1992). Effects of endogeic earthworms on soil processes and plant growth in coniferous forest soil. *Biol. Fertil. Soils* 13, 6-10.
- Han, J., Sun, L., Dong, X., Cai, Z., Sun, X., Yang, H., Wang, Y., Song, W. (2005). Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 66-76.
- Hattori, H. (1992). Influence of heavy metals on soil microbial activities. *Soil Sci. Plant Nutr.* 38, 93-100.
- 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. *Canadian Journal of Microbiology* 46, 451–464.
- Hartenstein, R. and Hartenstein, F. (1981). Physico-chemical changes effected in activated sludge by the earthworm *Eisenia fetia*. *J. Environ. Qual.* 10, 377-382.
- Hickman, Z.A. and Reid, B.J. (2008). Earthworm assisted bioremediation of organic contaminants. *Environment International* 34, 1072-1081.
- Hinojosa, M.B., Carreira, J.A., García-Ruíz, R., Dick, R.P. (2005). Microbial response to heavy metal polluted soils. *J. Environ. Qual.*, 34, 1789-1800.
- Hiroki, M. (1992). Effects of heavy metal contamination on soil microbial population. *Soil Sci. Plant Nutr.* 38, 141–147.
- Hirsch, P.R., Jone, M.J., McGrath, S.P., Giller, K.E. (1993). Heavy metals from past applications of sewage sludge decrease the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum bivar trifolii* populations. *Soil Biol. Biochem.* 25, 1485-1490.

- Hongoh, Y., Ohkuma, M. and Kudo, T. (2003). Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). *FEMS Microbiol. Ecol.* 44, 231-242.
- Hopkin, S. P. (1989). *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*, Elsevier Applied Science, London.
- Hrmová, M., Petráková, E., Biely P. (1990). Intuction of cellulose- and xylan-degrading enzyme systems in *Asperillus terreus* by homo- and heterodisaccharides composed of glucose and xylose. *Journal of General Microbiology* 137, 541-547.
- Hu, Q., Dou, M.N., Qi, H.Y., Xie, X.M., Zhuang, G.Q., Yang, M. (2007). Detection, isolation, and identification of cadmium-resistant bacteria based on PCR-DGGE. *Journal of environmental science* 19, 1114-1119.
- Huang, J.W., and Cunningham, S.D. (1996). Lead phytoextraction: Species variation in lead uptake and translocation. *New Phytologists*, 134, 75-84.
- Huang, J.W., Chen, J., Berti, W.R., Cunningham, S.D. (1997). Phytoremediatin of lead contaminated soil: Role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environmental Science and Technology* 31, 800-805.
- Huysman, F.W., Verstraete, W. and Brookes, P.C. (1994). Effect of manuring practices and increased copper concentrations on soil microbial populations. *Soil Biol. Biochem.* 26,103–110.

I

- Insam, H. (2001). Developments in soil microbiology since the mid 1960s. *Geoderma* 100, 389–402.

J

- Jaffre, T., Brooks, R.R., Lee, J., Reeves, R.D. (1976). *Sebertia acumip* A nickel-accumulating plant from New Caledonia. *Science* 193, 579-580.
- Jakobsen, I. and Rosendahl, L. (1990). Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytologist* 115, 77–83.
- Jarvis, M.D. and Leung, D.W.M. (2002). Chelated lead transport in *Pinus radiata*: an ultrastructural study. *Environmental and Experimental Botany* 48, 21-32.

- Jiménez, J.J., Cepeda, A., Decaëns, T., Oberson, A., Friesen, K.D. (2003). Phosphorus fractions and dynamics in surface earthworm casts under native and improved grasslands in a Colombian savanna Oxisol. *Soil Biol. Biochem.* 35, 715–727.
- Jones, C.G., Lawton, J.H. and Shachak, M. (1994). Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* 69, 373-386.
- Joschko, M., Diestel, H. and Larink, O. (1989). Assessment of earthworm burrowing efficiency in compacted soil with a combination of morphological and soil physical measurements. *Biol. Fert. Soils* 8,191- 196.

K

- Kabata-Pendias, A. and Pendias, H. (2001). Trace elements in soils and plants. CRC Press, London.
- Kandeler, E., Gerber, H. (1988). Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil. Soils* 6, 68- 72.
- Kandeler, E., Kampichler, C., and Horak, O. (1996). Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Boil. Fertil. of Soils* 23, 299-309.
- Kärenlampi, S., Schat, H., Vangronsveld, J., Verkleij, J.A.C, Van der Lelie, D., Mergeay, M., and Tervahauta, A.I. (2000). Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils. *Environ. Poll.* 107, 225-231.
- Kelly, J.J., Häggblom, M., Tate III R.L. (1999). Changes in soil microbial communities over time resulting from one time application of zinc: a laboratory microcosm study. *Soil Biol. Biochem.* 31, 1445-1465.
- Kelly, J.J., 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.
- Kersante, A., Martin-Laurent, F., Soulas, G., and Binet, F. (2006). Interactions of earthworms with atrazine-degrading bacteria in an agricultural soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 57, 192–205.
- Khalil, A.M., Abdel-Lateif, M.H., Bayoumi, M., Straalen, M.V.N. (1996). Analysis of separate and combined effects of heavy metals on the growth of *Aporrectodea caliginosa* (Oligochaeta; Annelida), using the toxic unit approach. *Applied Soil Ecology* 4, 213-219.

- Khan, A.G., Kuek, C., Chaudhry, T.M., Khoo, C.S., Hayes, W.J. (2000). Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 41, 197–207.
- Khan, M. and Scullion, J. (2002). Effects of metal (Cd, Cu, Ni, Pb or Zn) enrichment of sewage-sludge on soil micro-organisms and their activities. *Applied Soil Ecology* 20, 145–155.
- Knight, B., McGrath, S., 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., Oliver, L., and Turco, R.F. (1998). The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. *Microbial Ecology* 35, 103–115.
- Konopka, A., Zakharova, T., Bischoff, M., Olivier, L., Nakatsu, C., Turco, R.F. (1999). Microbial biomass and activity in lead-contaminated soil. *Appl. Envir. Microbiol.* 65, 2256-2259.
- Kozdroj, J. and van Elsas, J.D. (2001a). Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *J. Microbiol. Meth.* 43, 197-212.
- Kozdroj, J., and van Elsas, J.D. (2001a). Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *J. Microbiol. Meth.* 43, 197-212.
- Kristufek, V., Ravasz, K., Pizl, V. (1992). Changes in densities of bacteria and microfungi during gut transit in *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* (Oligochaeta: Lumbricidae). *Soil Biol. Biochem.* 24, 1499-1500.
- Krug, J.C., Benny, G.L. and Keller, H.W. (2004). Coprophilous fungi. In: G.M. Mueller, G.F. Bills and M.S. Foster, Editors, *Biodiversity of fungi: Inventory and Monitoring Methods*, Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 467-499.
- Kuffner, M., Puschenreiter, M., Wieshammer, G., Gorfer, M., and Sessitsch, A. (2008). Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant and Soil* 304, 35-44.
- Kumar, P., Dushenkob, V., Motto, H., Raskin, I. (1995). Phytoextraction: The use of plant to remove heavy metals from soils. *Environmental Science and Technology* 29, 1232-1238.

Kuperman, R.G., Carreiro, M.M. (1997). Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. *Soil Biol. Biochem.* 29, 179-190.

L

Lamy, I. (2002). Réactivité des matières organiques des sols vis-à-vis des métaux. Journées nationales de l'étude des sols. p 22.

Landi, L., Renella, G., Moreno, J.L., Falchini, L., 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.

Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA Sequencing. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, New York, 115–175.

Lanno, R.P. and Mc Carty, L.S. (1997). Earthworm bioassays: Adopting techniques from aquatic toxicity testing. *Soil Biol. Biochem.* 5, 693-697.

Lavelle, P. (1978). Les vers de terre de la savane de Lamto (Côte d'Ivoire): peuplements, populations et fonctions dans l'écosystème. Thèse d'état, Laboratoire de zoologie de l'ENS, Paris 6, Paris.

Lavelle, P. (1981). Stratégies de reproduction chez les vers de terre, *Acta Oecologia. Oecologia Generalis* 2, 117-133.

Lavelle, P. (1996). Diversity of soil fauna and soil function. *Biol. Intern.* 33, 3-16.

Lavelle, P. and Gilot, C. (1994). Priming effects of macroorganisms on microflora: A key process of soil function? In: *Beyond the Biomass* (eds. K. Ritz, J. Dighton and K. Giller), 176–181.

Lavelle, P. (1988). Earthworms and the soil system, *Biol. Ferti. Soils* 6, 237–251.

Lavelle, P. and Spain, A.V. (2001). *Soil Ecology* Kluwer Scientific Publications, Amsterdam.

Lavelle, P., Barois, I., Cruz, I., Fragoso, C., Hernandez, A., Pineda, A., Rangel, P. (1987). Adaptive strategies of *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta) a peregrine geophagous earthworm of the humid tropics. *Biol. Fertil. Soils* 5, 188–194.

- Lavelle, P., Bignell, D., Lepage, M., Wolters, V., Roger, P., Ineson, P., Heal, O.W., Ghillion, S. (1997). Soil function in a changing world: The role of invertebrate ecosystem engineers. *Eur. J. Soil Biol.* 33, 159–193.
- Lavelle, P., Lattaud, C., Trigo, D., Barois, I. (1995). Mutualism and biodiversity in soils. In: *The significance and Regulation of Soil Biodiversity*. Collins H.P., Robertson G.P.H., Klug M.J. (Eds.). The Netherlands, pp. 23–33.
- Lavelle, P., Pashanasi, B., Charpentier, F., Gilot, C., Rossi, J.P., Derouard, L., Andre, J., Ponge, J.F., Bernier, N. (1998). Large-scale effects of earthworms on soil organic matter and nutrient dynamics, in: Edwards C.A. (Ed.), *Earthworm Ecology*, St. Lucie Press, Boca Raton, USA, 103–122.
- Lawton, J. H. (1994). What do species do in ecosystems. *Oikos* 71, 367-374.
- Le, V.K., Nguyen, X.C., Le, D., Tran, K.T., Tran, C.V. (2000). *Dat va moi truong*. Nha xuất bản Giao duc, Thanh pho HCM.
- Lee, K.E. (1983). Soil animals and pedological processes. *Div. Soils*. London, CSRO, 630-643.
- Lee, K.E. (1985). *Earthworms, their ecology and relationships with soils and land use*. Academic Press, New York, p. 411.
- 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.
- Li, L.Y. and Li, R.S. (2000). The role of clay minerals and effect of H⁺ ions on removal of heavy metal (Pb²⁺) from contaminated soil. *Can. J. Geotech/Rev.* 37, 296-307.
- Li, Y.T, Rouland, C., Benedetti, M., Li, F.B., Pando, A., Lavelle, P., 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.* 1-9.
- 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, 231–9.
- Lombi, E., Zhao, F.J., Dunham, S.J. and MacGrath, S.P. (2001a). Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: Natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. *Journal of Environmental Quality*, 30, 1919-1926.
- Lombi, E., Zhao, F.J., Dunham, S.J. and MacGrath, S.P. (2001b). Cadmium accumulation in population of *Thlaspi caerulescens* and *Thlapi geosingense*. *New Phytologist*, 145, 11-20.

Loué, A. (1993). Oligo-éléments en agriculture. Ed. Nathan (ed), 45-177.

Luo, C.L., Shen, Z.G., Li, X.D., Baker, A.J.M. (2006). Enhanced phytoextraction of Pb and the other metals from artificially contaminated soils through the combined application of EDTA and EDDS. *Chemosphere*, 63, 1773-1784.

M

Ma, Y., Dickinson, N.M., Wong, M.H. (2002). Toxicity of Pb/Zn mine tailings to the earthworm *Pheretima* and the effects of burrowing on the metal availability. *Biol. Fertil. Soils* 36, 79-86.

Ma, Y., Rajkumar, M. and Freitas, H. (2009). Isolation and characterization of Ni mobilizing PGPB from serpentine soils and their potential in promoting plant growth and Ni accumulation by *Brassica* spp. *Chemosphere* 75, 719-725.

MacNaughton, S.J., Stephen, J.R., Venosa, A.D., Davis, G.A., Chang, Y.J. and White, D.C. (1999). Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill, *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3566–3574.

Martin, A., Cortez, J., Barois, I., and Lavelle, P. (1987). Les mucus intestinaux de Ver de terre moteur de leurs interactions avec la microflore. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol* 24, 549–558.

Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J. C., Soulas G. and Catroux, G. (2001). DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2354-2359.

McGrath, S.P. (1998). Phytoextraction for soil remediation. In R.R. Brooks (ed.) *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. CAB Int., Wallingford, UK, 261-287.

McGrath, S.P., Zhao, F.J. (2003). Phytoextraction of metals and metalloid from contaminated soils. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 277-282.

Mertens, J., Springael, D., De Troyer, I., Cheyns, K., Wattiau, P., Smolders, E. (2006). Long-term exposure to elevated zinc concentrations induced structural changes and zinc tolerance of the nitrifying community in soil. *Environmental microbiology* 8, 2170-2178.

Meyers, D.E.R., Auchterlonie, G.J., Webb, R.I., Wood, B. (2008). Uptake and localisation of lead in the root system of *Brassica juncea*. *Environmental Pollution* 153, 323-332.

- Moffett, B.F., Nicholson, F.A., Uwakwe, N.C., Chambers, B.J., Harris, J.A., Hill, T.C.J. (2003). Zinc contamination decreases the bacterial diversity of agricultural soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43, 13-19.
- Mondini, C. and Insam, H. (2005). Effect of inoculums standardization on community level physiological profiles of compost samples. *Compost Sci Util* 13, 27-33.
- Moody, S.A., Pierce, T.G, Dighton, J. (1996). Fate of some fungal spores associated with wheat straw decomposition on passage through the guts of *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea longa*. *Soil Bio. Biochem.* 27, 1209-1213.
- Mora, P., Miambi, E., Jiménez, J.J., Decaëns, T., Rouland, C. (2005). Physico-chemical typology of the biogenic structures of termites and earthworms: a comparative analysis. *Biol. Fertil. Soils* 37, 245–249.
- Mora, P., Seugé, C., Chotte, J.L., Rouland, C., (2003). Physico-chemical typology of the biogenic structures of termites and earthworms: a comparative analysis. *Biol. Fertil. Soils* 37, 245–249.
- Moran, M.A., Torsvik, V.L., Torsvik, T. and Hodson, R.E. (1993). Direct extraction and purification of rRNA for ecological studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 915–918.
- Morgan, J.E. and Morgan, A.J. (1999). The accumulation of metals (Cd, Cu, Pb, Zn and Ca) by two ecologically contrasting earthworm species (*Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa*): implications for ecotoxicological testing. *Applied Soil Ecology* 13, 9-20.
- Morgan, J.E., Morgan, A.J. (1999). The accumulation of metals (Cd, Cu, Pb, Zn and Ca) by two ecologically contrasting earthworm species (*Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa*): implications for ecotoxicological testing. *Applied Soil Ecology* 13, 9-20.
- Morlot, M. (1996). Aspects analytiques du plomb dans l'environnement, Ed Lavoisier TEC&DOC.
- Müller, F. (1857). *Lumbricus corethrurus*, *Archiv für Naturgeschichte* 23, 113–116.
- Mulligan, C.N., Yong, R.N. and Gibbs, B.F. (2001). Remediation technologies for metalcontaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology*, 60, 193-207.
- Muyzer, G., de Waal E.C. and Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.

N

- Naidu, R., Bolan, N.S., Kookana, R.S., Tiller, K.G. (1994). Ionic strength and pH effects on the sorption of cadmium and the surface charge of soils. *Eur. J. Soil Sci.* 45, 419–429.
- Nannipieri, P., Sastre, I., Landi, L., Lobo, M.C., Pietramellara, G. (1995). Determination of extracellular neutral phosphomonoesterase activity in soil. *Soil Biol. Biochem.* 28, 107–112.
- Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* 153, 375–381.

O

- Orłowska, E., Zubek, Sz., Jurkiewicz, A., Szarek-Łukaszewska, G., Turnau, K. (2002). Influence of restoration on arbuscular mycorrhiza of *Biscutella laevigata* L. (Brassicaceae) and *Plantago lanceolata* L. (Plantaginaceae) from calamine spoil mounds. *Mycorrhiza* 12, 153–160.
- Ortiz-Ceballos, A.I., Peña-Cabriaes, J.J., Fragoso C., and Brown, G.G. (2007). Mycorrhizal colonization and nitrogen uptake by maize: combined effect of tropical earthworms and velvetbean mulch. *Biol. Fertil. Soils* 44, 181–186.
- Oste, L.A., Dolfing, J., Ma, W.C., Lexmond, T.M. (2001). Cadmium uptake by earthworms as related to the availability in the soil and the intestine. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 1785–1791.

P

- Parle, J.N. (1963a). Microorganisms in the intestines of earthworms. *Journal of General Microbiology* 31, 1–11.
- Parle, J.N. (196b). A microbiological study of earthworm casts. *J. Gen. Microbiol.* 31, 13–22.
- Paulose, B., Datta, S.P., Rattan, R.K., Chhonkar, P.K. (2006). Effect of amendments on the extractability, retention and plant uptake of metals on a sewage-irrigated soil. *Environ. Pollut.* 146, 19–24.
- Pawlett, M., Hopkins, D.W., Moffett, B.F, Harris, J.A. (2009). The effect of earthworms and liming on soil microbial communities. *Biol. Fertil. Soils* 45, 361–369.
- Pizl, V., Josens, G. (1995) Earthworm communities along a gradient of urbanization. *Environmental Pollution* 90, 7–14.

- Ponge, J.F. (1988). Etude écologique d'un humus forestier par l'observation d'un petit volume. III. La couche F1 d'un moder sous *Pinus sylvestris*. *Pedobiologia* 31, 1-64.
- Porteus, L.A., Seidler, R.J., Watrud, L.S. (1997). An improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications. *Mol. Ecol.* 6, 787-791.
- Powlson D.S., Hirsch P.R., Brookes P.C. (2000). The role of soil organisms in soil organic matter conservation in the tropic. *Nutrient cycling in Agrosystems* 61, 41-51.
- Prabha, K. Padmavathiamma and Loretta, Y. Li. (2007). Phytoremediation Technology: Hyper-accumulation Metals in Plants. *Water Air Soil Pollut.* 184, 105–126.
- Preston-Mafham, J., Boddy, L., Randerson, P.F. (2002). Analysis of microbial community functional diversity using sole carbon source utilization profiles a critique. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42, 1-12.

R

- Ranjard, L., Poly, F., Nazaret, S. (2000). Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Res. Microbiol.* 151, 167–177.
- Raskin, I. and Ensley, B.D. (2000). *Phytoremediation of toxic metals; using plants to clean up the environment.* John Wiley and Sons, New York.
- Raskin, I., Ensley, B.D., Salt, D.E. (1997). Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology* 8, 221-226.
- Raskin, I., Kumar, N.P.B.A, Dushenkov, S., Salt, D.E. (1994). Bioconcentration of heavy metal by plant. *Current Opinion in biotechnology* 5, 285-290.
- Rasmussent, L.D., Sørensen, S.J. (2001). Effects of mercury contamination on the culturable heterotropic, functional and genetic diversity of the bacterial community in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36, 1-9.
- Reeves, R.D., Brooks, R.R. (1983). Hyperaccumulation of lead and zinc by two metallophytes from a mining area of Central Europe. *Environmental Pollution Series* 31, 277-287.
- Renella, G., Mench, M., van der Lelie, D., Pietramellara, G., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Nannipieri, P. (2003). Hydrolase activity, microbial biomass and community structure in long-term Cd-contaminated soils. *Soil Biol. Biochem.* 36, 443-451.
- Robe, P., Nalin, R., Capellano, C., Vogel, T.M. (2003). Extraction of DNA from soil. *Eur. J. Soil Biol.* 39, 183-190.

- 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.
- Robert, M. and Juste, C. (1999). Dynamique des éléments traces de l'écosystème sol. In Club CRIN Environnement et Ministère de l'environnement. Spéciation des métaux dans le sol. Paris: CRIN.
- Robinson, B.H., Brooks, R.R., Howes, A.W., Kirkman, J.H., Gregg, P.E.H. (1997). The potential of the high-biomass nickel hyperaccumulator *Berkheya coddii* for phytoremediation and phytomining. Journal of Geochemical Exploration 60, 115-126.
- Rouland, C. (1986). Contribution à l'étude des osidases digestives de plusieurs espèces de Termites africains. Thèse Université Paris VI.
- Rufus, L.C., Minnie, M., Yin, M.L., Sally, L.B., Eric P.B., Scott-Angle J., and Alan, J.M.B. (1997). Phytoremediation of soil metals. Current Opinion in Biotechnology 8, 279-284.

S

- Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, N.P.B.A, Dushenkov, S., Ensley, B.D., Chet, I., Raskin, I. (1995). Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. Biotechnology 5, 285-290.
- Salt, D.E., Smith, R.D. and Raskin, I. (1998). Phytoremediation. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49, 643-68.
- Sandaa, R.A., Torsvik, V., Enger, Ø., Daae, F.L., Castberg, T., Hahn, D. (1999). Analysis of bacterial communities in heavy metal contaminated soils at different levels of resolution. FEMS Microbiol. Eco. 30, 237-251.
- Sandaa, R.A., Torsvik, V. and Enger, Ø. (2001). Influence of long-term heavy metal contaminations on microbial communities in soil. Soil Biol. Biochem. 33, 287-295.
- Sanders, J.R. (1983). The effect of pH on the total and free ionic concentrations of manganese, zinc and cobalt in soil solutions. J. Soil Sci. 34, 315-323.
- Sanders, J.R., McGrath, S.P., and Adams, T.M. (1986). Zinc, copper and nickel concentrations in ryegrass grown on sewage sludge-contaminated soils of different pH. J. Sci. Food Agr. 37, 961-968.
- Sandhu, G.S., Kline, B.C., Stockman, L., Roberts, G.D. (1995). Molecular probes for the diagnosis of fungal infections. J Clin Microbiol 33, 2913-2919.

- Satchell, J.E. (1983). Earthworm microbiology. In: Satchell, J.E. (Ed.), Earthworm ecology from Darwin to Vermiculture. Chapman and Hall, London, 351-364.
- Scheu, S. (1987). The role of substrate feeding earthworms (Lumbricidae) for bioturbation in a beechwood soil. *Oecologia* 72, 192-196.
- Scheu, S., Schlitt, N., Tiunov, A.V., Newington J.E., Jones, T.H. (2002). Effects of the presence and community composition of earthworms on microbial community functioning. *Oecologia* 133, 254–260.
- Schnüner J., Rosswall T. (1982). Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 1256-1261.
- Shah, K. and Nongkynrih, J.M. (2007). Metal hyperaccumulation and bioremediation. *Biologia Plantarum* 51, 618-634.
- Shaw, C. and Pawluk, S. (1986). The development of soil structure by *Octolasion tyrtaeum*, *Aporrectodea turgida* and *Lumbricus terrestris* in parent materials belonging to different textural classes. *Pedobiologia* 29, 327–339.
- Sheffield, V.C., Beck, J.S., Stone, E.M. and Myers, R.M. (1992). A simple and efficient method for attachment of a 40base pair, GC rich sequence to PCR amplified DNA. *BioTechniques* 12, 386–387.
- Shen, Z.G., Zhao, F.J., McGrath, S.P. (1997). Uptake and transport of zinc in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and the non-hyperaccumulator *Thlaspi ochroleucum*. *Plant, Cell and Environment* 20, 898-906.
- Sims, R.W., Gerard, B.M. (1985). Earthworm. Keys and notes for identification and study on the species. Brill and Backhuys, London.
- Singh, O. V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R., and Jain R. K. (2003). Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 405-412.
- Singh, O.V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R., and Jain, R.K. (2003). Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 405-412.
- 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.
- Smith, E., Leeflang, P., and Wernars, K. (1997). Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23, 249-261.

- Söderberg, K.H., Probanza, A., Jumpponen, A., Bååth E. (2004). The microbial community in the rhizosphere determined by community-level physiological profiles (CLPP) and direct soil- and cfu-PLFA techniques. *Applied Soil Ecology* 25, 135–145.
- Somogyi, M. (1945). A new reagent for the determination of sugar. *Journal of Biological Chemistry* 160, 61-68.
- Springette, J.A. and Syers, J.K. (1979). The effect of earthworm casts on ryegrass seedlings. In: T.K. Crosby and R.P. Pottinger, Editors, *Proceedings of the 2nd Australasian Conference on Grassland Invertebrates Ecology*, Government Printer, Wellington 44-47.
- Spurgeon, D. J., Hopkin, S. P. (1996). The effects of metal contamination on earthworm populations around a smelting works: quantifying species effects. *Applied Soil Ecology* 4, 147–160.
- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P. (1999). Tolerance to zinc in populations of the earthworm *Lumbricus rubellus* from uncontaminated and metal-contaminated ecosystems. *Arch Environ Contam Toxicol* 37, 332–337.
- Spurgeon, D.J., Svendsen, C., Rimmer V.R., Hopkin S.P., and Weeks J.M. (2000). Relative sensitivity of life-cycle and biomarker responses in four earthworm species exposed to zinc. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 1800–1808.
- Stefanowicz, A. (2006). The Biolog plates technique as a tool in ecological studies of microbial communities. *Polish J. of Environ. Stud.* 15, 669-676.
- Stenstrom, J., Svensson, K., Johansson, M. (2001). Reversible transition between active and dormant microbial states in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36, 93–104.
- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., Fourier, H. (2000). Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. *Environmental Pollution* 107, 377-389.
- Stork, N.E. and Eggleton, P. (1992). Invertebrates as determinants and indicators of soil quality. *American Journal of Alternative Agriculture* 7, 38-47.
- Suzuki, M.T. and Giovannoni, S.J. (1993). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 625–630.

T

- Tabatabai, M.A. (1982). Soil enzymes. In: Page, A.L., Miller, E.M., Keeney, D.R. (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties*. American Society of Agronomy, Madison, pp 903–947.
- Tandy, S., Schulin, R., Nowack, B. (2006). The influence of EDDS on the uptake of heavy metals in hydroponically grown sunflowers. *Chemosphere* 62, 1454-1463.
- Tapia-Coral, C., Luizão j. Flávio S., Eleusa, B., Beto P., and Dennis Del, C. (2006). Effect of *Pontoscolex corethrurus* Muller, 1857 (Oligochaeta: Glossoscolecidae) Inoculation on litter weight loss and soil nitrogen in mesocosms in the peruvian amazon. *Caribbean Journal of Science* 42, 410-418.
- Teotia, S.P., Duley F.L., McCalla, T.M. (1950). Effect of stubble mulching on number and activity of earthworms. University of Nebraska College of Agriculture. Agricultural Experiment Station Research Bulletin 165. Lincoln, NE.
- Tiunov, A.V. and Dobrovolskaya, T.G. (2002). Fungal and bacterial communities in *Lumbricus terrestris* burrow walls: a laboratory experiment. *Pedobiologia* 46, 595–605.
- Tiunov, A.V., Bonkonwski, M., Alpei, J., and Sheu, S. (2001a). Microflora, protozoa and Nematoda in *Lumbricus terrestris* burrow walls: a laboratory experiment. *Pedobiologia* 45, 46-60.
- Tiunov, A.V., Dobrovolskaya, T. G., Polyanskaya, L. M. (2001b). Microbial complexes associated with inhabited and abandoned burrows of *Lumbricus terrestris* earthworm in soddypodzolic soil. *Eurasian Soil Science* 34, 525–529.
- Tiunov, A.V., Scheu, S. (2000). Microfungal communities in soil, litter and casts of *Lumbricus terrestris* L. (Lumbricidae): a laboratory experiment. *Applied Soil Ecology* 14, 17–26.
- Tiunov, A.V., Scheu, S. (1999). Microbial respiration, biomass, biovolume and nutrient status in burrow walls of *Lumbricus terrestris* L. (Lumbricidae). *Soil Biol. Biochem.* 31, 2039–2048.
- Tiwari, S.C., Tiwari, B.K., Mishra, R.R. (1989). Microbial populations, enzyme activities and nitrogen-phosphorus-potassium enrichment in earthworm casts and in the surrounding soil of a pineapple plantation. *Biol. Fertil. Soils* 8, 178-182.
- Tomlin, A.D., M.J. Shipitalo, W.M. Edwards, and R. Protz. (1995). Earthworms and their influence on soil structure and infiltration. In P.F. Hendrix (ed.) *Earthworm ecology and biogeography in North America*. Lewis Publ., Boca Raton, FL., 159–183.

Torsvik, V., and Øvraås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 240-245.

Turpeinen, R., Kairesalo, T., Häggblom, M.M. (2004). Microbial community structure and activity in arsenic, chromium and copper contaminated soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47, 39-50.

V

Van Hoof, P. (1983). Earthworm activity as a cause of splash erosion in a Luxembourg forest. *Geoderma* 31, 195-204.

Vyas, N., Dua, K., Prakash, S. (2007). Efficacy of *Lagenidium giganteum* metabolites on mosquito larvae with reference to nontarget organisms. *Parasitol Res.* 101, 385-390.

W

Wang, D., Li, H. (2006). Effect of earthworms on the phytoremediation of zinc-polluted soil by ryegrass and Indian mustard. *Biol. Fertil. Soils* 43, 120-123.

Wang, Q. R., Cui, Y. S., Liu, X. M., Dong, Y. T., Christie, P. (2003). Soil contamination and plant uptake of heavy metals at polluted sites in China. *J. Environ. Sci. Health Part A-Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.* 38, 823-838.

Wang, Y.K., Samos, C.H., Peoples, R., Perez-Jurado, L.A., Nusse, R. and Francke, U. (1997). A novel human homologue of the *Drosophila frizzled* wnt receptor gene binds wingless protein and is in the Williams syndrome deletion at 7q11.23. *Hum. Mol. Genet.* 6, 465-472.

Wardle, D.A., and Giller. K.E. (1996). The quest for a contemporary ecological dimension to soil biology. *Soil Biol. Biochem.* 28, 1549–1554.

Welke, S.E., Parkinson, D. (2003). Effect of *Aporrectodea trapezoides* activity on seedling growth of *Pseudotsuga menziesii*, nutrient dynamics and microbial activity in different forest soils. *Forest Ecol. Manage.* 173, 169-186.

Weltj, L. (1998). Mixture toxicity and tissue interactions of Cd, Cu, Pb and Zn in earthworms (Oligochaete) in laboratory and field soils: a critical evaluation of data. *Chemosphere* 36, 2643-2660.

Wen, B., Hu, X., Liu, Y., Wang, W., Feng, M.U., Shan, X. (2004). The role of earthworms (*Eisenia fetida*) in influencing bioavailability of heavy metals in soils. *Biol. Fert. Soils* 40, 181–187.

- Wenzel, W.W. (2009). Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant and Soil*, 385-408.
- White, C., Sharman, A.K., Gadd, G.M. (1998). An integrated microbial process for the bioremediation of soil contaminated with toxic metals. *Nat. Biotechnol.* 16, 572-575.
- White, P.J., and Broadley, M.R. (2003) Calcium in plants. *Ann. Bot.* 92, 487–511.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 315–322. Academic Press, San Diego.
- Whiting, S., Desouza, M., and Terry, N. (2001). Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. *Environ. Sci. Technol.* 35, 3144-3150.
- Wintzingerode, F.V., Gobel, U.B., Stackebrandt, E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* 21, 213–229.
- Withman, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6578-6583.

Y

- Yu, X., Cheng, J., Wong, M.H., (2005). Earthworm-mycorrhiza interaction on Cd uptake and growth of ryegrass. *Soil Biol. Biochem.* 37, 195-201.
- Yu, X.Z., Cheng, J.M., 2003. Effect of earthworm on bioavailability of Cu and Cd in soils (in Chinese). *Acta Ecologica Sinica* 23, 922–928.

Z

- 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, 1001-1008.
- Zhang, H. and Schrader, S. (1993). Earthworm effects on selected physical and chemical properties of soil aggregates, *Biol. Fertil. Soils* 15, 229–234.
- Zhao, F.J., Lombi, E., Breedon, T., McGrath, S.P. (2000). Zinc hyperaccumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell Environ* 23, 507-514.
- Zheng, D., Alm, E.W., Stahl, D.A. and Raskin, L. (1996). Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes for quantitative molecular microbial ecology studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4504–4513.

ANNEXES

Annexe 1 : Tableau de McCrady

Nombre de tubes +3/ tubes				Intervalles de confiance à 95%	
0,1 g	0,01g	0,001g	NPP/g	Inférieur	Supérieur
0	0	0	< 3	-	-
0	1	0	3	< 1	17
1	0	0	4	< 1	21
1	0	1	7	2	27
1	1	0	7	2	28
1	2	0	11	4	35
2	0	0	9	2	38
2	0	1	14	5	48
2	1	0	15	5	50
2	1	1	20	7	50
2	2	0	21	8	62
3	0	0	23	9	130
3	0	1	39	10	180
3	1	0	43	10	210
3	1	1	75	20	280
3	2	0	93	30	380
3	2	1	150	50	500
3	2	2	210	80	640
3	3	0	240	90	1400
3	3	1	460	100	2400
3	3	2	1100	300	4800
3	3	3	>1100		

Annexe 2 : Liste de morphologies fongiques cultivables obtenues par le milieu culture (1)

SOUCHE	Forme	Couleur	Symbole
1	Circulaire Bombée Dentelé	Blanc/Blanc étoilée	CBD B/B étoilée
2	Circulaire Bombée Régulier	Blanc/Marron strilée	CBR B/M strilée
3	Circulaire Convexe Dentelé	Blanc neige-Blanc louche/Blanc	CCD B/B
4	Circulaire Convexe Régulier	Blanc-Jaune/Jaune-Maron	CCR B-J/J-M
5	Circulaire Convexe Régulier	Blanc/Blanc	CCR B/B
6	Circulaire Convexe Régulier	Jaune-Vert-Marron/Noir	CCR J-V-M/N
7	Circulaire Convexe Régulier	Jaune claire complète	CCR Jclaire
8	Circulaire Convexe Régulier	Blanc/Jaune-Marron	CCR B/J-M
9	Circulaire Convexe Régulier	Blanc/Marron point marron	CCR B/M point
10	Circulaire Elève Dentelé	Jaune-Marron/Noir	CED J-M/N
11	Circulaire Elève Dentelé	Rosé	CED Rosé
12	Circulaire Elève Filamenteux	Blanc neige- Blanc louche/Blanc	CEF B/B
13	Circulaire Elève Filamenteux	Blanc/Jaune claire	CEF B/Jclaire
14	Circulaire Elève Filamenteux	Blanc-Vert-Verdâtre	CEF B-V-Ve
15	Circulaire Elève Lobé	Blanc (poils)/Blanc	CEL B/B
16	Circulaire Elève Régulier	Jaune-Blanc/Jaune	CER J-B/J
17	Circulaire Elève Régulier	Blanc/Jaune (point blanc)	CER B/J (point blanc)
18	Circulaire Elève Régulier	Blanc/Marron (point blanc)	CER B/M point blanc
19	Circulaire Elève Régulier	Blanc/Blanc strilée	CER B/Bs
20	Circulaire Elève Régulier	Blanc/Blanc étoilée	CER B/Bé
21	Circulaire Elève Régulier	Blanc/Blanc disque	CER B/Bd
22	Circulaire Elève Régulier	Blanc/Jaune	CER B/J
23	Circulaire Elève Régulier	Blanc/Jaune point blanc	CER B/J point blanc
24	Circulaire Elève Régulier	Blanc/Jaune point marron	CER B/J point marron
25	Circulaire Elève Régulier	4 cycles Blanc/Vert/Jaune/Blanc	CER B/V/J/B

Annexe 2 : Liste de morphologies fongiques cultivables obtenues par le milieu culture (2)

SOUCHE	Forme	Couleur	Symbole
26	Circulaire Elève Régulier	Blanc/point Jaune claire	CER B/point jaune claire
27	Circulaire Elève Régulier	Blanc-Jaune/Marron	CER B-J/M
28	Circulaire Elève Régulier	Violet/Marron	CER Vi/M
29	Circulaire Elève Régulier	Blanc-Jaune-Marron/Marron	CER B-J-M/M
30	Circulaire Elève Régulier	Jaune claire cycle - Blanc neige/Jaune (particulière)	CER Jc/Bn (particulière surface)
31	Circulaire Elève Régulier	Blanc (point noir au milieu)/Blanc	CER B(point noir)/Blanc
32	Circulaire Elève Régulier	Blanc-Rosé/Rosé-Rouge	CER B-R/R-Rouge
33	Circulaire Elève Régulier	Vert/Jaune-Marron	CER V/J-M
34	Circulaire Elève Régulier	Rosé-Blanc/Jaune foncé	CER Ro-B/Jf
35	Circulaire Elève Régulier	Blanc-Vert-Blanc-Vert	CER B-V-B-V
36	Circulaire Plane Dentelé	Marron par le grain/Jaune foncé	CPR M(grain)/Jaune foncé
37	Circulaire Plane Filamenteux	Blanc/Blanc	CPR B/B
38	Filamenteuse Elève Filamenteux	Blanc/Blanc (poils blanc)	FEF B/B (poils blanc)
39	Filamenteuse Elève Filamenteux	Blanc/Blanc (points noir)	FEF B/B (point noir)
40	Punctiforme Bombé Régulier	Blanc/Blanc étoilée	PBR B/B étoilée
41	Punctiforme Convexe Régulier	Blanc neige/Blanc	PCR Bneige/B

Annexe 3 : Les résultats de l'OD des plaques GN2 Biolog des différents agrégats racinaires.

GN2	Puits	OD	Puits	OD	Puits	OD	Puits	OD	Puits	OD	Puits	OD	Puits	OD	Puits	OD
AgP/ SP/ Pb+	A1	-	B1	0,36	C1	0,78	D1	0,13	E1	2,09	F1	0,69	G1	1,50	H1	0,97
	A2	0,07	B2	2,04	C2	0,17	D2	1,89	E2	1,09	F2	0,14	G2	2,07	H2	-0,02
	A3	0,65	B3	1,62	C3	0,73	D3	1,47	E3	-0,01	F3	0,67	G3	1,21	H3	0,00
	A4	0,04	B4	2,13	C4	0,60	D4	-0,05	E4	1,66	F4	0,02	G4	1,19	H4	-0,02
	A5	2,00	B5	0,59	C5	0,55	D5	1,86	E5	0,49	F5	1,00	G5	2,26	H5	1,30
	A6	1,49	B6	1,82	C6	2,33	D6	1,68	E6	1,60	F6	1,62	G6	2,39	H6	1,37
	A7	0,02	B7	2,20	C7	2,14	D7	1,74	E7	0,65	F7	0,46	G7	2,19	H7	1,80
	A8	2,08	B8	0,98	C8	0,82	D8	2,27	E8	0,41	F8	1,84	G8	-0,02	H8	0,00
	A9	2,17	B9	0,57	C9	0,83	D9	1,92	E9	2,08	F9	1,82	G9	0,45	H9	1,28
	A10	0,22	B10	0,73	C10	1,43	D10	-0,03	E10	1,72	F10	2,04	G10	1,25	H10	1,07
	A11	2,31	B11	2,34	C11	1,23	D11	2,05	E11	2,14	F11	0,02	G11	1,47	H11	0,07
	A12	0,41	B12	2,27	C12	0,61	D12	0,15	E12	1,10	F12	0,09	G12	2,47	H12	1,39
AgP/ SPV/ Pb+	A1	-	B1	0,31	C1	1,43	D1	0,30	E1	2,10	F1	0,89	G1	1,45	H1	1,68
	A2	1,42	B2	2,24	C2	2,14	D2	1,92	E2	1,07	F2	0,42	G2	1,89	H2	1,67
	A3	1,89	B3	2,35	C3	0,23	D3	1,62	E3	0,26	F3	0,96	G3	2,27	H3	0,12
	A4	0,63	B4	2,30	C4	0,69	D4	0,01	E4	2,10	F4	0,19	G4	1,59	H4	1,39
	A5	2,12	B5	1,37	C5	2,32	D5	1,98	E5	0,98	F5	1,90	G5	2,35	H5	2,15
	A6	1,72	B6	2,06	C6	2,35	D6	1,97	E6	1,83	F6	2,03	G6	2,35	H6	1,45
	A7	1,02	B7	2,30	C7	2,23	D7	1,95	E7	0,98	F7	0,68	G7	2,35	H7	1,75
	A8	2,09	B8	1,29	C8	2,38	D8	2,30	E8	0,99	F8	2,27	G8	-0,04	H8	0,03
	A9	2,30	B9	2,02	C9	1,14	D9	2,08	E9	2,20	F9	2,19	G9	0,86	H9	1,75
	A10	0,13	B10	2,19	C10	2,31	D10	-0,02	E10	1,86	F10	2,25	G10	2,01	H10	1,24
	A11	2,48	B11	2,58	C11	1,92	D11	2,19	E11	2,49	F11	0,03	G11	1,45	H11	1,50
	A12	2,46	B12	2,56	C12	1,13	D12	0,12	E12	1,45	F12	0,07	G12	2,42	H12	1,75
AgP/ SP/ Pb++	A1	-	B1	0,47	C1	0,86	D1	0,13	E1	1,92	F1	0,68	G1	1,43	H1	0,92
	A2	0,08	B2	2,09	C2	0,29	D2	1,97	E2	1,26	F2	0,15	G2	2,04	H2	0,00
	A3	0,69	B3	2,05	C3	0,97	D3	1,59	E3	0,01	F3	0,70	G3	1,25	H3	0,05
	A4	0,03	B4	2,40	C4	0,75	D4	-0,03	E4	1,82	F4	0,05	G4	1,20	H4	0,01
	A5	2,32	B5	0,93	C5	0,62	D5	2,00	E5	0,51	F5	1,08	G5	2,25	H5	1,27
	A6	1,79	B6	2,07	C6	2,79	D6	1,77	E6	1,68	F6	1,78	G6	2,40	H6	1,37
	A7	0,06	B7	2,47	C7	2,49	D7	1,90	E7	0,71	F7	0,49	G7	2,20	H7	1,97
	A8	2,49	B8	1,27	C8	1,27	D8	2,45	E8	0,43	F8	1,87	G8	0,00	H8	0,01
	A9	2,44	B9	0,72	C9	1,30	D9	2,02	E9	2,01	F9	1,88	G9	0,44	H9	1,60
	A10	0,27	B10	0,99	C10	1,68	D10	0,00	E10	1,76	F10	2,05	G10	1,50	H10	1,14
	A11	2,63	B11	2,73	C11	1,41	D11	2,16	E11	2,35	F11	0,04	G11	1,42	H11	0,08
	A12	0,51	B12	2,66	C12	0,54	D12	0,06	E12	1,22	F12	0,10	G12	2,46	H12	1,36
AgP/ SPV/ Pb++	A1	-	B1	0,28	C1	1,90	D1	1,13	E1	1,87	F1	1,20	G1	2,23	H1	2,30
	A2	1,55	B2	2,46	C2	2,61	D2	2,35	E2	1,01	F2	0,98	G2	1,55	H2	2,03
	A3	2,07	B3	2,33	C3	0,26	D3	1,76	E3	0,27	F3	1,12	G3	1,65	H3	0,22
	A4	0,75	B4	1,74	C4	0,81	D4	0,15	E4	2,14	F4	0,35	G4	1,81	H4	1,91
	A5	2,20	B5	1,71	C5	2,48	D5	2,48	E5	1,06	F5	1,73	G5	2,54	H5	2,07
	A6	2,13	B6	2,21	C6	2,34	D6	2,23	E6	1,43	F6	2,11	G6	2,73	H6	0,94
	A7	0,82	B7	2,24	C7	1,80	D7	1,50	E7	1,23	F7	0,59	G7	2,42	H7	1,72
	A8	2,30	B8	1,58	C8	2,31	D8	2,54	E8	1,36	F8	2,50	G8	1,06	H8	0,05
	A9	2,31	B9	2,36	C9	1,66	D9	2,37	E9	2,36	F9	2,50	G9	1,77	H9	1,47
	A10	0,20	B10	2,30	C10	2,32	D10	0,00	E10	1,79	F10	1,92	G10	2,72	H10	1,20
	A11	2,45	B11	2,10	C11	2,00	D11	1,57	E11	1,97	F11	1,08	G11	1,17	H11	0,85
	A12	2,48	B12	2,30	C12	1,29	D12	0,14	E12	1,47	F12	1,07	G12	2,14	H12	1,44

Tableau 13A : Les OD obtenues à 72h des plaques GN2 des différents agrégats racinaires avec et sans vers de terre

Puits	Substrat	Puits	Substrat
A1	Eau	E1	p-Hydroxy phenylacetic acid
A2	α -Cyclodextrin	E2	Itaconic Acid
A3	Dextrin	E3	α -Ketobutyric Acid
A4	Glycogen	E4	α -Ketoglutaric Acid
A5	Tween 40	E5	α -Ketovaleric Acid
A6	Tween 80	E6	D,L-Lactic Acid
A7	N-Acetyl-D-Galactosamine	E7	Malonic Acid
A8	N-Acetyl-D-Glucosamine	E8	Propionic Acid
A9	Adonitol	E9	Quinic Acid
A10	L-Arabinose	E10	D-Saccharic Acid
A11	D-Arabitol	E11	Sebacic Acid
A12	D-Cellobiose	E12	Succinic Acid
B1	i-Erythritol	F1	Bromosuccinic Acid
B2	D-Fructose	F2	Succinamic Acid
B3	L-Fucose	F3	Glucuronamide
B4	D-Galactose	F4	L-Alaninamide
B5	Gentiobiose	F5	D-Alanine
B6	α -D-Glucose	F6	L-Alanine
B7	m-Inositol	F7	L-Alanyl-Glycine
B8	α -D-Lactose	F8	L-Asparagine
B9	Lactulose	F9	L-Aspartic Acid
B10	Maltose	F10	L-Glutamic Acid
B11	D-Mannitol	F11	Glycyl-L-Aspartic Acid
B12	D-Mannose	F12	Glycyl-L-Glutamic Acid
C1	D-Melibiose	G1	L-Histidine
C2	β -Methyl-D-Glucoside	G2	Hydroxy-L-Proline
C3	D- Psicose	G3	L-Leucine
C4	D-Raffinose	G4	L-Ornithine
C5	L-Rhamnose	G5	L-Phenylalanine
C6	D-Sorbitol	G6	L-Proline
C7	Sucrose	G7	L-Pyroglutamic Acid
C8	D-Trehalose	G8	D-Serine
C9	Turanose	G9	L-Serine
C10	Xylitol	G10	L-Threonine
C11	Pyruvic Acid Methyl Ester	G11	D,L-Carnitine
C12	Succinic Acid Mono-Methyl Ester	G12	γ -Aminobutyric Acid
D1	Acetic Acid	H1	Urocanic Acid
D2	Cis-Aconitic Acid	H2	Inosine
D3	Citric Acid	H3	Uridine
D4	Formic Acid	H4	Thymidine
D5	D-Galactonic Acid Lactone	H5	Phenylethyl-amine
D6	D-Galacturonic Acid	H6	Putrescine
D7	D-Gluconic Acid	H7	2-Aminoethanol
D8	Glucosaminic Acid	H8	2,3-Butanediol
D9	D-Glucuronic Acid	H9	Glycerol
D10	α -Hydroxybutyric Acid	H10	D,L, α -Glycerol Phosphate
D11	β -Hydroxybutyric Acid	H11	α -D-Glucose-1-Phosphate
D12	γ -Hydroxybutyric Acid	H12	D-Glucose-6-Phosphate

Tableau 13B : Nom des substrats dans les puits

Annexe 4 : Liste des sources carbonées des plaques GN2 Biolog

Types	BIOLOG GN2	Types	BIOLOG GN2
Polymères	<ul style="list-style-type: none"> α-cyclodextrin dextrin glycogen tween 40 tween 80 	Acides organiques	<ul style="list-style-type: none"> α- hydroxybutyric acid β- hydroxybutyric acid γ- hydroxybutyric acid p-hydroxy phenylacetic acid itaconic acid α-ketobutyric acid α-ketoglutaric acid α-ketovaleric acid D,L-lactic acid malonic acid propionic acid quinic acid D-saccharic acid sebacic acid succinic acid bromosuccinic acid succinamic acid
Amines et amides	<ul style="list-style-type: none"> n-acetyl-D-galactosamine n-acetyl-D-glucosamine glucuronamide L-alaninamide phenylethyl-amine putrescine 		
Carbohydrates	<ul style="list-style-type: none"> adonitol l-arabinose D-arabitol D-cellobiose i-erythritol D-fructose L-fucose D-galactose gentiobiose α-d-glucose m-inositol α-d-lactose lactulose maltose D-mannitol D-mannose D-melibiose β-methyl-d- glucoside D-psicose D-raffinose L-rhamnose D-sorbitol sucrose D-trehalose turanose xylitol methyl puryvate mono methyl succinate 	Acides aminés	<ul style="list-style-type: none"> D-alanine L-alanine L-alanyl- glycine L-asparagine L-aspartic acid L-glutamic acid glycyl-L-aspartic acid glycyl-L-glutamic acid L-histidine hydroxy-L-proline L-leucine L-ornithine L-phenylalanine L-proline L-pyroglutamic acid D-serine L-serine L-threonine D,L-carnitine γ-aminobutyric acid
Aides organiques	<ul style="list-style-type: none"> acetic acid cis-aconitic acid citric acid formic acid D-galactonic acid lactone D-galacturonic acid D-gluconic acid D-glucosaminic acid D-glucuronic acid 	Divers	<ul style="list-style-type: none"> urocanic acid inosine uridine thymidine 2-aminoethanol 2,3-butanediol glycerol D,L,α-glycerol phosphate α-D-glucose- 1-phosphate D-glucose-6-phosphate

Tableau 15 : Liste comparative des sources carbonées de plaque BIOLOG (GN, Gram-négatif)

RESUME

L'objectif de ce travail était d'étudier les interactions entre une plante « phytoremédiatrice », *Lantana camara* (Verbenaceae), le ver de terre, *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae) et les microorganismes telluriques d'un sol pollué au plomb.

Dans un premier temps, il apparaît que dans les sols contaminés, la présence de ver conduit à un accroissement de la biomasse des parties aériennes et racinaires des plantes ainsi qu'à une augmentation de l'absorption de plomb.

La caractérisation physico-chimique des agrégats racinaires a montré que l'activité des vers augmente le taux de matière organique, la capacité d'échange cationique ainsi que l'azote total, le potassium total et disponible. De plus, la présence des vers augmente certaines activités enzymatiques de la rhizosphère. La croissance accrue de *L. camara* pourrait résulter de ces différentes actions.

L'action des vers de terre sur les plantes se ferait *via* les communautés microbiennes telluriques. Ainsi, la biomasse des microorganismes, bactéries et champignons, des agrégats racinaires augmente en présence de vers. La PCR-DGGE n'a pas permis de mettre en évidence de modifications de la structure taxonomique des communautés bactériennes sous l'influence du Pb et/ou du vers, par contre l'analyse des profils physiologiques par plaques Biolog montre clairement une diversification fonctionnelle bactérienne. Les communautés fongiques voient, elles, leur diversité taxonomique, augmenter sous l'action des vers. La restructuration des populations microbiennes, en présence de vers, des agrégats racinaires élaborés par les plantes en milieu pollué au plomb est l'élément déterminant pour la compréhension de l'impact de *P. corethrurus* sur la croissance et la phytoremédiation de *L. camara*. L'association de ces deux organismes aurait donc un potentiel considérable pour le traitement de sites industriels pollués au plomb.

Mots clés : métaux lourds, phytoextraction, *Lantana camara*, ver de terre, *Pontoscolex corethrurus*, activité enzymatique, caractérisation physico-chimique, microflore tellurique, diversité taxonomique, diversité fonctionnelle.

SUMMARY

The objective of this work was to study the interactions between phytoextracting plant *Lantana camara* (Verbenaceae), the earthworm *Pontoscolex corethrurus* (Glossocolecidae) and microorganisms in soil contaminated with lead.

Initially, it appears that in the contaminated soil, the presence of earthworm leads to an increase in the biomass of root and aerial parts of plants and increased absorption of lead.

The physico-chemical characterization of root-aggregates showed that the activity of earthworms increases the rate of organic matter, cation exchange capacity, total nitrogen, total and available potassium. Moreover, the presence of earthworms increases certain enzymatic activities in the rhizosphere. The increased growth of *L. camara* could result from these different actions.

The action of earthworm on plants would be through terrestrial microbial-communities. Thus, the biomass of microorganisms, bacteria and fungi, of root-aggregates increase in the presence of earthworms. By PCR-DGGE, we were unable to demonstrate differences in taxonomic diversity of the bacteria community but the analysis of physiological profiles with Biolog plates showed that the activities of earthworm enhance the functional diversity of soil bacteria. In other hand, the restructuring of fungal taxonomy has been clearly observed by the activity of earthworm. All changes observed can explain increased growth of plants and improved phytoextraction of heavy metal.

Finally, the study underlines the role of the earthworms on the growth and the phytoextraction efficiency of the plants. So, the combination of earthworm *P. corethrurus* and plant *L. camara* could be considerable potential for the treatment of industrial sites polluted with lead.

Key words: Heavy metal, phytoextraction, *Lantana camara*, earthworm, *Pontoscolex corethrurus*, enzymatic activity, physico-chemical, terrestrial microflora, structure diversity, functional diversity.