

Les données présentes dans ce rapport sont le fruit d'un travail étalé sur plusieurs années et mené par toute une équipe.

Ceci dit, voici énumérées ci-dessous toutes les tâches que j'ai accomplies pendant ce stage de six mois à Hortresearch, Palmerston North, Nouvelle Zélande :

- 1) Prises d'échantillons et mesures sur le site de Kopu, Ile du nord, Nouvelle Zélande (Avril 2002).
- 2) Mesure de la superficie des feuilles des peupliers surveillés en lysimètres.
- 3) Minéralisation des échantillons des prélèvements faits à Kopu, des prélèvements provenant des lysimètres et des échantillons issus des expériences génétiques.
- 4) Mesure de la concentration en Cd de ces mêmes échantillons par spectrométrie d'absorption atomique à Massey University, Palmerston North.
- 5) Traitement des données sur Excel, Origin et Minitab.
- 6) Interprétation des résultats et rédaction de ce rapport.
- 7) Présentation orale au groupe le lundi 16 septembre 2002.

Remerciements

Je remercie tout d'abord Mr Brent Clothier de m'avoir accueilli au sein de son équipe et par ce biais de m'avoir permis de vivre une extraordinaire expérience ici en Nouvelle Zélande. Je remercie particulièrement Mr Brett Robinson de m'avoir encadré, soutenu, et appris l'anglais sous toutes ses coutures avec un mémorable « What's the bird ? », merci encore Brett de cette enthousiaste et impeccable gestion de mon stage.

Un sincère « Cheers » à toute l'équipe de « Environment and Risk Management » ici à Palmy, qui a permis le bon déroulement de mon stage. Plus particulièrement à Mme Thabo Thayalakumaran pour son aide à l'analyse des échantillons, à Mr Steeve Green pour les données des années précédentes et l'année en cours, à Mr Lindsay Fung pour son aide concernant les peupliers, à Mr Carlo Van Den Dijssel sans qui mon rapport aurait disparu au fond d'ordinateurs, à Mme Sarah Hurst pour ses conseils ainsi qu'à Mme Cathy Isles.

En France, je voudrais remercier l'équipe pédagogique de l'ESIGEC pour m'avoir permis de faire ce stage ainsi que la région Rhône-Alpes pour son financement. Un merci plus particulier à Mme Stéphanie Perrier, Mme Isabelle Chtouki, Mr Hubert Fleuret et Mr Gérard Blake.

Je remercie tout particulièrement mes parents et mes frères pour leurs mots de soutien et d'encouragement et plus simplement pour les nouvelles données ; ceux de France et d'ailleurs pour leurs e-mail qui font toujours plaisir quand on est à l'autre bout du monde ; plus spécialement Matthieu, Philippe, Loulou, Maude & Brice, François, Matthilde et Alex .

Enfin merci à tout ceux qui ont rendu mon séjour agréable ici, plus spécialement Sander, Marion, Audrey, Gaëlle, Sam, Steven, Else et Tristans.

Summary

Phytoremediation is a technology used to improve degraded environments. Phytoremediation is an *in situ* technology that has a considerably lower cost than off site or *ex situ* treatments.

Environment Waikato, a regional council responsible for policing environmental quality in the Waikato Region (North Island, New Zealand) placed an order on Fletcher Challenge Forests (FCF), a local forestry company, to remediate a 5 ha sawdust pile at Kopu, where sawdust and yard-scrapings have been stored for 30 years. The sawdust pile, contaminated with heavy metals and pentachlorophenol (PCP), is leaching unacceptable amounts of boron into local waterways. FCF contracted HortResearch (a New Zealand crown research institute) to implement phytoremediation on the Kopu sawdust pile.

This report is divided into three sections: the first introduces phytoremediation, plant-metal interactions and the Kopu site; the second presents results from experiments designed to measure the effect of environmental parameters on boron accumulation by poplars; the last reports an investigation into genetic variation in boron and cadmium accumulation by poplars with a view to improving phytoremediation.

In a shade-house at HortResearch, Palmerston North, Eight poplars were grown in 800 L lysimeters containing sawdust from the Kopu site. The experiment was carried out over two years and measured plant growth and boron accumulation as a function of environmental parameters. Tree growth, leaf area, water use, boron concentration were continually measured along with temperature, solar radiation, relative humidity and wind speed in the shade-house.

It was found that boron accumulation by poplars is dependent on the concentration of soluble boron in the substrate, a plant specific « root absorption factor » and plant water-use, which is a function of leaf area. The root absorption factor is a lumped parameter that incorporates a plethora of physical, chemical and biological phenomena in the vadose zone. These factors were beyond the scope of this study and represent a fertile area for further research. A simple model was thus developed to predict plant boron uptake as a function of environmental parameters.

Analyses of plant material and sawdust from the Kopu site were used to validate the model. There was reasonable agreement between estimated and measured plant boron concentration, considering factors that may affect plant-uptake such as pH, sawdust fertility, and the presence of pathogens were not considered.

The variation in root absorption factor between poplar clones was investigated by growing four replicates of 200 clones under identical conditions. No significant differences were found between the clones with respect to boron uptake, however, there was a 10-fold difference in leaf cadmium concentration between the highest and lowest clones. It was concluded that selective breeding could be used to enhance the efficiency of the phytoremediation of cadmium-contaminated soils.

Résumé

La phytoremédiation fait partie des procédés de décontamination des sols. Ceux-ci peuvent être regroupés selon trois familles distinctes, les traitements hors-sites, sur sites et *in-situ*. A l'inverse du traitement *in-situ*, les deux premiers nécessitent une excavation des terres polluées et un investissement beaucoup plus conséquent.

Afin de faire respecter les normes environnementales communes à la l'Australie et à la Nouvelle Zélande, la direction de l'environnement basée à Waikato (Nouvelle Zélande, île du Nord) a demandé à Fletcher Challege Forest (FCF) de décontaminer le site de Kopu où elle avait stocké pendant plusieurs dizaines d'années des sciures de bois caractérisées par une très forte concentration en métaux lourds (essentiellement Bore et Cadmium). Cette dernière a décidé de faire appel à HortResearch et à la phytoremédiation pour decontaminer ce site sur l'île nord de la Nouvelle Zélande.

Ce rapport contient trois volets : le premier présente le procédé de phyto-remédiation, les métaux concernant cette étude, et le site de Kopu ; le deuxième rassemble les résultats obtenus montrant l'influence des paramètres environnementaux sur l'accumulation du bore (B) et du cadmium (Cd) par les peupliers . enfin, développe les liens trouvés entre les génomes des populations de peupliers et cette accumulation en vue d'améliorer les procédés de phytostabilisation et de phytoextraction.

Huit peupliers ont été plantés dans des lysimètres contenant 800 L de « sol » du site de Kopu, sous serre à Hortresearch, Palmerston North. Cette expérience s'est déroulée sur deux ans, la croissance des arbres ainsi que l'accumulation du B en fonction des paramètres environnementaux a été étudié. La croissance des arbres, la surface foliaire, la consommation d'eau, la concentration en B dans les feuilles, la température, l'irradiation solaire, l'humidité relative et la vitesse du vent ont été continuellement suivies.

Il a été démontré que l'accumulation du B par les peupliers variait en fonction de la consommation en eau de la plante, de la superficie foliaire développée, et du facteur d'absorption racinaire. Cependant les paramètres affectant ce facteur n'ont pu être mis à jour. Ainsi les travaux futur pourront s'axer essentiellement sur ce thème de recherche. Un simple modèle a donc été créé pour prédire l'absorption du B en fonction des paramètres environnementaux.

L'analyse des plantes et du sol à Kopu ont pu valider le modèle sachant que le pH, la fertilité du sol, la présence de pathogènes n'ont pas été pris en compte. La variation du facteur d'absorption racinaire de plusieurs peupliers a été étudié développant 4 réplicats de 200 clones à conditions encironnementales identiques. Aucune différence significative n'a été trouvé en ce qui concerne l'absorption du B mais un facteur de 10 est apparu entre la plus grande et la plus faible concentration de Cd trouvée dans les feuilles de ces clones. Il a donc été conclu que la sélection d'espèces des clones performants peut être utilisée pour augmenter l'efficacité de la phyto-remédiation des sites contaminés par le Cd.

Sommaire

REMERCIEMENTS	2
SUMMARY	3
RESUME	4
SOMMAIRE	5
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE	7
I LA PHYTOREMEDIATION :	7
I.1 Définition.....	7
I.2 Les différents types de phytoremédiation.....	7
II PRESENTATION DU SITE DE KOPU	8
II.1 Localisation	8
II.2 Photos de l'évolution de la couverture végétale.....	10
II.2 Les eaux de lessivage.....	11
III HYPERACCUMULATION DES METAUX LOURDS PAR LES PLANTES	12
III.1.La notion d'hyperaccumulation	12
III.2 L'absorptions des métaux lourds par les plantes :	13
IV LE B ET LE CD.....	16
IV.1.Le Bore (B)	16
IV.2 Le Cadmium (Cd)	21
CHAPITRE 2 : LA PHYTOREMEDIATION D'UN SITE CONTAMINE ET UNE ETUDE PARALLELE	24
I INTRODUCTION	24
I.1 L'accumulation des métaux comme une fonction de leur biodisponibilité et de la transpiration des plantes.....	25
I.2 Le facteur d'absorption racinaire.....	25
I.3 Le facteur d'absorption racinaire et le comportement des plantes face aux métaux lourds	26
I.4 Estimation du facteur d'absorption racinaire.....	27
I.5 Modélisation de l'extraction des métaux par la plante.....	27
I.6 Le but de cette étude.....	27
II MATERIEL ET METHODES.....	28
II.1 Les lysimètres.....	28
II.2 Le site de Kopu	29
II.3 Préparation des échantillons et analyse.....	29
II.4 Modélisation de l'extraction des métaux par les plantes	29
III RESULTATS ET DISCUSSION	30
III.1 Les lysimètres	30
III.2 Le site de Kopu.....	36
IV CONCLUSION.....	39
CHAPITRE 3 : L'ACCUMULATION DU CD ET DU B COMME UNE FONCTION DU GENOTYPE 40	
I INTRODUCTION	40
II MATERIEL ET METHODE	41
III RESULTATS ET DISCUSSION	42
III.1 Accumulation du Bore	42
III.2 Accumulation du Cd.....	44
IV CONCLUSION.....	46
CONCLUSION	47

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	48
ANNEXE 1.....	53
RAPPEL SUR LES BESOINS DES PLANTES	53
ANNEXE 2.....	56
LES PEUPLIERS	56
ANNEXE 3.....	59
PRINCIPE DE L'ICPES (INDUCTIVELY COUPLED PLASMA EMISSION SPECTROMETRY) :	59
PRINCIPE DE LA FAAS (FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY) :	59
ANNEXE 4.....	60
A) LE BORE.....	60
B) LE CADMIUM.....	61
ANNEXE 5.....	64
I LE TEST F DE FISHER.....	64
II LE TEST DE STUDENT.....	64

Chapitre 1 : Introduction Générale

I La phytoremédiation :

I.1 Définition

Le mot phytoremédiation vient du grec « phyto » : la plante, et du latin « remedium » : corriger un méfait. La phytoremédiation est l'utilisation de plantes pour la réhabilitation des environnements dégradés.

Les plantes concernées sont essentiellement les végétaux supérieurs et les algues. Dans le cas particulier de la remédiation des marécages ce sont surtout les phytoplanctons et les algues fixées qui seront utilisés. L'utilisation des végétaux supérieurs a un double intérêt : en plus de leur action sur la dépollution des sols, ils permettent de créer un environnement physico-chimique favorable au développement de la flore tellurique (bactéries et champignons) capable de désintoxiquer les polluants présents dans le sol (Horne, 2000). Le but de la phytoremédiation est donc de stabiliser des sols (comme, par exemple, d'anciens sites miniers), ou de réhabiliter les sols avec une possible utilisation agricole. De telles pratiques améliorent à terme la qualité des eaux et des produits alimentaires animaux et humains.

La phytoremédiation fait partie des procédés de décontamination des sols. Ceux-ci peuvent être regroupés selon trois familles distinctes, les traitements hors-sites, sur sites et *in-situ*. A l'inverse du traitement *in-situ*, les deux premiers nécessitent une excavation des terres polluées et un investissement beaucoup plus conséquent.

M

I.2 Les différents types de phytoremédiation

La phytoremédiation regroupe différentes méthodes qui sont appliquées selon la contamination et les objectifs de rémediation. Deux grands types de phytoremédiation semblent être différenciés selon le critère de « biodisponibilités des contaminants des sols ». Il s'agit de la phytostabilisation et de la phytodécontamination.

Le principe de la phytostabilisation s'applique dans le cas de sites où la biodisponibilité est réduite. Il s'agit de la stabilisation et de la séquestration des polluants du sol. Cette immobilisation nécessite le semis d'espèces tolérantes aux métaux lourds présentant une importante consommation d'eau afin d'éviter les lessivages, et l'utilisation éventuelle de stabilisants chimiques;

La phytodécontamination est la réduction de la teneur des polluants du sol. On peut distinguer différents types de phytodécontamination :

La phytodégradation : utilise les plantes et leur microflore associée pour transformer les polluants en substances moins toxiques;

La phytovolatilisation : utilise les plantes pour transférer les éléments (métaux) de la lithosphère vers l'atmosphère après transformation sous formes volatiles. Cette technique n'est pas totalement satisfaisante car si elle décontamine les sols, elle libère dans l'atmosphère des substances toxiques susceptibles de contaminer de nouveau le sol ou tout autre milieu comme les cultures, l'eau etc.

La phytoextraction est le terme définissant le procédé par lequel les plantes accumulent les polluants dans leurs parties aériennes. Cette biomasse contaminée est ensuite fauchée et exportée pour être, dans la plupart des cas, incinérée. Les cendres obtenues (bio-minerais) sont soit réintroduites dans le cycle métallurgique soit confinées dans un lieu étanche ;

La rhyzofiltration utilise les plantes terrestres capables de développer leur système racinaire dans les eaux polluées. Du fait de leur biomasse racinaire importante les polluants sont concentrés dans les racines qui seront ensuite récoltées. L'eau est purifiée et libérée dans l'atmosphère par évapotranspiration;

Le phytomining est une technologie utilisant le principe de la phytoextraction dans un but industriel et commercial.

II Présentation du site de Kopu

II.1 Localisation

Kopu est une ville située dans l'île Nord de la Nouvelle Zélande, plus précisément au sud de Thames au pied de la péninsule de Coromandel. Les cartes ci-après illustrent la localisation du site.

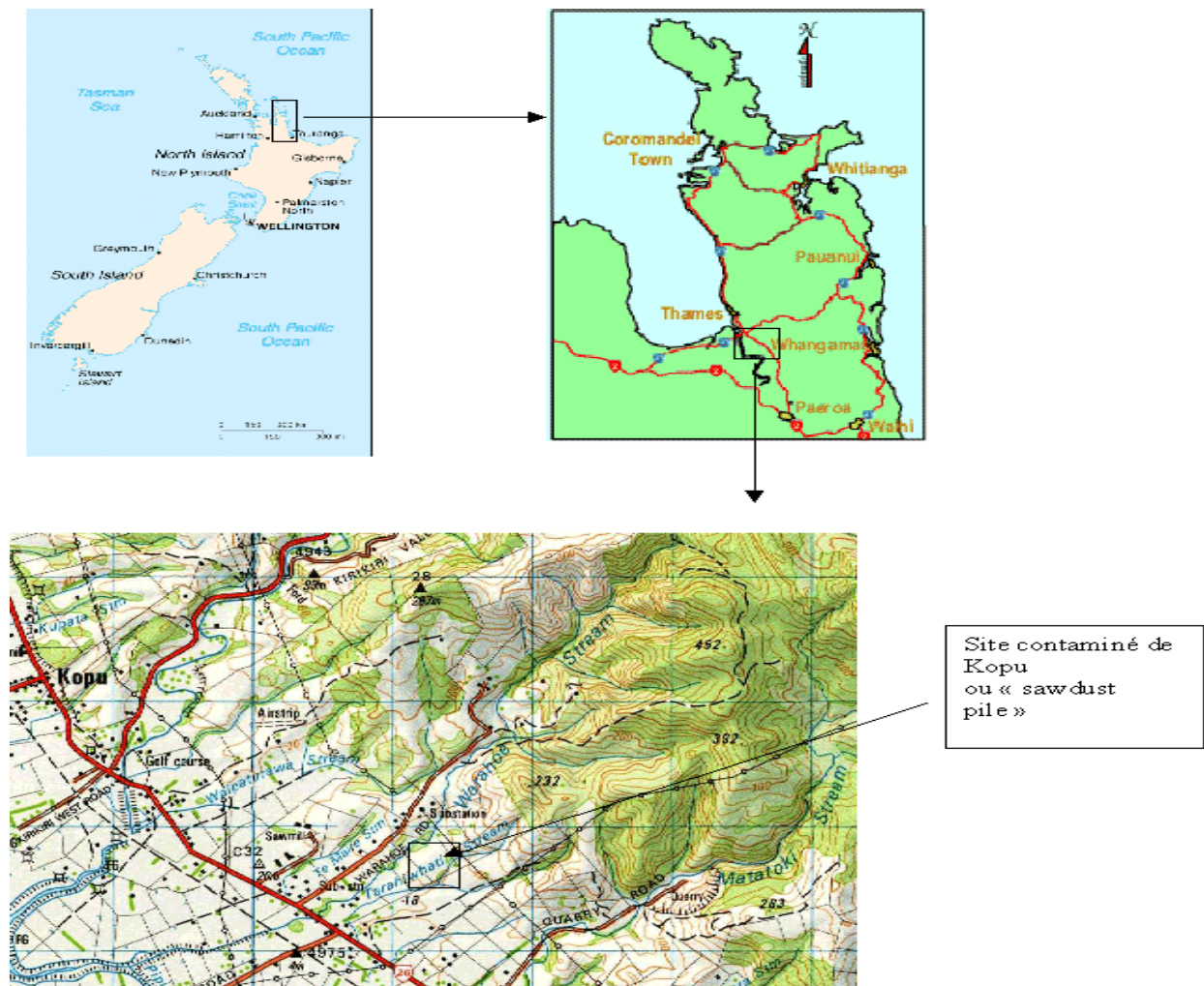


Figure 1: Localisation du site de Kopu

Ce terrain fait environ cinq hectares et a été planté de peupliers, de saules et d'*Eucalyptus* le 26 juillet 2000. L'entreprise propriétaire de ce site (Fletcher Challenge Forest), a souhaité qu'Hortresearch s'occupe de sa réhabilitation pour pouvoir par la suite le revendre (la couverture du site par une cappe imperméable aurait coûté 1.2 M de dollars NZ, alors que la phytoremédiation du site a été estimée à 120 k de dollars NZ).

II.2 Photos de l'évolution de la couverture végétale

Voici ci-dessous des photos illustrant le site de Kopu en 2000 puis en 2002



Figure 2: Site de Kopu juste après la plantation de juillet 2000

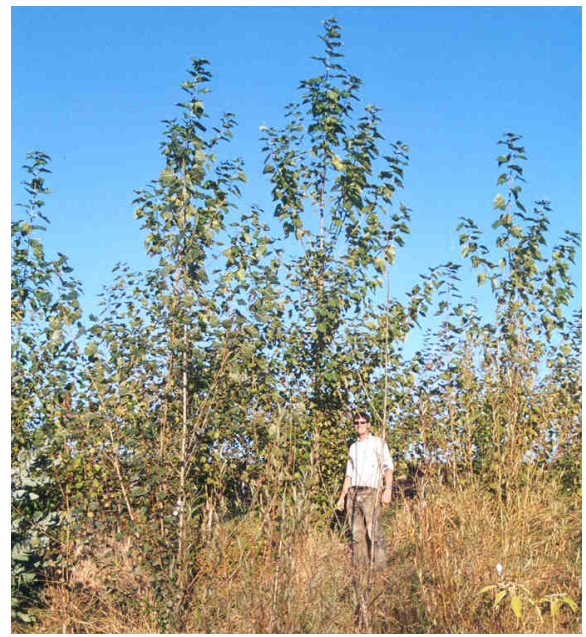


Figure 3 : Site de Kopu en Avril 2002

II.2 Les eaux de lessivage

Dans le cas du site de Kopu il s'agit essentiellement de phytostabilisation (le site ayant un caractère expérimental les feuilles n'ont pas été récoltées). En effet comme le montre le plan ci-dessous, les eaux de lessivage ont été drainées et dirigées vers un bassin de rétention duquel une pompe redistribuait les eaux pour l'irrigation du terrain en période sèche.

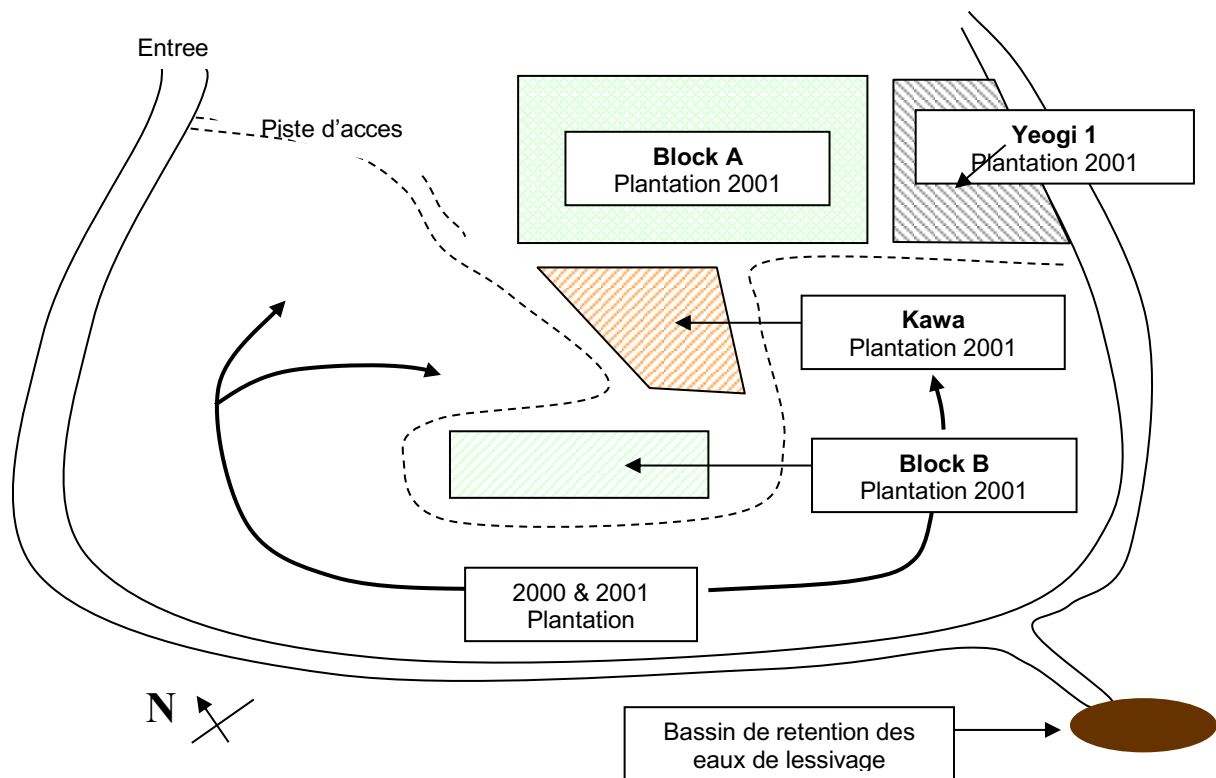


Figure 4 : Plan du site de Kopu

Les photos ci-dessous montrent les eaux de lessivage sur le site au bas du terrain:



Figure 5 : Eaux de lessivages

A été plus particulièrement étudié : le peuplier; en effet cet arbre a la capacité de se développer très rapidement et d'extraire un grand volume d'eau du sol et donc par ce biais une grande quantité de métaux comme le Zn, le Cd, le B et le Se. De plus cette espèce a la capacité de se propager de façon végétative ce qui représente un grand avantage pour le traitement des sols. De plus amples renseignements sont donnés sur ces peupliers et leurs besoins nutritifs en annexe 1 et 2, les paragraphes qui suivent sont consacrés à la présentation de l'hyperaccumulation et des éléments objets de cette phytoremédiation : le B et le Cd.

III Hyperaccumulation des métaux lourds par les plantes

III.1. La notion d'hyperaccumulation

Tous les végétaux absorbent des éléments minéraux. Cependant, certains présentent la particularité de prélever en grande quantité un élément donné.

Le mot « hyperaccumulation » a été proposé par Brooks *et al.* (1977) pour décrire les plantes qui ont une concentration extraordinaire d'un ou plusieurs métaux lourds dans leurs parties aériennes.

Baker *et al.* (2000) donne ainsi la définition suivante : « il s'agit de l'accumulation d'un élément dans un organisme à des concentrations plus importantes que celles trouvées dans le sol dans lequel il se trouve et cette concentration est supérieure à celle requise par le métabolisme ». Dans le cas des végétaux, la notion d'hyperaccumulation dépend des métaux et des plantes car chaque famille a des besoins métaboliques différents.

Il ne faut donc pas confondre des concentrations élevées mais nécessaire pour le métabolisme du végétal avec les concentrations élevées résultant d'un phénomène d'hyperaccumulation. Le tableau suivant fixe les limites au-delà desquelles une plante est qualifiée d'hyperaccumulatrice.

Pour évaluer cette hyperaccumulation, il peut être utilisé le coefficient de transfert défini par :

$$K_t = \frac{\text{Concentration de métal contenu dans les tissus aériens de la plante}}{\text{Concentration totale du métal dans le sol}}$$

Plus K_t est élevé et plus l'accumulation des métaux est importante.

Ou alors, il arrive que soit comparée la concentration en métal dans deux plantes différentes, si l'une ou l'autre contient 10 à 100 fois plus de ce métal dans ses tissus alors celle-ci est considérée comme étant hyper accumulatrice.

C'est pourquoi le tableau ci dessous n'offre qu'une vue générale des espèces concernées par ce phénomène :

Métal	Limite inférieure (% en matière sèche de feuilles)	Nombre d'espèces	Nombre de familles
Cadmium	> 0,01	1	1
Cobalt	> 0,1	28	11
Cuivre	> 0,1	37	15
Plomb	> 0,1	14	6
Manganèse	> 1,0	9	5
Nickel	> 0,1	317	37
Zinc	> 1,0	11	5
Thallium	> 0,1	2	1

Tableau 1 : Espèces hyperaccumulatrices

Récemment des espèces hyperaccumulatrices d'Arsenic ont été mises à jour, par exemple une fougère nommée *Pteris vittata* peut contenir dans ses tissus aériens plus de deux cents fois la concentration d'arsenic contenu dans le sol l'entourant (Ma *et al.*, 2001).

III.2 L'absorptions des métaux lourds par les plantes :

III.2.1 Les mécanismes d'absorption :

Les éléments minéraux solubilisés dans la rhizosphère sont absorbés par les racines au niveau des poils absorbants. Cette partie de la racine ne possède pas de suber. Elle est formée de cellules végétales jeunes. Il existe deux moyens principaux d'absorption, le premier se fait par l'apoplaste et le deuxième par le cytoplasme.

Le transport apoplasmique (A) utilise la zone délimitée par les parois des cellules et suit les mouvements d'eau ainsi que les gradients de concentration et de potentiels chimiques.

Le transport symplasmique (B) pour sa part peut être passif ou actif et se fait au niveau des membranes des cellules des poils absorbants.

Dans les deux cas les éléments minéraux sont conduits jusqu'aux cellules entourant les vaisseaux du xylème, soit l'endoderme. A ce niveau, l'absorption des éléments minéraux est sélective et se fait de manière passive ou active. L'absorption active diffère de l'absorption passive du fait qu'elle nécessite de l'énergie.

Le schéma ci dessous rassemble les renseignements délivrés précédemment :

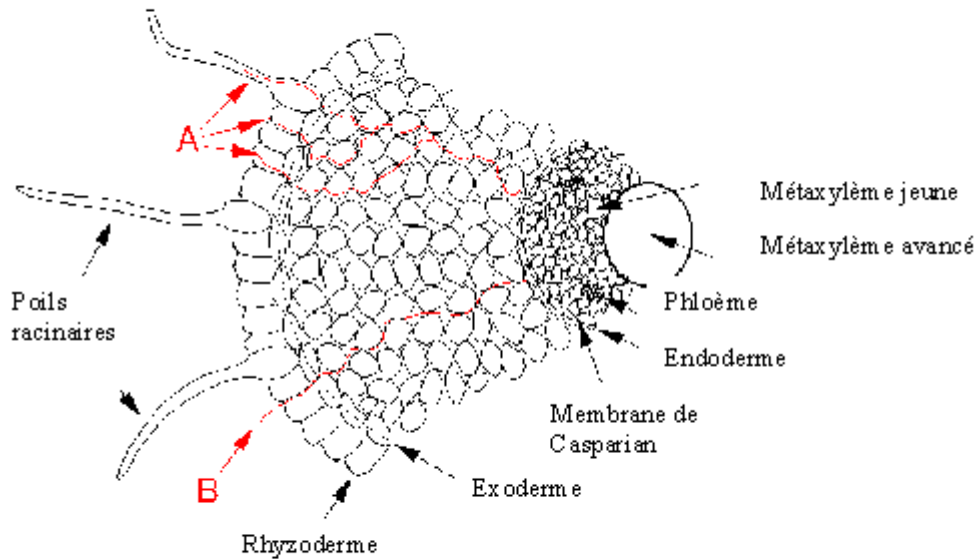


Figure6: Transports apoplastique et symplasmique

III.2.2 Les métaux lourds dans les plantes :

La première découverte concernant les plantes hyperaccumulatrices de métaux a été reportée par Andrea Cesalpino. En effet, celui-ci décrit dans la haute vallée du Tibre, au 16^{ème} siècle en Italie, la présence d'une plante sur des roches ultrabasiques riches en métaux comme le magnésium et le fer (roches ultramafiques). En 1814 Desvaux nomma cette plante *Alyssum bertolinii*, par la suite d'autres découvertes ont été faites notamment celle de Jaffré et al. en Nouvelle Calédonie, prise en photo ci-dessous . Cette arbre contient 20 % de Ni dans sa sève sèche.

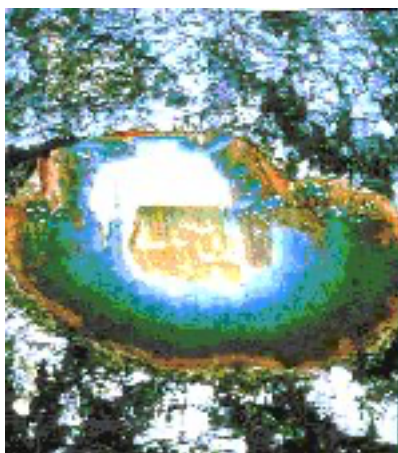


Figure7: Arbre à sève bleue *Sebertia acuminata*

Les premières théories, concernant les comportements des plantes dans les sols riches en éléments non-essentiels comme certains métaux lourds, ont été données par Baker (1981). Celles-ci ont évolué depuis, notamment avec les travaux de Robinson (1997) et de McGrath *et al.* (2000). Les courbes ci-après illustrent ces trois comportements théoriques :

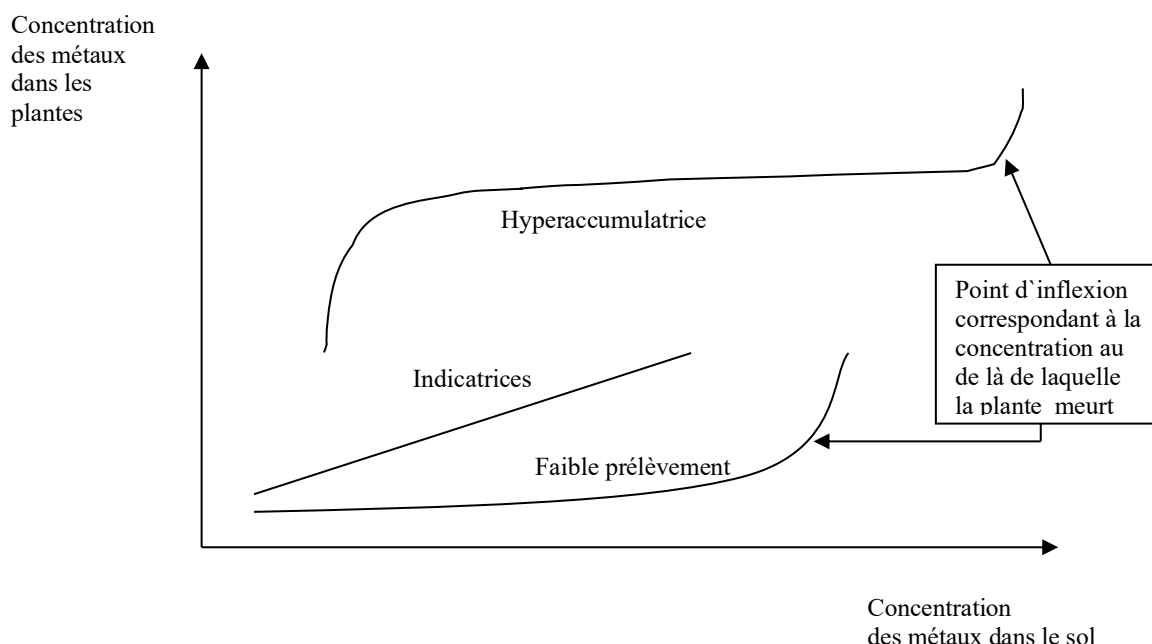


Figure 8 : Comportements théorique des plantes dans les sols riches en éléments non essentiels.

La première stratégie est un prélèvement faible des métaux. La plante contrôlerait leur non-absorption au niveau de la racine. Il existe une valeur maximale de tolérance au-delà de laquelle le végétal meurt.

La seconde est un prélèvement proportionnel à la quantité en métaux présente dans le sol. La plante est alors qualifiée d'indicatrice puisqu'elle reflète les quantités présentes dans celui-ci.

La troisième stratégie consiste en l'hyperaccumulation des métaux dans les parties aériennes de la plante, les mécanismes d'absorption sont actifs. La courbe ci-dessus montre qu'au-delà d'une certaine concentration dans le sol les mécanismes de contrôle sont dérégulés provoquant ainsi un flux de métaux qui entre au sein de la plante et entraîne son dépérissement (Anderson, 2000 ; McGrath *et al.*, 2000 ; Robinson, 1997).

Pour être absorbés, les métaux doivent être sous forme soluble dans la rhizosphère, ils sont donc soit à l'état libre soit liés à d'autres molécules. Les mécanismes d'absorption racinaire sont passifs ou actifs et encore mal connus ; en effet ils varient d'une plante à l'autre et d'un métal à l'autre.

Cependant on considère que le prélèvement du Pb est passif, ceux du Cu, du Mo et du Zn sont supposés actifs ou une combinaison des deux. Les ions absorbés par les mécanismes identiques peuvent être en compétition (Alloway, 1995).

Le tableau ci-dessous rassemble différents métaux en indiquant leur localisation et la forme sous laquelle ils sont absorbés (Brooks, 1998).

Métal	Localisation principale dans la plante	Formes absorbées
As	Racines et vieilles feuilles	Sels solubles de AsO_4^{3-} , As^{3+} , et As^{5+}
Cr	Racines et feuilles en faible quantité	Facilement absorbé dans les sols acides, $Cr(III)$, $Cr(IV)$, CrO_4^{2-}
Cu	Feuilles	Chélates organiques à 99%
Fe	Omniprésent	Fe^{2+} , chélates et complexes organiques
Pb	Racines	Difficilement absorbé car adsorbé par les argiles
Ni	Sève et racines	Différents oxides et chélates
Se	Graines et bourgeons notamment	Formes solubles (sélénates, sélénites)

Tableau 2 : Métaux et leurs formes absorbées au sein des plantes

Les lieux de stockage et d'utilisation du Cd et du B sont développés ultérieurement.

IV Le B et le Cd

IV.1.Le Bore (B)

IV.1.1 Présentation, formes dans l'environnement et devenir

Le B est un élément naturel qui se trouve sous la forme de borates dans les océans, les roches sédimentaires, la houille, le schiste et certaines huiles minérales. Il est très répandu dans la nature, avec des concentrations de l'ordre de 10 mg kg^{-1} dans l'écorce terrestre et d'environ $4,5 \text{ mg.L}^{-1}$ dans les océans. Les dérivés boriques les plus importants sont le borax à cinq molécules d'eau, le borax, le perborate de sodium, l'acide borique, la colémanite et l'ulexite (Env Health Criteria, #204, 1998).

Aux faibles concentrations et au pH pratiquement neutre qui caractérisent la plupart des liquides biologiques, c'est H_3BO_3 qui est l'espèce prédominante. Cela tient au fait que l'acide borique est un acide très faible ($pK_a = 9,15$).

Les méthodes utilisant un plasma à couplage inductif (Inductive Coupled Plasma cf annexe 3) sont les méthodes de choix pour le dosage des faibles quantités de bore présentes dans les échantillons biologiques et environnementaux, ainsi tous les résultats, fournis par le laboratoire de *e-lab.limited* à Hamilton, ont été obtenus en utilisant cette méthode.

Les dépôts de borates économiquement exploitables sont rares et se trouvent dans des zones arides de Turquie, des Etats-Unis, du Chili, de Russie, de Chine et du Pérou (IPCS International Programme on Chemical Safety, #204, 1998).

La pénétration du bore dans l'environnement se fait principalement par l'action des agents météorologiques sur les roches, la volatilisation de l'acide borique présent dans l'eau de mer et l'activité volcanique.

L'apport de B dû aux activités humaines est moindre : parmi ces dernières sources figurent les brûlis agricoles, l'incinération des déchets, la combustion du bois de chauffage, la production d'énergie à partir du charbon et du pétrole, l'industrie du verre, les borates et perborates utilisés comme produits industriels et ménagers, l'exploitation des mines de borates, le traitement des borates et des bois et papiers imprégnés et enfin le rejet des effluents et des boues.

Le taux d'adsorption du B dépend de sa concentration en solution et du pH de l'eau. Le B s'adsorbe sur les particules du sol, le degré d'adsorption étant fonction du type de sol, du pH, de la salinité, de la teneur en matières organiques, en oxyde et hydroxyde d'aluminium, en hydroxyde de fer et en argile. Le phénomène peut être parfaitement réversible ou au contraire complètement irréversible, selon la nature et l'état du sol. Il n'y a pas de processus aérobie qui soit susceptible d'influer sur la formation des différentes espèces chimiques et il n'a pas été fait état de biotransformations.

Le bore est présent dans les différents sols à des concentrations qui vont de 10 à 300 mg.kg⁻¹ (la moyenne est de 30 mg.kg⁻¹) selon la nature du sol, sa teneur en matières organiques et l'importance des précipitations.

La concentration du B dans les eaux souterraines et les eaux douces de surface est très voisine de sa concentration dans l'eau de boisson, ceci indique que cet élément n'est pas éliminé par les traitements auxquels sont soumises les eaux souterraines et les eaux de surface destinées à la boisson.

La concentration du bore dans les eaux de consommation est en générale comprise entre 0.1 et 0.3 mg.L⁻¹, sachant que l'homme a besoin de 1.8 mg.j⁻¹ de bore, si celle ci dépasse plusieurs milligrammes par litre cela peut s'avérer être dangereux pour l'organisme en raison de l'affinité de ce métal pour le système nerveux.

Le schéma ci après représente les mouvements du bore dans le système plante-sol, ce schéma est basé sur un diagramme utilisé de façon générale pour les métaux lourds (Peterson et Alloway, 1979).

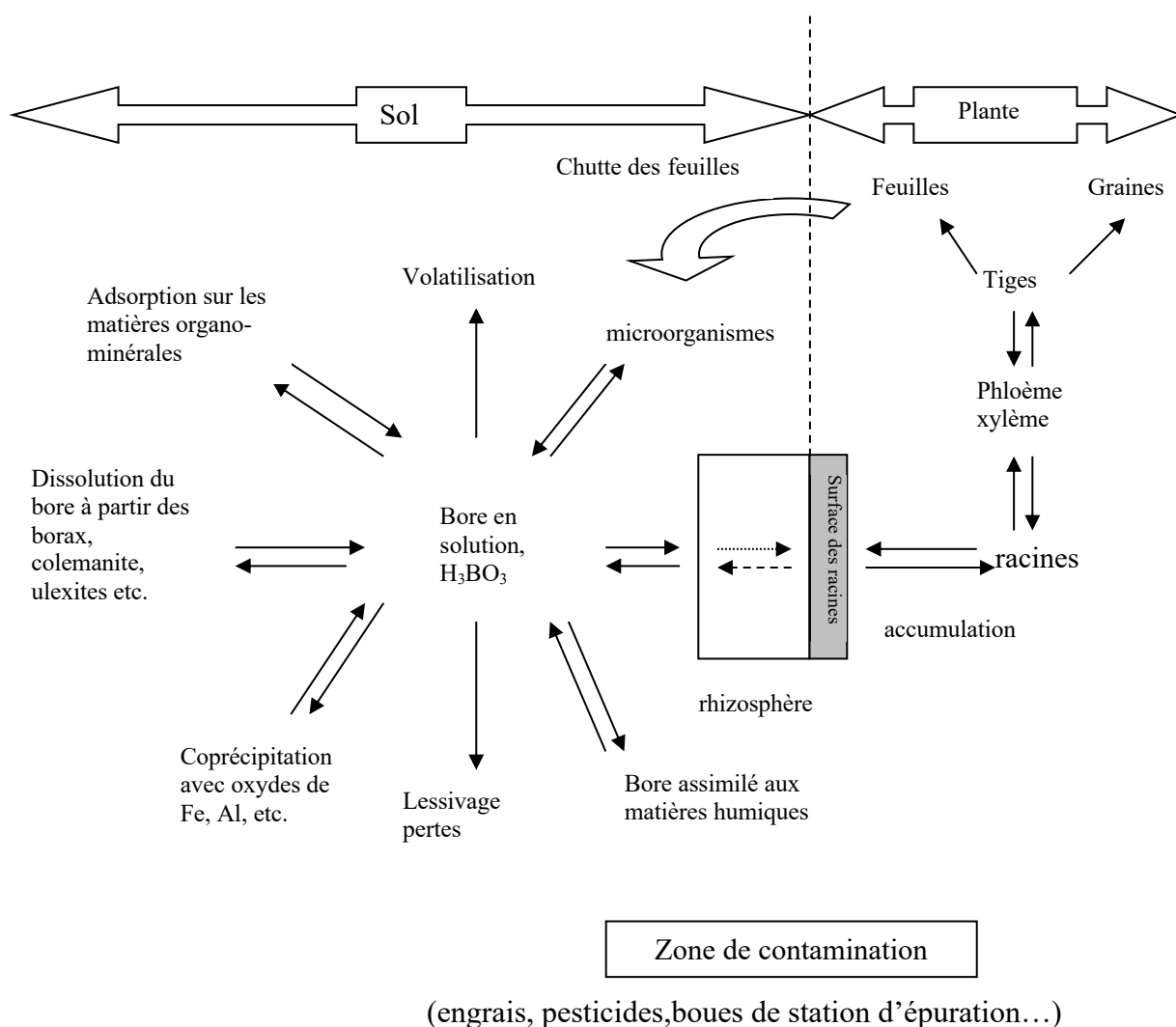


Figure 9 : Le Bore dans le système plante-sol,
adapté de Peterson, Alloway, 1979.

IV.1.2 Le B au sein de la plante

Le B est un élément essentiel pour les plantes, cependant il n'y a pas beaucoup de différences entre la concentration entraînant une déficience en B et la concentration critique correspondant à la limite de la toxicité ; en effet cette marge est la plus étroite de tous les autres métaux nécessaires à la plante.

IV.1.2.1 Biodisponibilité du B

De nombreux facteurs affectent la disponibilité du B pour la plante, nous pouvons citer parmi ceux-ci : le pH, la structure du sol, la microflore présente sur le site concerné, la température et la matière organique. Ci-dessous un graphique illustrant la biodisponibilité du B en fonction du pH sur un acide humique.

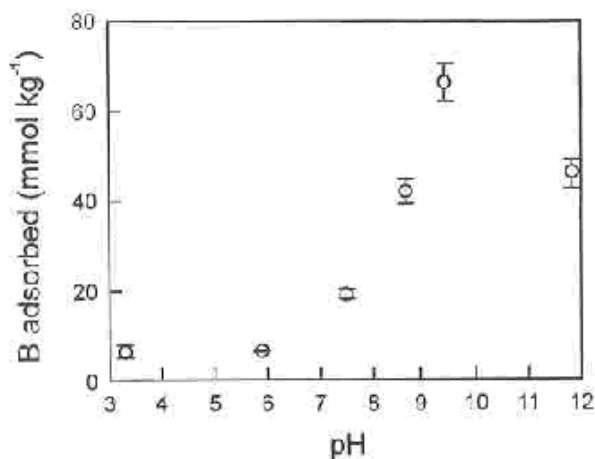


Figure 10 : Adsorption du B sur un acide humique en fonction du pH
(Gu & Lowe 1990)

Dans ce cas le pH d'adsorption maximum se situe aux alentours de 9,5. Les surfaces adsorbant le B dans le sol sont : les oxydes de fer et d'aluminium, l'hydroxide de magnésium, l'argile, le carbonate de calcium, et la matière organique.

La biodisponibilité du Bore augmente avec l'acidité du sol et est favorisée par une faible quantité de matière organique. La notion de biodisponibilité est très importante puisque c'est cette quantité de Bore biodisponible qui va permettre de pouvoir comparer la capacité qu'ont certaines plantes à absorber ce métal lourd.

Bien que que cette capacité soit propre à chaque plante, le Bore joue plusieurs rôles biologiques très importants au sein des plantes et commun à beaucoup d'entre elles.

IV 1 2 2 Le B au sein des plantes :

Voici un graphique mettant en évidence le rôle du pH dans l'absorption du B par les plantes :

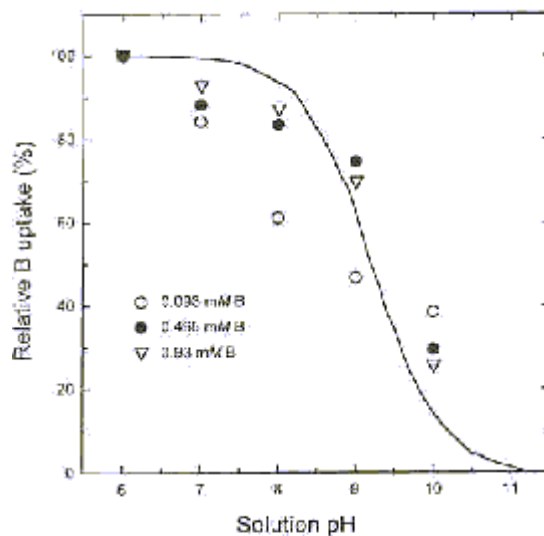


Figure 11 : Assimilation relative du B en fonction du pH
adapté de Oertli & Grgurevic (1975)

Les mécanismes de cette absorption ont été longuement débattus et le sont encore. Notons que l'absorption du B a été montrée comme étant passive (Bingham *et al.*, 1997) suite à ses travaux sur l'orge. Puis une autre équipe a montré que cette absorption était active pour les ions $B(OH)_4^-$, et passive pour H_3BO_3 . (Wildners et Neales, 1971) en utilisant comme plante de référence la carotte *Daucus carota* et la betterave *Beta vulgaris*.

Suite à tous les travaux rapportés sur le sujet il peut être conclu qu'on ne peut pas affirmer que le transport du B se fasse de façon active ou passive. En effet toutes les expériences ne se sont pas ciblées sur une seule plante, les concentrations de B utilisées n'étaient pas rigoureusement les mêmes et les complexes formés par le B avec la membrane cellulaire ne sont pas tous connus.

Cependant, l'absorption du B par la plante est plus vraisemblablement expliquée par une absorption passive de l'acide borique au sein des cellules, suivie d'une rapide complexation dans le cytoplasme et la membrane cellulaire (Hu et Brown, 1997).

Les mécanismes de cette absorption ne sont pas encore bien connus, cependant l'analyse de la différence des coefficients de perméabilité des membranes amorcée par Raven (1980) pourrait s'avérer d'une grande utilité pour la suite des recherches en ce domaine (Hu et Brown, 1997).

Les rôles du B dans la plante :

Le B joue un rôle dans la synthèse de la lignine, dans le transport des phosphates à travers la paroi cellulaire, dans l'activité de l'ATPase, dans le transport du sucre au sein de la plante et de nombreux autres rôles qui sont tout autant indispensables au métabolisme de la plante. En annexe 4 sont développés les rôles du B concernant la consolidation de la membrane et la protection de la cellule contre le peroxyde d'hydrogène.

IV.2 Le Cadmium (Cd)

IV.2.1 Présentation, concentration dans l'environnement et effets sur l'homme

Ses propriétés chimiques sont analogues à celles du Zn et on le rencontre dans les minerais sous forme de sulfure, en compagnie du Zn et du Pb. L'état métallique est utilisé principalement pour la protection de l'acier contre la corrosion par galvanoplastie. Les sulfures et le Se sont largement employés comme pigments dans les matières plastiques. Les composés du Cd sont utilisés dans les batteries électriques, les composants électroniques et les réacteurs nucléaires (Ros et Slooff, 1987; Friberg *et al.*, 1986).

Les engrais produits à partir de minerais phosphatés constituent l'une des principales sources diffuses de pollution par le Cd. La solubilité du Cd dans l'eau dépend beaucoup de l'acidité; le Cd en suspension ou lié aux sédiments peut se dissoudre si l'acidité augmente (Ros et Slooff, 1987).

Dans les eaux naturelles, le Cd se rencontre principalement dans les dépôts de sédiments et les particules en suspension (Friberg *et al.*, 1986).

Le Cd peut être dosé par spectroscopie d'absorption atomique, l'atomisation se faisant soit par aspiration directe dans une flamme, soit dans un four (cf annexe 3).

La limite de dosage est de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ avec la première méthode et 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Ware, 1989, International Organization for Standardization, 1985).

Dans l'air :

L'absorption par inhalation est en général de 0,8 $\mu\text{g}\cdot\text{j}^{-1}$ dans la population générale (World Health Organization, 1989). L'usage du tabac augmente la concentration de Cd. Une personne qui fume 20 cigarettes par jour absorbe ainsi 2 à 4 μg de Cd (Ros et Slooff, 1987).

Dans l'eau :

Les concentrations de Cd dans les eaux naturelles non polluées sont généralement inférieures à 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Friberg *et al.*, 1986).

Dans les aliments :

La nourriture est la principale source d'absorption de Cd. Le Cd peut se concentrer dans les plantes cultivées sur des terrains pollués ou irrigués avec de l'eau polluée.

Sur la base des concentrations mesurées en 1977–84, l'apport quotidien d'origine alimentaire aux Pays-Bas est estimé à 20 µg/personne (International Agency for Research on Cancer 1976). Selon une autre estimation, cet apport serait compris entre 10 et 35 µg (Galal-Gorchev, 1991). Dans des régions contaminées du Japon, d'après les analyses de sels, l'apport quotidien en 1980 était de l'ordre de 150 à 250 µg.

Exposition humaine:

Les aliments sont donc la principale source d'exposition au Cd avec des apports de l'ordre de 10 à 35 µg.j⁻¹. La contribution de l'eau de boisson est généralement inférieure à 2 µg.j⁻¹ (World Health Organization, 1989). Le tabagisme entraîne une augmentation de l'exposition. En Europe de l'Ouest, aux Etats-Unis d'Amérique et en Australie, l'absorption quotidienne moyenne par voie orale pour les non-fumeurs vivant dans des zones non polluées est de 10 à 25 µg (World Health Organization, 1992).

Effets sur l'homme

Un exemple des effets sur la santé d'une trop grande ingestion de Cd est celui de cette famille japonaise qui consomma du riz cultivé sur un sol contaminé par les déchets provenant d'une mine de zinc. En effet il s'en suivit le développement de la maladie dite « Itai-itai ». La dose létale par voie orale pour l'homme a été évaluée à 350-3500 mg de Cd; une dose de 3 mg est sans effet chez l'adulte (Krajnc *et al.*, 1987).

IV.2.2 Le Cd dans les plantes

Tous les mécanismes contrôlant l'absorption et l'accumulation du Cd par les plantes sont mals connus. L'absorption du Cd à travers la membrane plasmique des cellules racinaires est contrôlée par la différence de potentiel électrochimique créée par l'activité des ions Cd²⁺ dans le cytosol et dans l'apoplasme. L'absorption du Cd par les racines pourrait s'opérer par deux différents types de transport membranaire : i) via un transporteur actif ayant un palier de saturation ii) ou via diffusion à travers des protéines canaux offrant ici une cinétique de transfert linéaire en fonction des différences de concentration. (Costa et Morel, 1993).

Le Cd peut également être absorbé sous forme de complexes inorganiques et organiques tels que CdCl⁺, CdCl₂⁰ et les complexes phytométallophores respectivement (Mc Laughlin *et al.*, 1997). Il a été rapporté par exemple que les racines du maïs pouvaient absorber abondamment des complexes Zn(II)-phytométallophores et que les parois membranaires n'étaient pas hautement spécifiques à l'assimilation des complexes Fe(III)-phytométallophores permettant ainsi le transport d'autres métaux tels que le Cd (Von Wiren *et al.*, 1996)

La structure d'un métallophore qui peut être « utilisé » par le Cd pour pénétrer au sein de la plante est montrée en annexe 4 ainsi que son probable mécanisme d'assimilation dans la cellule.

Si le transport du Cd dans la plante est mal connu, aucun rôle biologique n'a encore été associé à son absorption.

Afin de mieux appréhender le rôle des différents paramètres influençant l'absorption du B et du Cd, il a donc été étudié, en parallèle des peupliers plantés sur le site de Kopu, des lysimètres présentés ci-après, ainsi que plusieurs centaines de clones constituant pour leur part la partie d'étude de l'influence du génotype sur cette absorption.

Chapitre 2 : La phytoremédiation d'un site contaminé et une étude parallèle

I Introduction

Comme dit précédemment, toutes les plantes ont le potentiel d'extraire les métaux lourds du sol compris dans leur périphérie racinaire. Quelques un de ces métaux sont indispensables au bon fonctionnement du métabolisme de la plante ; d'autres qui n'ont pas un rôle essentiel sont extraits en fonction du processus physiologique normal.

Cette absorption peut aussi faciliter leur entrée dans la chaîne alimentaire et, directement ou indirectement, causer des dommages aux écosystèmes et à la santé humaine.

La phytoremédiation est un type de phytoremédiation qui exploite l'accumulation des métaux lourds par les végétaux en utilisant une gestion stratégique des plantations afin de réhabiliter les sites pollués. Les études menées par McGrath *et al.* (1993) et Baker *et al.* (1994) ont montré que *Thlaspi caerulescens*, une plante accumulant d'inhabituelles quantité de Zn, Cd et Ni, pouvait être utilisée pour la rémédiation *in situ* de sites pollués par le Zn. Depuis ce rapport, de nombreux articles ont vu le jour, proposant l'utilisation de plantes pour extraire les métaux lourds de sites pollués.

La phytoextraction induit la récolte des plantes ayant extraits les métaux lourds du sol, et la plantation de nouvelles plantes similaires jusqu'à ce que la concentration de ces métaux lourds ait atteint un niveau acceptable. Après chaque récolte les plantes sont généralement incinérées, pour réduire leurs biomasse, puis stockées dans un lieu sûr pour l'environnement.

Nicks et Chambers (1994) ont reporté une seconde utilisation possible des plantes hyperaccumulatrices : le « phytomining » consiste à récupérer les métaux par les plantes à des fins économiques.

La prédiction de l'accumulation des métaux lourds par les plantes est donc cruciale pour la conception de stratégie de gestion des sites pollués. En Nouvelle Zélande, de nombreux terrains comportent d'importantes charges en métaux lourds dues à la proximité d'un site pollué ou à l'application trop fréquentes de boues de station d'épuration.

I.1 L'accumulation des métaux comme une fonction de leur biodisponibilité et de la transpiration des plantes

L'accumulation des métaux par les plantes s'appuie sur le fonctionnement des plantes en tant que « biopompe » solaire-dépendante. L'eau drainée par les racines de la plante est acheminée par les tiges puis perdue par évaporation à travers les feuilles. N'importe quel métal absorbé par la plante sera accumulé soit dans les racines soit dans les feuilles. Les concentrations les plus importantes ont été retrouvées dans les feuilles (Brooks *et al.*, 1998), cela n'est pas surprenant puisqu'elles sont le siège de la plus grande proportion en eau de la plante également. Il a été montré que l'absorption des métaux par les plantes était liée à leur consommation d'eau (Salt *et al.*, 1995; Hinchman *et al.*, 1996). Il a été considéré que la quantité totale de métal M (mg) extraite par la plante serait donc proportionnel à la transpiration T ($L \cdot j^{-1}$) sur une période t (jours) :

$$M \propto \int_0^t T(t') dt \quad [1]$$

L'eau absorbée par la plante a du tout d'abord circuler dans le sol, ce faisant seulement une proportion des métaux présents dans le sol ont été dissouds, l'autre proportion étant soit liée aux particules minérales soit à la matière organique. Cette proportion n'est donc pas accessible à la plante. Dorénavant la quantité totale de métaux absorbée par la plante est considérée comme reliée à la concentration des métaux dissouds (Robinson *et al.*, 1998; Robinson *et al.*, 2000) :

$$M \propto [C] \quad [2]$$

I.2 Le facteur d'absorption racinaire

La quantité totale de métaux absorbée par la plante n'égale cependant pas la concentration de métaux dissouds, fois la quantité d'eau transpirée par la plante, en effet les métaux doivent tout d'abord franchir les racines par voie apoplasmique ou symplasmique (Marschner, 1995) voies où existent des filtres actifs et passifs.

Le facteur d'absorption racinaire est défini comme suit :

$$\phi = \frac{[C]_r}{[C]} \quad [3]$$

Où $[C]_r$ est la concentration en métaux ($mg L^{-1}$) dans le xylème des racines et $[C]$ est la concentration en métaux lourds biodisponibles ($mg L^{-1}$).

Ce paramètre est une simple prise en compte de nombreux facteurs biogéochimiques qui interviennent dans le mécanisme de transfert des métaux du sol vers les racines, comme la température, le pH, la concentration des ions compétitifs, l'activité rhizobiologique, etc. De plus ce facteur peut varier avec la concentration des métaux dans le sol, ce qui est plus particulièrement le cas pour les éléments essentiels tels que le Fe, le Cu, le Zn, et le Mn.

I.3 Le facteur d'absorption racinaire et le comportement des plantes face aux métaux lourds

Rappelons que Baker (1981) a divisé les plantes en trois groupes selon leur réponse à la concentration des métaux lourds dissous. Pour les éléments tels que le Cd, le Ni et l'arsenic les plantes ayant un ϕ très faible, sont qualifiées de plantes « exclusives ». La plupart des plantes vivant sur des sols métallifères sont reconnues comme étant exclusives.

Les plantes ayant un ϕ relativement constant quelque soit les métaux, sont dites « indicatrices ». Dans ce cas la concentration dans la plante est proportionnelle à la concentration des métaux lourds biodisponibles. Cela concerne la plupart des plantes n'apparaissant pas naturellement sur des sols métallifères.

La troisième catégorie de plantes sont celles qui tolèrent de très fortes concentrations de métaux lourds dans leurs parties aériennes, ou alors qui possèdent une fonction d'absorption active de ces métaux. Ces plantes ont un ϕ très élevé, et sont connues sous le nom de plantes « hyperaccumulatrices ».

Pour les plantes exclusives et hyperaccumulatrices, ϕ s'avère constant pour une marge de concentration très étroite. Il peut donc y avoir une augmentation soudaine de la concentration des métaux dans la plante à la concentration élevée de ces mêmes métaux biodisponibles dans le sol. A ce moment là, la régulation d'entrée des métaux dans la plante est perturbée et les métaux diffusent au sein de la plante via le mécanisme de pompage dû à la transpiration. Quand ce phénomène apparaît, les plantes montrent des symptômes de toxicité et la production de biomasse chute.

Ce changement de ϕ dû à la concentration peut être représenté par une constante K :

$$\phi(C) = \frac{\phi_1 C_1}{C_1 + K(C - C_1)} \quad [4]$$

Où K ($0 < K < 1$), $\phi(c)$ est égal au facteur d'absorption racinaire à la concentration de métaux biodisponibles C (mg L^{-1}), et ϕ_1 est le facteur d'absorption racinaire à la concentration de métaux biodisponibles C_1 (mg.L^{-1}).

I.4 Estimation du facteur d'absorption racinaire

Le ϕ spécifique de chaque plante peut être approché en utilisant sa consommation totale d'eau, sa production de biomasse aérienne, et la concentration de métaux lourds biodisponibles.

Soit :

$$\phi = \frac{MB}{\sum_T C}, \quad [5]$$

Où ϕ est égal au facteur d'absorption racinaire pour un métal (sans dimension), M est égal à la concentration en métal dans la biomasse aérienne (mg.kg^{-1}), B est égale à la biomasse aérienne (kg), $\sum T$ est égal à la consommation totale d'eau (L), et C est égale à la concentration des métaux biodisponibles (mg.L^{-1}).

I.5 Modélisation de l'extraction des métaux par la plante

La concentration des métaux biodisponibles et par conséquent la quantité de métaux susceptible de pénétrer dans la plante sera dépendante de la profondeur, ainsi que de la densité racinaire. Il sera supposé que l'extraction de ces métaux dépendra de la densité racinaire, ce qui nous mène à la proposition du modèle suivant :

$$M(t) = \int_0^{z_R} \int_0^t R(t', z) T(t') C(t'z) \phi(C(t'z)) dt dz \quad [6]$$

La concentration moyenne dans la plante est donc :

$$[M] = M / B, \quad [7]$$

Où M= le montant total de métaux extraits par la plante au temps t, [M] est la concentration moyenne de métaux dans la plante (mg.kg^{-1}), B= biomasse souterraine (kg), z_R = profondeur totale (m), z= profondeur (m), t= temps (j), $R(t', z)$ = fraction de la densité racinaire [(masse des racines à la profondeur z)/(masse totale des racines) au temps t, T= consommation d'eau (L.j^{-1} au temps t), C= concentration des métaux biodisponibles (mg.L^{-1}) à la profondeur z et au temps t), ϕ = facteur d'absorption racinaire pour un métal donné à la profondeur z et au temps t.

I.6 Le but de cette étude

Le but de cette étude st de vérifier ce modèle simple afin qu'il puisse être utilisé pour estimer l'accumulation du B dans les peupliers qui poussent sur le site de Kopu.

II Matériel et méthodes

II.1 Les lysimètres

Les expériences en lysimètres ont été conduites dans une serre à Hortresearch, Palmerston North, Nouvelle Zélande, à partir d'octobre 2000. Sept mille litres de sol du site de Kopu ont été prélevés et homogénéisés en utilisant un mixeur. La densité approximative du sol était de 0.23 et sa capacité à retenir l'eau de 420 mL.kg⁻¹. Ce sol a été réparti au sein de 8 lysimètres de 800 litres mis sur balance, dans chacun de ces lysimètres un peuplier de 1 mètre a été planté.

Ci-dessous sont jointes deux photos des lysimètres utilisés :



Figure 12 : Lysimètres, Hortresearch, Palmerston North, Nouvelle Zélande

Ces 8 peupliers ont été obtenus en croisant *Populus deltoides* et *Populus yunnanensis*. Ces lysimètres ont été différemment fertilisés avec une solution d'Hoagland comme suit:

- 2 lysimètres fertilisés à faible dose
- 3 lysimètres fertilisés à dose moyenne
- et 3 lysimètres fertilisés à forte dose.

Ces traitements différents ont pour but de montrer la capacité du modèle à prédire le comportement des plantes et plus particulièrement leur extraction de métaux lourds.

La moyenne de la concentration totale du B dans les lysimètres est de 42.8 mg kg⁻¹ et sa concentration biodisponible de 2.20 mg.L⁻¹ avec une erreur standard de 0.029. Chaque lysimètre a été alimenté de façon à ce que le volume d'eau soit compris entre 50 et 60% du volume total. Les eaux de lessivage ont été collectées chaque semaine, pesées et stockées pour des analyses ultérieures.

Une estimation de l'utilisation de la consommation d'eau par la plante a été faite en soustrayant le lessivage aux variations de poids quotidiennes. Il a été supposé que l'évaporation par la surface du lysimètre était négligeable. Tous les quinze jours 10% des feuilles ont été échantillonnées ; l'aire totale des feuilles et leur biomasse ont été estimées en déterminant le poids et la surface des feuilles prélevées.

II.2 Le site de Kopu

Le 26 Juillet 2000, cinq hectares de sol composés de sciures de bois à proximité de Kopu (Nouvelle Zélande) ont été plantés de peupliers, de saules et d'*Eucalyptus*. Le site a été fertilisé afin de pourvoir aux besoins essentiels des plantes. La croissance des arbres et la surface totale de leurs feuilles ont été évaluée en mesurant la taille de chacun d'entre eux. Ainsi pour les clones de peupliers : Kawa, Toa, et Yeogi trois spécimens (correspondant chacun à 25, 50 et 75% de la taille maximale mesurée pour chacune des espèces) ont été prélevés ; leurs feuilles et branches ont été séparées, séchées, pesées et stockées pour analyses ultérieures.

Une estimation des éléments absorbés par chaque clone a pu être assurée par une prise d'échantillons de feuilles dans chacune des rangées correspondantes aux clones Kawa, Yeogi et Toa. Il a également été prélevé des échantillons de sols au début au milieu et à la fin de chacune de ces rangées.

II.3 Préparation des échantillons et analyse

Toutes les feuilles (provenant des lysimètres et du site de Kopu) ont été séchées puis mis en poudre. Cette poudre a subi une minéralisation par de l'acide nitrique à 69% d'après le protocole suivant :

Les échantillons ont été placés dans une étuve à 80°C, puis après avoir pesé entre 0.150 g et 0.200 g de feuilles mises en poudre ou entre 0.200 g et 0.250 g de sol les échantillons sont disposés dans des Erlenmeyers de 50 ml. L'ajout de 10ml d'acide nitrique a été suivi d'une minéralisation sur un bloque chauffant, celui-ci étant réglé sur 400°C, les erlenmeyers y sont restés jusqu'à l'obtention d'un volume de 3 ml environ.

Enfin, après que les solutions soient redescendues à température ambiante elles ont été diluées grâce de l'eau distillée jusqu'à 10 ml en utilisant des tubes jaugés.

Les concentration du bore et du Cd ont été déterminées grâce à une technique appelée ICPEES (Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry cf annexe3).

II.4 Modélisation de l'extraction des métaux par les plantes

La variation de la concentration en métaux dans la plante a été estimée en utilisant les équations [6] et [7]. Plusieurs hypothèses ont cependant été formulées : la concentration des métaux dans le sol a été supposée constante quelque soit la profondeur, la concentration de métaux lourds biodisponibles a été approchée par la valeur de la concentration de ces métaux dans les eaux de drainages, enfin cette concentration peut être considérée constante (pour le modèle) à la vue de l'écart type obtenu précédemment.

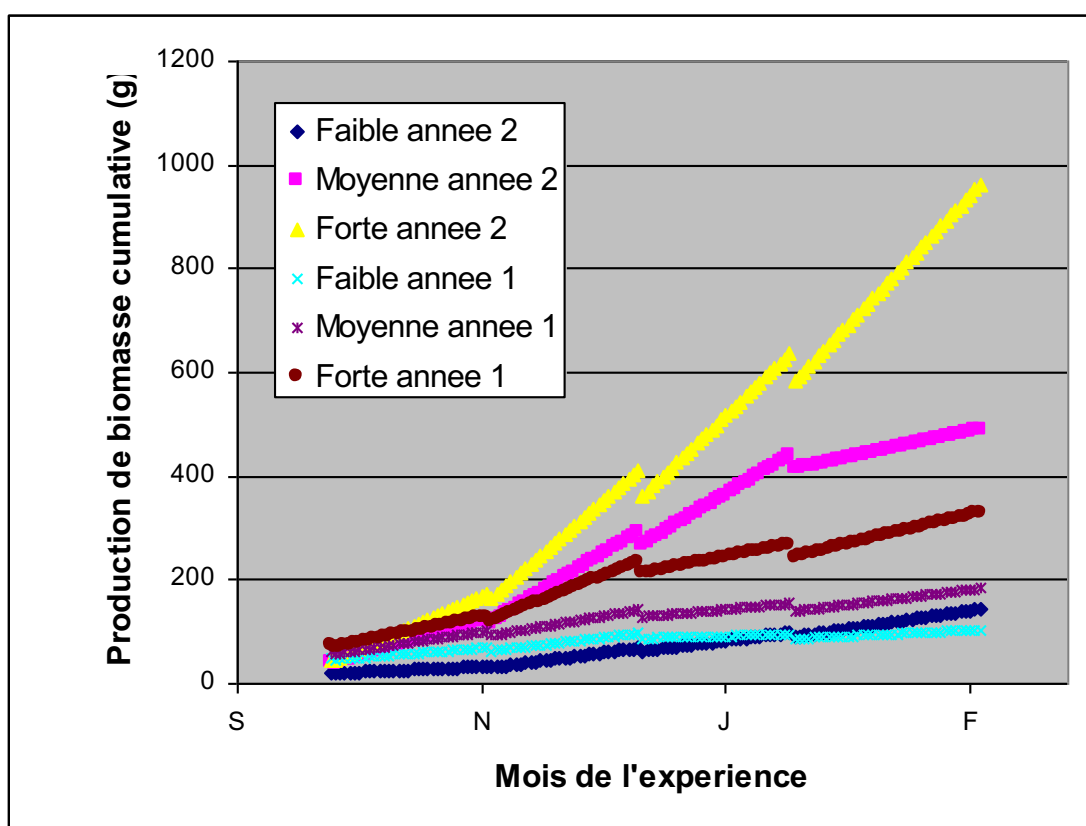
La concentration de métaux biodisponibles sur le site de Kopu a été approchée en multipliant la valeur de cette concentration (drainages), obtenue au sein des lysimètres, par le quotient des concentrations totales respectives. Ce calcul implique que l'isotherme de solubilité des métaux est considérée constante tout au long des mesures effectuées.

Il a été démontré précédemment la formule [5] utilisée pour apprécier le facteur d'absorption racinaire.

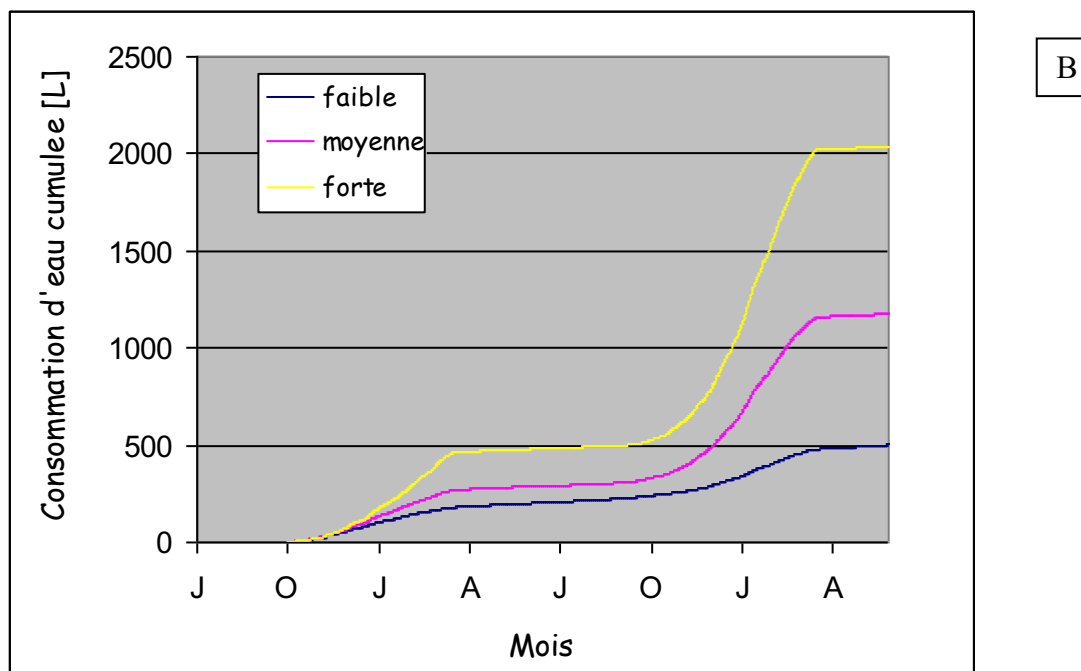
III Résultats et discussion

III.1 Les lysimètres

La figure 1(A) illustre la production de biomasse cumulée pour les trois traitements appliqués. Les arbres traités à faible dose d'azote ont montré des signes de déficiences comme de petites feuilles jaunes, alors que les arbres issus des traitements à moyenne et forte dose sont normaux. La figure 1(B) représente la consommation d'eau cumulée pour les trois types de traitement.



A



Figures 13: Consommation d'eau cumulée (A) et production de biomasse (B) en fonction du temps

L'augmentation observée est patente y compris en considérant la hausse de l'activité photosynthétique tout au long des saisons, cette augmentation est d'autant plus importante que la quantité d'eau transpirée par mètre carré de feuille est grande.

Il a été également constaté que la production de biomasse d'une année sur l'autre a énormément augmenté :

production totale de biomasse (g)	Lysimètre 1	Lysimètre 2	Lysimètre 3	Lysimètre 4	Lysimètre 5	Lysimètre 6	Lysimètre 7	Lysimètre 8
1ere annee	0.144	0.14195	0.03823	0.16349	0.16349	0.04140	0.04876	0.12117
2eme annee	0.4873	0.53724	0.0222	0.11448	0.71048	0.06105	0.40299	0.93024
rapport	3.4	3.8	0.6	0.7	4.4	1.5	8.3	7.7

Tableau 3 : Production de biomasse

En effet, en moyenne cette production est 4 fois plus importante que l'année précédente.

Cependant, tout comme l'année précédente la différence de concentration de métaux lourds dans les feuilles des arbres dans les lysimètres hautement et moyennement fertilisés n'est pas significative. Ces résultats indiquent que les nutriments apportés à la plante ont peu d'effets sur l'absorption des métaux lourds par les plantes.

Sur la figure 16 sont représentés les trois types de culture avec l'évolution de la concentration des métaux dans les feuilles

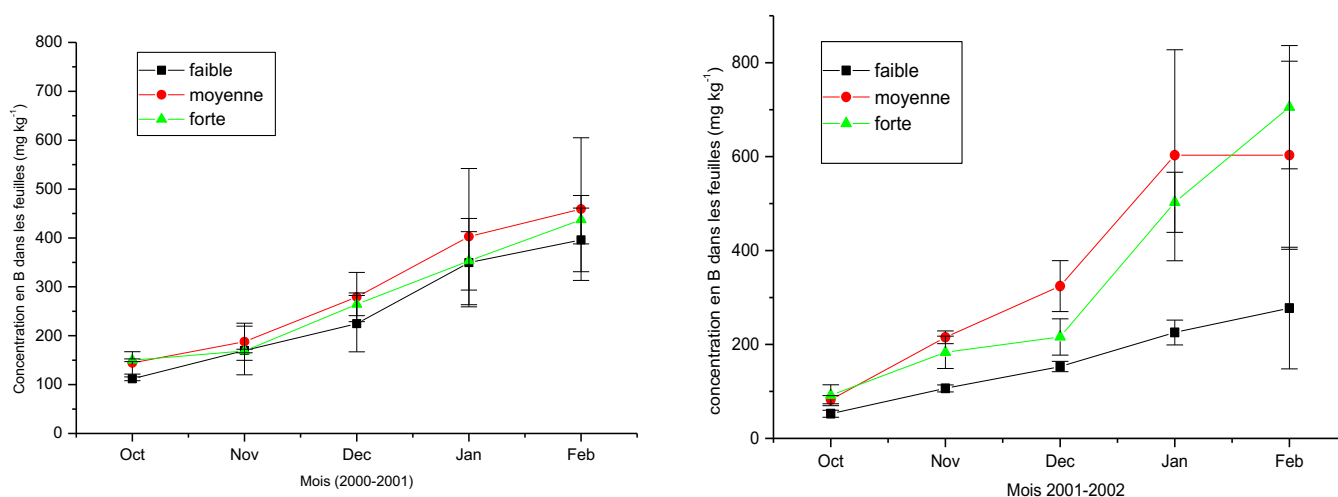


Figure 14: concentration du bore au sein des feuilles en fonction du temps pour les trois types de lysimètre.

Les T représentent sur tous graphes l'erreur standard, de la mesure, égale à l'écart type divisé par la racine carré du nombre de mesures effectuées.

D'une année sur l'autre on se rend compte que l'accumulation du B est beaucoup plus conséquente et la différence entre lysimètre faible et moyenne–forte dose de fertilisant se dessine plus clairement.

Mais doré et déjà il peut être affirmé que l'accumulation du B dans la plante est une fonction de la consommation en eau puisque les lysimètre plus fortement fertilisé consomme davantage d'eau et concentrent plus de B dans leurs feuilles.

De plus le graphique ci-dessous illustre un paramètre supplémentaire :

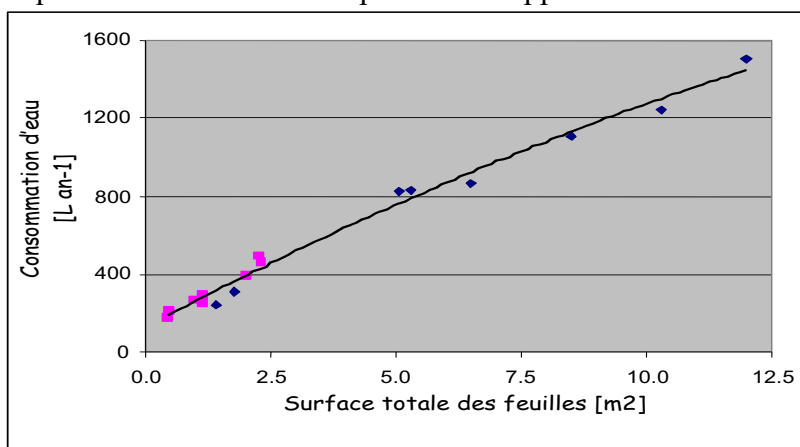
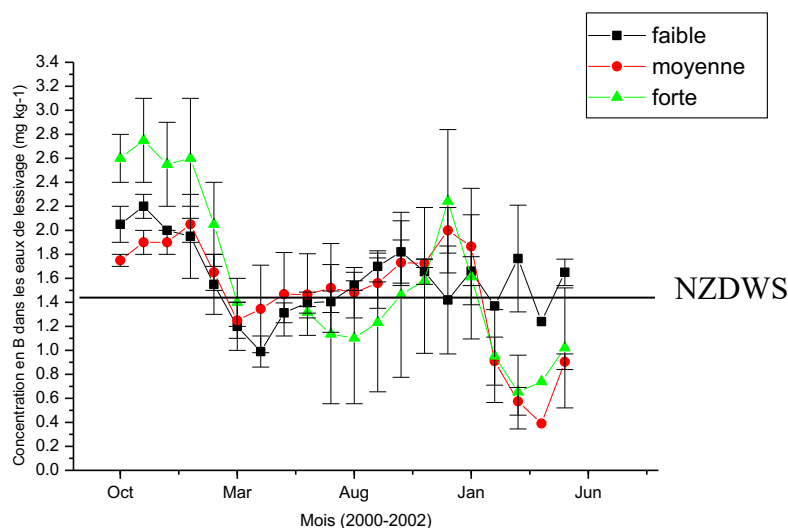


Figure 15 : Relation surface foliaire-consommation d'eau

En effet la consommation d'eau est directement liée à la surface totale des feuilles, donc il peut être affirmé également que l'absorption du B est une fonction de la biomasse produite par l'arbre.

Si l'observation de l'absorption du B par les plantes est importante, il nous faut également observer l'impact qu'ont les arbres sur les eaux qui s'infiltrent et qui sont par la suite rejetées dans le milieu naturel.

Pour cela la concentration du B dans les eaux de lessivage a été surveillée et le graphique ci-dessous en donne les résultats :



Utilisation du modèle

Avant d'utiliser le modèle décrit dans la partie précédente il nous faut tout d'abord étudier le facteur d'absorption racinaire. En effet, celui-ci a pu changer suite à la modification architecturale des racines.

Calcul de ϕ :

D'après la formule [3] on a vu que :

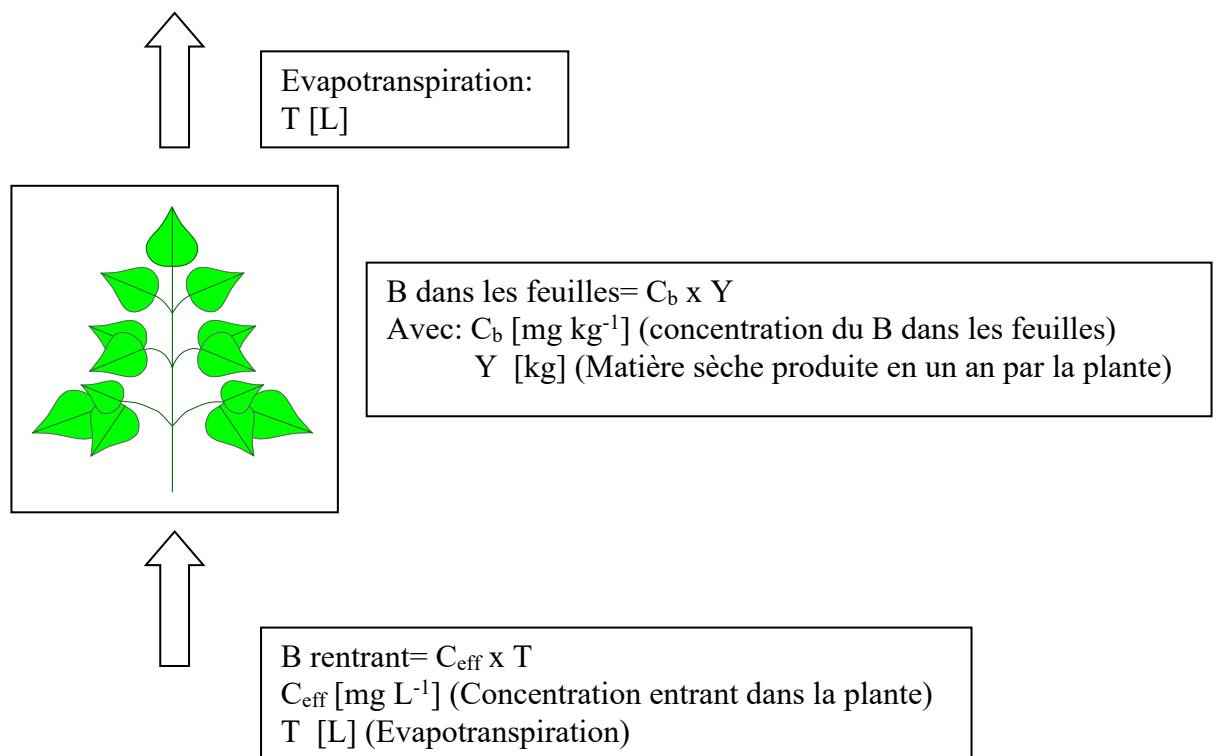
$$\phi = \frac{[C]_r}{[C]}$$

Où $[C]_r$ est la concentration en métaux (mg.L^{-1}) dans le xylème des racines et $[C]$ est la concentration en métaux lourds biodisponible (mg.L^{-1}). La concentration du B au sein du xylème peut être obtenue en faisant le bilan qui suit :

Bilan en quantité de B

Entrée = sortie + accumulation

Or tout le B absorbé par la plante est conservé, il n'y a aucune perte par transpiration.



Ce qui signifie que :

Entrée = accumulation

$$C_{\text{eff}} \times T = C_b \times Y$$

Par conséquent :

$$C_{\text{eff}} = C_b Y / T \quad [\text{mg.L}^{-1}]$$

C_{eff} ou $[C]_r$ est donc la concentration de B qu'il y a du avoir au sein de la plante (transporté par l'intermédiaire du xylème) pour retrouver, avec la transpiration observée, la concentration finale obtenue dans les feuilles.

Reportant cette concentration calculée en fonction de la concentration mesurée au sein des eaux de drainage, il sera donc possible d'accéder à ϕ .

Ainsi pour la première et la deuxième année deux résultats différents ont été obtenus :

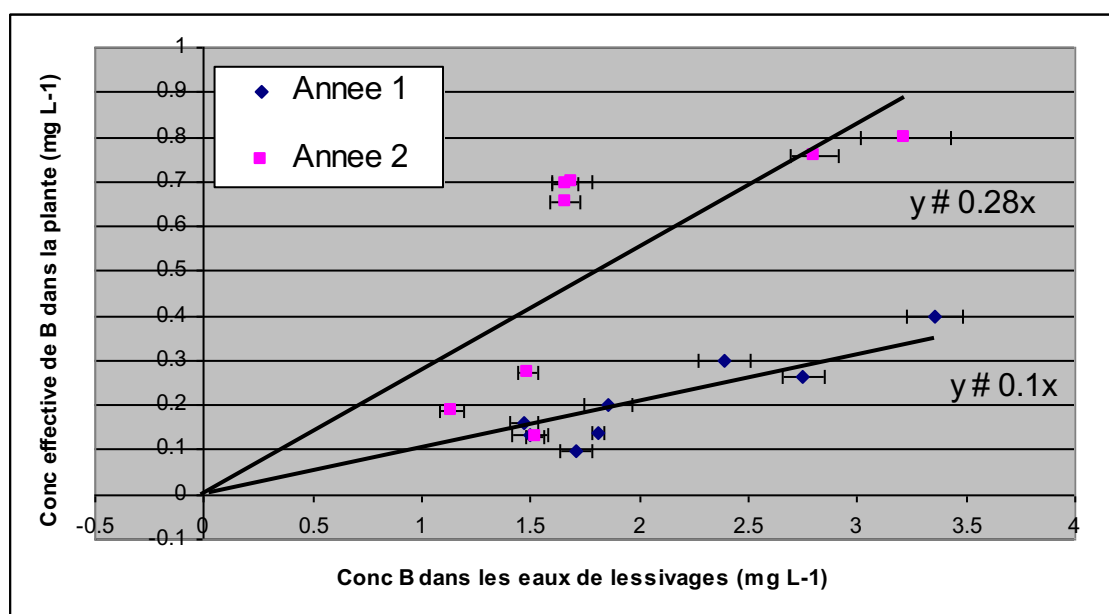


Figure 17 : détermination du facteur d'absorption racinaire

D'où la valeur du facteur d'absorption racinaire :

$$\phi = 0.28$$

Cette valeur théorique est approximative. En effet on pourrait également considérer que pour les lysimètres à moyenne et faible nutrition la concentration effective circulant dans la plante est de 0.75 mg.L^{-1} et pour les lysimètres à forte nutrition de 0.2 mg.L^{-1} .

Cependant pour la suite de l'étude nous intégrerons ce facteur dans le modèle précédemment évoqué.

La figure 18 montre la comparaison entre les prédictions du modèle (utilisant les équations [5] et [6] avec les simplifications apportées par les hypothèses) et les concentrations en B mesurées dans les feuilles.

Rappel :

$$[M] = \frac{\int_0^t \phi TC dt}{\int_0^t r dt}$$

Avec :

$[M]$ concentration en métal dans la plante (mg kg^{-1})

T Evapotranspiration (L day^{-1})

C B biodisponible (mg L^{-1})

r facteur de croissance (kg day^{-1})

ϕ facteur d'absorption racinaire (sans dimensions pris égal à 0.28)

N'ont été pris en compte que les résultats obtenus avec les lysimètres à moyenne et forte nutrition.

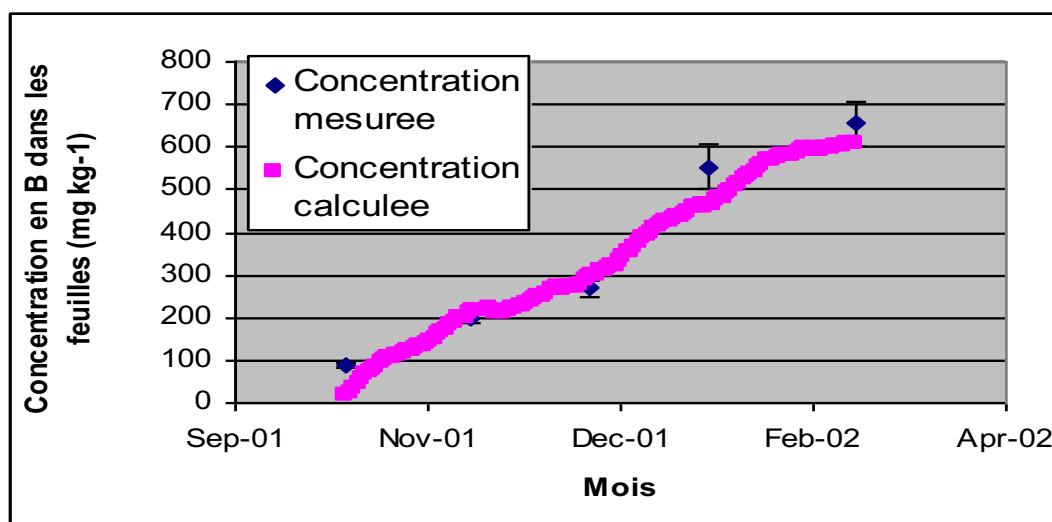


Figure 18 : Comparaison modèle-mesures

Le modèle offre donc une excellente idée de la concentration que l'on va obtenir au bout d'un temps donné.

III.2 Le site de Kopu

Le site de Kopu offre une opportunité de vérification du modèle. En effet en évaluant la concentration en B biodisponible sur le site il sera alors possible d'accéder à la concentration dans les feuilles grâce au modèle puis de confronter les résultats avec les concentrations mesurées.

Notons que terrain s'est montré très hétérogène, en effet comme l'illustre le schéma ci-dessous le pH varie énormément de part et d'autres du terrain et la concentration totale en Bore également.

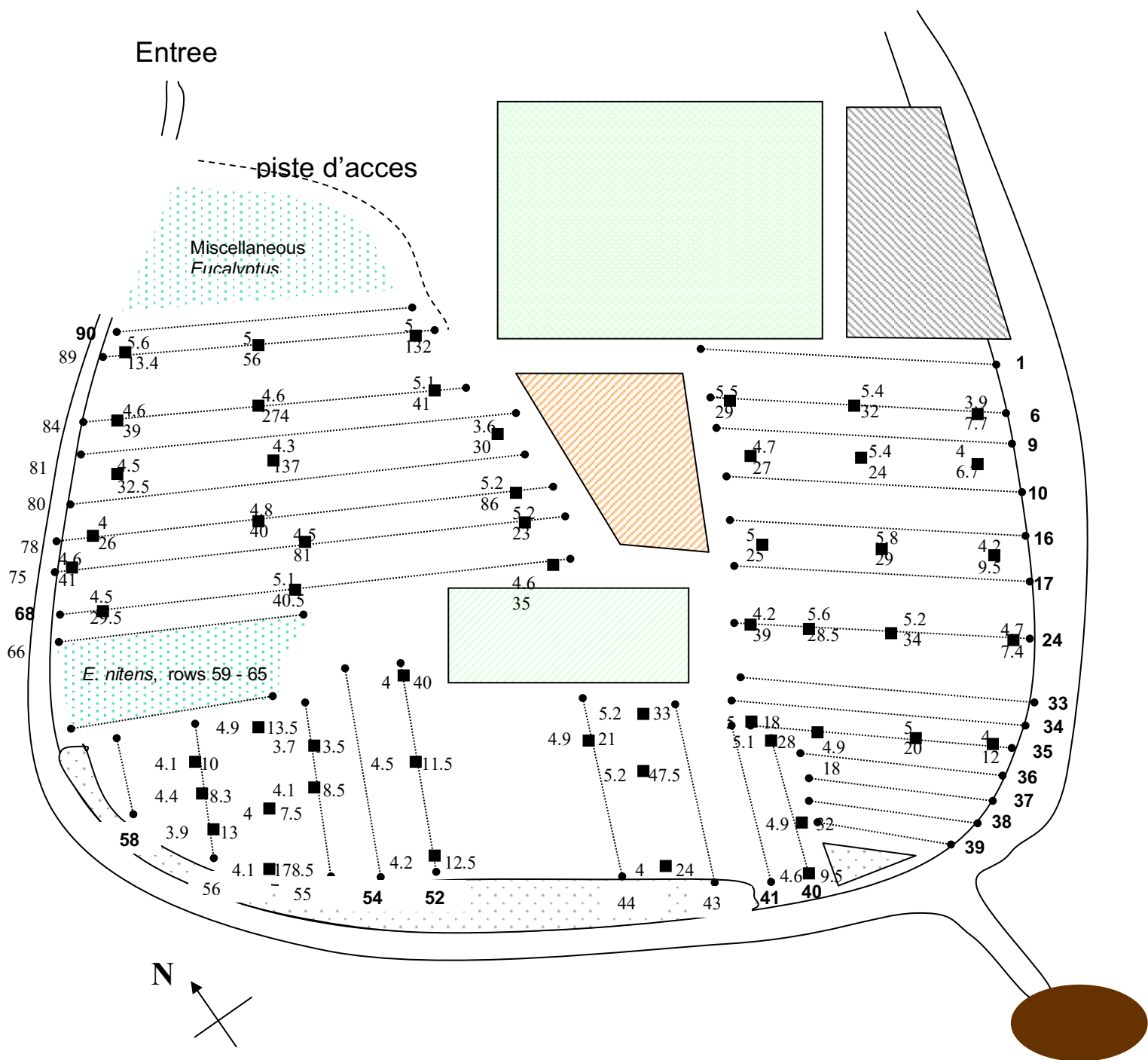


Figure 19: Hétérogénéité du site de Kopu. La valeur du pH se trouve au dessus ou à gauche pour chaque point de mesure, la valeur de la concentration du B se situe en dessous ou à droite(mg.kg⁻¹)

La valeur du pH fluctue entre 3.6 et 5.8, pendant que la concentration en B varie de 7.4 à 274 mg.kg⁻¹, le site est donc particulièrement hétérogène.

A l'aide des concentrations trouvées au sein des lysimètres, peut être évaluée la concentration biodisponible en reliant la concentration totale mesurée avec la concentration du B retrouvée dans les eaux de lessivage . Il a été constaté que la concentration biodisponible en B était en moyenne 21 fois plus faible que la concentration totale de B présente dans le sol.

En utilisant la formule [6] simplifiée par les hypothèses il est maintenant possible de dire :

$$[M] = \frac{\int_0^t \phi TC dt}{\int_0^t r dt}$$

Les mesures faites sur les lysimètres ont permis de poser

$$\frac{\int_0^t T}{\int_0^t r} = 1000 \text{ L kg}^{-1}$$

En effet il a fallu 1000 litre d'eau en moyenne pour produire 1 kilo de matière sèche de feuilles. Il vient :

$$[B] = \frac{1000 \times Ct_{tot} \times \phi}{21}$$

Avec :

C_{tot} concentration totale de B dans le sol (mg kg^{-1})

[B] concentration de B dans les feuilles (mg kg^{-1})

ϕ le facteur d'absorption racinaire

Ci-après sont représentés les résultats de la confrontation des valeurs calculées et des valeurs mesurées

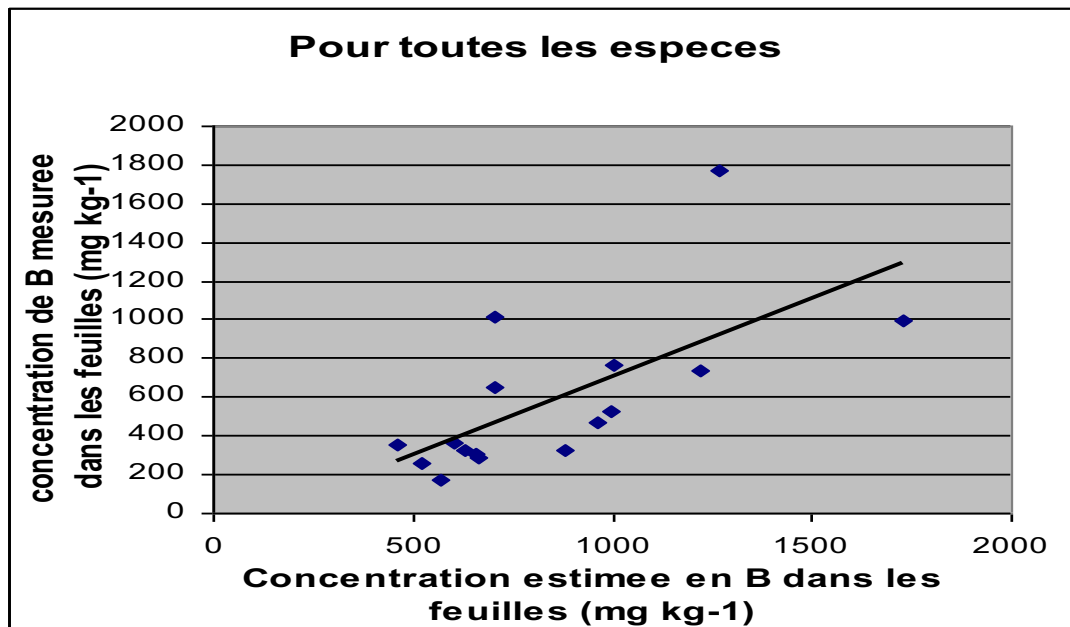


Figure 20 : validité du modèle

Avec $R=0.73$ sachant que le degré de liberté est de 11, cette corrélation est très significative, il sera donc possible de prédire la concentration approximative du B dans les feuilles d'arbres plantés sur un autre site que celui de Kopu.

Cependant avec ce modèle simple, il n'est pas pris en considération, la variation de pH, la possible présence de composés toxiques, et d'autres paramètres qui auraient pu influencer sur cette concentration en B dans les feuilles. En effet il faut utiliser ce modèle avec précaution et être conscient qu'il ne donne qu'une idée générale du devenir du B dans la plante, de plus il a été vu que le terrain était très hétérogène ce qui incite encore plus de précaution à son utilisation.

IV Conclusion

Les peupliers s'avèrent être d'excellents accumulateurs de B et leur production de biomasse quadruple en moyenne d'une année sur l'autre. Le Cd n'était pas en quantité suffisante pour être détecté dans le sol mais il a été vu que les peupliers suffisamment alimentés en nutriments offrent une solution de traitement des sols, puisqu'en effet les eaux de lessivage sont de moins en moins concentrées et la concentration en B dans le sol baisse de façon significative.

Il a été vu que l'accumulation du B dans les plantes dépend donc des éléments qui sont à sa disposition, en effet si la plante manque d'éléments essentiels cette accumulation sera plus faible que dans les autres cas. Cette accumulation est fonction de la consommation d'eau mais aussi de la biomasse produite.

Le paramètre qui semble être le plus important dans la régulation d'absorption du B par les plantes, est le facteur d'absorption racinaire. En effet si celui ci augmente, la concentration en B dans la plante croît de façon extrêmement significative ; pour accroître la capacité des plantes à absorber le B il faudrait donc jouer sur ce facteur.

C'est ce qui a été tenté dans la partie qui va suivre, plusieurs clones de peupliers ont été mis dans des conditions environnementales tout à fait similaires pour comparer leur aptitude à assimiler le B dans leurs parties aériennes.

Chapitre 3 : L'accumulation du Cd et du B comme une fonction du genotype

I Introduction

Nous avons vu que l'accumulation du B était une fonction de la consommation d'eau, de la concentration biodisponible en B et de ϕ (propre à chaque espèce). Nous allons donc voir l'effet du génotype sur ϕ , les clones étant placés dans un environnement identique la variation de concentration de B et de Cd dans les feuilles sera une conséquence directe du génotype de l'individu.

Les peupliers sont communément utilisés en Nouvelle Zélande comme fourrage en période de sécheresse (Wilkinson *et al.*, 1999) en effet les feuilles et les ramilles peuvent être broutées pas les moutons et le bétail (Hathaway 1986; Douglas *et al.*, 1996). Mais outre cette fonction ces même arbres peuvent être utilisés pour la conservation et la réhabilitation de sites contaminés. En effet, la capacité des peupliers à accumuler le B et le Cd a déjà été exploitée pour la réhabilitation de sols contaminés (Ostman 1994; Greger *et al.*, 1997; Greger *et al.*, 1999; Robinson *et al.*, 2000).

La phytoremédiation de sols pollués par le Cd et le B impliquerait une taille régulière des arbres ; le matériel ainsi récolté pourrait être incinéré avec un précipitateur Cotrell pour éviter la perte des métaux au sein des fumées dégagées (Graham et Cragg, 1959). Les cendres produites pourront être stockées dans des décharges appropriées. Notons également que l'énergie produite par cette incinération pourrait être utilisée pour fournir de l'électricité (Nixon *et al.*, 2001).

Ce procédé de traitement a certainement un avenir aux vues du nombre de sites concernés par une contamination en Nouvelle Zélande. En effet une vingtaine de sites répartis dans tout le pays sont concernés par une pollution couplée B et Cd. Ces sites sont le résultat d'un stockage, sur plusieurs années, de sciures de bois provenant d'exploitations forestières. La conservation des troncs impliquait une application de produits contenant des métaux lourds et c'est pour cela que les sites de stockage de sciures (« sawdust pile ») sont des sites en majorité, classés contaminés.

Cette étude a donc pour but de déterminer un lien entre le génotype d'individus et l'accumulation dans leurs feuilles, des métaux cités. Pour, par la suite pouvoir sélectionner les meilleurs clones afin de les utiliser dans le procédé de phytoremédiation.

II Matériel et méthode

Les expériences ont été conduites à HortResearch, Palmerston North, Nouvelle Zélande (latitude 40.2°S, longitude 175.4°E). Les peupliers *Populus deltoides* NZ 75144-49 et *Populus deltoides* NZ 75144-53 ont été croisés pour donner 342 plants différents (« frères et soeur »).

De 200 de ces plants ont été réalisé 4 réplicats, par clonage (création de plantes filles à partir d'une seule et même plante mère, et par conséquent possédant le même génotype ; le bouturage est un exemple de clonage)

Ainsi 1000 litres de sol ont été préparés contenant environ 10mg kg⁻¹ Cd , 60 mg kg⁻¹ B au sein de Ca(NO₃)₂ et de Na₂BO₃ respectivement. Huit cents sacs en plastique de 1,2 litre ont été remplis de cette mixture. Quatre réplicats clones, des 200 peupliers, ont été plantés dans ce seul type de sol. Le matériel de clonage provenait de la pépinière d'Aokautere, nous supposons donc que le métal que représente le matériel de clonage n'influencera pas la concentration en métal dans les feuilles récoltées. Les conditions de culture ont donc été rigoureusement les mêmes pour chaque arbre afin d'étudier l'influence du génotype dans l'assimilation du B et du Cd.

Photos :





Figure 21 : Serre :expérience génétique.

Les feuilles récoltées, ont été séchées puis mises en poudre. Enfin cette poudre a subi une minéralisation par de l'acide nitrique à 69% d'après le protocole suivant :

Les échantillons ont été placés dans un four à 80°C, puis après avoir pesé entre 0.150 g et 0.200g de feuilles mises en poudre ou entre 0.200 g et 0.250 g de sol ceux-ci sont disposés dans des Erlenmeyers de 50 ml. L'ajout de 10ml d'acide nitrique a été suivi d'une « digestion » sur un bloque chauffant, celui-ci étant réglé sur 400°C les erlenmeyers y sont restés jusqu'à l'obtention d'un volume de 3 ml environ.

Enfin après que les solutions soient redescendues à températures ambiantes elles ont été diluées grâce de l'eau distillée jusqu'à 10 ml en utilisant des tubes jaugés.

Les tubes ont ensuite été envoyés à Hamilton à E-lab.limited pour être analysés par la méthode d'ICPS (dans le cas du Bore), ou analysés par FAAS à Massey University Palmerston North (dans le cas du Cd) .

III Résultats et discussion

Le logiciel utilisé pour l'analyse des données obtenues est MINITAB, et le test de Fisher a été utilisé pour déterminer s'il existait une différence significative d'accumulation de métal entre les différents clones.

III.1 Accumulation du Bore

Les moyennes de concentration sont représentées par les barres et les T représentent l'écart type de chaque population de clones.

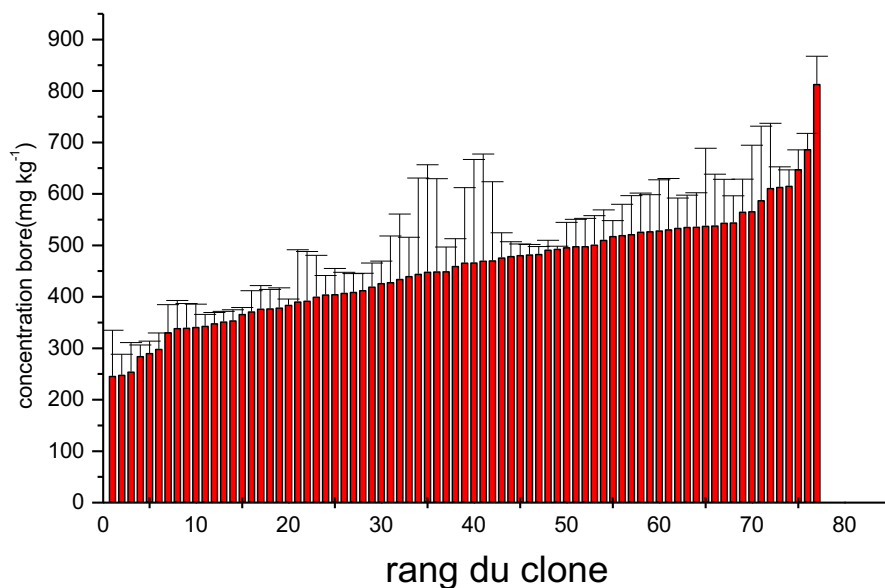


Figure 22: L'accumulation du B par les clones

Afin de savoir s'il existe vraiment une différence significative entre ces populations de clones, le test de Fisher est préconisé. En effet ce test est utilisé dans le cas de comparaison de plusieurs moyennes, leur distribution doit suivre une loi normale et leurs variances doivent être du même ordre de grandeur. On considère communément qu'une valeur de F correspondant à un seuil $p < 0,05$ traduit une différence significative entre les moyennes. Si $p < 0,01$, alors la différence est très significative.

La correspondance entre la valeur de F et p se fait par le logiciel Minitab.
Les résultats que donnent ANOVA (ANalysis Of Variance) sont les suivants :

One-way Analysis of Variance					
Analysis of Variance for raw					
Source	DF	SS	MS	F	P
RANK	51	1636288	32084	1.17	0.242
Error	120	3291242	27427		
Total	171	4927531			

Tableau 4 : Test B

Sacant que :

DF : degree of freedom

SS : Sum of Squares

MS : Mean Square (Rank : représente la variabilité entre les groupes ; Error : représente la variabilité au sein des groupes).

F : est égal à MS rank / MS Error

p : probabilité pour qu'il n'y ait aucune différence significative entre les individus.

Pour plus d'explication concernant ces tests se référer à l'annexe 5. Ici nous pouvons dire que les résultats obtenus ne sont pas significativement différents ($p > 0.05$), ce qui veut dire que dans notre cas, qu'on ne peut pas à partir de ces échantillons déterminer un lien précis entre génotype et accumulation du B dans ces plantes.

III.2 Accumulation du Cd

Celle-ci a un aspect différent si il est représenté concentration du Cd dans les feuilles en fonction du numéro du clone, voir page suivante.

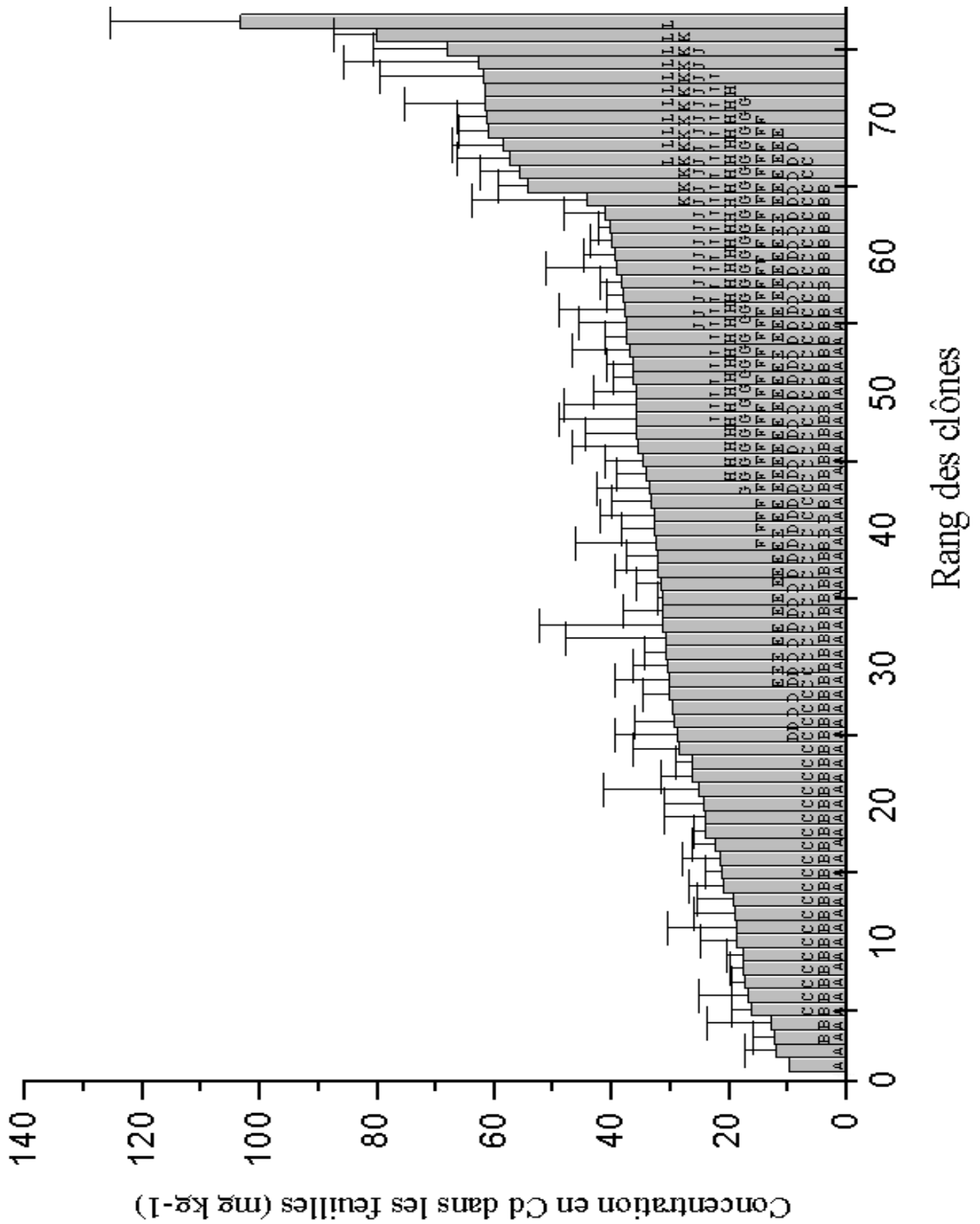


Figure 23 : Accumulation du Cd par les plantes

Une cassure s'aperçoit nettement au niveau du clone labellé numéro 65, mais pour confirmer cette différence nous avons également fait appel au test dit de Fisher et le logiciel Minitab a donné les résultats suivants (tous les résultats obtenus sont joints en annexe 5).

One-way Analysis of Variance					
Analysis of Variance for RAW					
Source	DF	SS	MS	F	P
Rank	61	52756	865	3.02	0.000
Error	149	42601	286		
Total	210	95357			

Tableau 4 : Test Cd

P étant nulle, il est très fortement probable que les moyennes soient significativement différentes ce qui veut dire qu'il existe un lien entre les génomes de ces arbres et l'accumulation du Cd au sein de leurs feuilles.

Les lettres correspondes aux différentes populations qui ont pu être distinguées lors du test. Ce qui signifie qu'il n'existe pas de différence significative entre le clône en position 1 et celui en position 56 (population A), ou encore entre le clone 28 et 69 (population K).

Après la détermination de ces différentes « populations » il faudra analyser de plus près le génome des individus ayant la meilleure capacité à accumuler le Cd, afin que par la suite l'on puisse mieux comprendre les mécanismes d'assimilations du Cd et peut être déterminer ce qui pourrait être le premier rôle biologique associé à l'accumulation de ce métal lourd.

IV Conclusion

Il a donc été montré que les peupliers possèdent une grande capacité à accumuler le Cd et le B. Le clône le plus efficace concentre au sein de ses feuilles dix fois la concentration de Cd totale dans le sol, ce qui représente dix fois plus que le clône accumulant le moins de Cd dans ses feuilles.

Mais mis à part cette variabilité, ce qui est le plus important c'est la preuve que le génotype des individus joue un rôle prépondérant dans cette accumulation.

Les peupliers sont des arbres à grande production de biomasse et à forte consommation d'eau, les clônes survivants à de tels concentrations de Cd dans le sol pourraient être utilisés en tant que fourrage et ceux accumulant de grandes quantités de Cd comme outils de phytoremédiation.

Tous nos résultats convergent pour montrer que la manipulation de populations de peupliers offre une réponse pointue en matière de traitement des sols. En effet la connaissance de ces paramètres va nous conduire à la sélection des arbres les plus performants et ainsi un meilleur traitement des sols pollués.

Conclusion

De nombreuses informations peuvent être extraites des expériences menées en parallèle du site de Kopu. En effet les expériences conduites en serre grâce aux lysimètres nous disent que l'assimilation du B est directement lié à la consommation d'eau, à la surface foliaire et au facteur d'absorption racinaire. Ce dernier dépend directement de la concentration biodisponible en métal dans le sol.

Sachant que l'on peut augmenter cette biodisponibilité à l'aide de produit chélatants (comme l'EDTA), une possibilité d'amélioration de l'assimilation du B par les plantes serait d'opérer ainsi, sachant que cela augmenterait le risque de lessivages plus conséquent de ce métal.

L'expérience génétique menée nous amène à conclure que que les liens entre gènes et absorption du Cd sont patents ; si aucun rôle biologique n'a encore été attribué à ce métal, il semble que l'on puisse lié efficacité d'absorption et génotype.

Les mécanismes physiques d'absorption du B au niveau des racines restent mal connus, en effet si l'on sait que le facteur d'absorption racinaire croît en même temps que sa concentration dans la plante, on ne sait pas ce qui affecte ce facteur.

Par la suite il serait donc intéressant d'étudier l'architecture racinaire des peupliers après les avoir déterrés des lysimètres pour pouvoir pour comprendre comment elles se sont développées. Il faudrait également étudier de plus près le génotype des arbres possédant une plus grande quantité de Cd dans leurs parties aériennes pour essayer de déterminer quel gène est responsable de cette forte accumulation.

Enfin, le modèle développé ces dernières années s'est avéré concluant, et grâce à la connaissance des concentrations totales des métaux dans le sol, il est possible de prédire relativement précisément la concentration de métaux (comme le B) dans les feuilles à un moment donné. La gestion des sites pourra être ainsi optimisée en récoltant les feuilles au moment le plus propice.

La phytoremédiation du B a donc été plus précisément abordée ce qui va permettre dans le futur une meilleur efficacité des traitements dans le même cadre d'application. A coût extrêmement réduit et efficacité accrue, la phytoremédiation présente toutes les caractéristiques d'un sérieux candidats à la réhabilitation des sols pollués par les métaux lourds. De plus, aux vues des recherches effectuées dans ce domaine, il faut s'attendre à une hausse d'intérêt des industriels qui vont voir en cette technique une parfaite application du principe de développement durable.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alloway, B, J Heavy metal in soils. Glasgow : Blackie Academic & Professional, 1995, 2^d ed., 368 p.

Anderson, W.,N.,C ; Thesis: Practical Aspects of Phytoextraction. Palmerston North, New Zealand, Massey University, 2000.

Baker, A, J, M; Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. J. Plant Nutr. 3, 1981, p643–654.

Baker, A, J, M ; McGrath, S, P ; Sidoli C M D and Reeves R D The possibility of in situ metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants – a feasibility study. Res. Conser. Recyc, 11, 1994 , p41-49

Baker, A.J.M.; Mc Grath, S, P ; Reeves, R, D and Smith, J, A, C ; Metal Hyperaccumulator Plants : A Review of the Ecology and Physiology of a Biological Resource for Phytoremediation of Metal-Polluted Soils. In Terry, N. Phytoremediation of contaminated soil and water. New York: Lewis publishers, 2000, p85-107.

Bert, V. et Deram, A ; Guide des phytotechnologies : utilisation des plantes dans la dépollution et la réhabilitation des sites contaminés par les métaux lourds. Lille : Environnement et développement alternatif, 1999, p154.

Birngam, F, T ; Elsewi, A and Oertli, J, J ; Characteristics of Boron absorption by excised barley roots. Soil Sci Soc. Am.Proc.34, 1970, p613-617. In Dell, B ; Brown, P,H and Bell ,R,W : Boron in soil ans Plants ; Kluwer Academic Edition. 1997, p51.

Brooks R R, Lee J, Reeves R D and Jaffré T. Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. J. Geochem. Explor. 1977 vol 7, p49-77.

Brooks, R.,R ; Plant that Hyperaccumulate Heavy Metals CAB Internationnal 1998.

Cakmak, I and Römheld, V ; Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. Plant and Soil 193, p71-83, 1997. In Dell, B ; Brown, P,H and Bell ,R,W : Boron in soil ans Plants ; Kluwer Academic Edition. 1997.

Costa, G ; Morel, I, L ; Cadmium uptake by *Luprius albus* (L). Cadmium excretion, a possible mechanism of cd tolerance. J Plant Nutr 16, 1993, p1921-1929. In Mc Laughlin, M, J and Singh, B, R ; Cadmium in soils and plants, Kluwer Academic editor, 1999, p260.

Douglas, G, B ; Bulloch, B, T and Foote, A, G ; Cutting management of willows (*Salix* spp.) and leguminous shrubs for forage during summer. New Zealand Journal of Agriculture Research, 39, 1996, p175-184.

Friberg, L ; Nordberg, G, F ; Vouk, V, B ; eds. Handbook of the toxicology of metals, Vol. II. Amsterdam, Elsevier, 1986: p130-184.

Galal-Gorchev, H ; Dietary intake of pesticide residues, cadmium, mercury and lead. Food additives and contaminants, 1991, 8: p793-806.

Glass, D, J;. U.S and International Markets for Phytoremediation, 1999- 2000. Needham, Massachussetts: D. Glass Associates, Inc., July 1999, p 266.

Glass, D., J. ; The 2000 Phytoremediation Industry US and International Industry Directory with Company Profiles Associates, Inc. Needham, Massachusetts, USA. February 2000

Goldberg, S ; Forster , H, S ; Boron sorption on a calcareous soil & reference calcite, Soil Sci 152 , 1991, p 304-310. In Dell, B ; Brown, P,H and Bell ,R,W : Boron in soil ans Plants ; Kluwer Academic Edition. 1997, p40.

Greger, M ; Landberg T and Prost R ; Use of willow clones with high Cd accumulating properties in phytoremediation of agricultural soils with elevated Cd levels, 1997. In Contaminated soils : 3rd International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements. Paris, France, 15-19 May, 1995. Institut National de la Recherche (INRA) ; p505-511.

Greger, M and Landberg T ; Use of willow in phytoextraction. International journal of phytoremediation 1(2), 1999, p115-123.

Gu and Lowe , L, E 1990 Studies on the adsorption of Boron on humics acids Can. J. Soil Sci 70, p305-311. In Dell, B ; Brown, P,H and Bell ,R,W : Boron in soil ans Plants ; Kluwer Academic Edition. 1997, p40.

Hathaway, R, L ; Short-rotation coppiced willows for sheep fodder in New Zealand. In New zealand Agriculture Science 20(3), 1986, p140-142.

Horne, A,,J ; Phytoremediation by Constructed Wetlands. In Terry, N. Phytoremediation of contaminated soil and water. New York: Lewis publishers, 2000, p13-39.

Hinchman, R, R ; Negri, C, M and Gatliff, E, G ; Phytoremediation: using green plants to clean up contaminated soil, groundwater and wastewater. Proc. International Topical Meeting on Nuclear and Hazardous Waste Management, Spectrum 96, Seattle WA, 1996.

Hu, H et Brown, P, H ; Absorption of Boron by plant roots. Plant and Soil 193, 1997, p49-58. In Dell, B ; Brown, P,H and Bell ,R,W : Boron in soil ans Plants ; Kluwer Academic Edition. 1997, p53 et 57.

Krajnc, E,I ; *et al.* Integrated criteria document. Cadmium—Effects. Appendix. Bilthoven, Netherlands, National Institute of Public Health and Environmental Protection, 1987 (Report no. 758476004).

Lutz, O ; Humpfler, H ; Spraul,M ; 1991 Ascertainment of boric acid esters in wine by « BNMR Naurwissen » 78, p67-69.

Ma, L, Q ; Komar, K L ; Tu, C ; Zhang, W ; Cai, Y and Kennelley, E, D ; A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature* 409 , p579.

McGrath, S, P, Sidoli C, M, D, Baker, A, J, M and Reeves R D ; The potential for the use of metal-accumulating plants for the *in situ* decontamination of metal-polluted soils. *In Integrated Soil and Sediment Research: A Basis for Proper Protection*. Eds. H.J.P Eijssackers and T.Hamers Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1993, p.673-676.

McGrath, S, P; Dunham, S, J and Corell, R, L ; Potential for Phytoextraction of Zinc and Cadmium from Soils Using Hyperaccumulator Plants. In Terry, N. *Phytoremediation of contaminated soil and water*. New York: Lewis publishers, 2000, p109-128.

Mc Laughlin , M, J ; Andrews, S, L ; Smart, M, K and Smolders, E ;Effect of sulphate complexation in solution on uptake of cadmium by plants, 1997. In fourth International Conference on Biochemistry of Traces Elements, June 1997.

McLaren, R, G and Cameron, K, .C. *Soil Science* ; Oxford University Press. 1997.

Nicks, L and Chambers, M, F ; Nickel farm. *Discover*. September, 1994, p19.

Nixon, D, J ; Stephens, W ; Tyrrel, S, F and Brierley, E, D, R ; The potential for short rotationenergy forestry on restored landfills caps. *Bioresource Technology*. 77, 2001, P237-245.

Oertli, J, J and Grgurevic ; Effect of pH on the absorption of Boron by excised barley roots. *Agron J*. 67, p278-280. In Dell, B ; Brown, P,H and Bell ,R,W : *Boron in soil ans Plants* ; Kluwer Academic Edition. 1997, p52.

Ostman, G ; Cd in *Salix*- a study of the capacity of Salix to remove Cd from arable soils, 1994. In Aronsson, P. and Perttu, K ; *Wilow vegetation filters for municipal wastewaters and sludges A biological purification system* Proceeding of a study tour, conference and workshop in Sweden, Sweden : Sveriges Lantbrukuniversitet, 5-10 June 1994, p153-155.

Peterson, P, J Alloway, B, J . In Webb, ed. *The Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium*. Amsterdam : Elsevier/North-Holland, 1979, p 45-92. In M.N.V Prasad . *Metals in the Environment*, 2001, p 444.

Power, P, P and Woods, W, G. The chemistry of Boron and its speciation in plants. *Plant and Soil* 193, 1997, p1-13. In Dell, B ; Brown, P,H and Bell ,R,W : *Boron in soil ans Plants* ; Kluwer Academic Edition. 1997, p1-11.

Robinson, B,.H ; Thesis : The phytoextraction of heavy metals from metalliferous soils. Palmerston North, New Zealand, Massey University, 1997.

Robinson, B, H ; Leblanc, M ; Petit, D ; Brooks, R, R ; Kirkman, J, H ; Gregg P E H ;The potential of *Thlaspi caerulescens* for phytoremediation of contaminated soils. *Plant and Soil*. 203, 1998, p47-56.

Robinson, B, H ; Mills, T, M ; Petit, D ; Fung, L, E ; Green, S, R and Clothier, B, E ; Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: Implications for phytoremediation. *Plant Soil*. 227, 2000, p301-306.

Ros, J, P, .M ; Sloof, W; eds. Integrated criteria document cadmium. Bilthoven, Netherlands, National Institute of Public Health and Environmental Protection, 1987 (Report no. 758476004).

Salt, D, E ; Prince, R, C ; Pickering, I, J & Raskin, I ; Mechanisms for cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiol*. 109, 1995, p1427-1433.

Streit, B. and Werner, S ; Chemical properties of metals and the process of bioaccumulation in terrestrial plants. In *Chemical properties of metals* ? p31-59.

Von Wiren, N ; Marschner, H and Römheld, V ; Roots of iron-efficient maize also absorbs phytosiderophore-chelated Zinc. *Plant Physiol*. 111, 1996, p1119-1125. In Mc Laughlin, M, J and Singh, B, R ; *Cadmium in soils and plants*, Kluwer Academic editor, 1999, p260

Ware, G.,W ; ed. Cadmium. USEPA Office of Drinking Water health advisories. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 107, 1989, p25-37.

Welch R, M ; Micronutrient nutrition of plants, *Crit. Rev. Plant Sci*, 14, 1995, p49-82. In Dell, B ; Brown, P,H and Bell ,R,W : *Boron in soil ans Plants* ; Kluwer Academic Edition. 1997, p40.

Wildners, R, A and Neales, T, F ; The absorption of Boron by disks of plant storage tissues. *Aust. J. Biol. Sci.* 24, 1971, p873-884. In Dell, B ; Brown, P,H and Bell ,R,W : *Boron in soil ans Plants* ; Kluwer Academic Edition. 1997, p51.

Wilkinson, A, G ; Zsuffa, L and Verwijst, T ; Poplars and willows for soil erosion control in New Zealan. *Biomass-and-energy* 16(4), 1999, p263-274.

Publications

Granel, T.; Robinson, B, .H ; Mills, T.; Clothier, B.; Green, S and Fung L. Cadmium accumulation by willow clones used for soil conservation, stock folder, and phytoremediation, *sous presse, Australian Journal of soils research*.

Robinson, B.H.; Mills, T.; Clothier, B.; Green, S.; Fung, L.; Van Der Velde, M.; Thayalakumaran, T.; Snow, V.; Fernandez, J-E.; Madejon, P; Maranon, T. and Murillo J.M. .,Modelling plant-metal uptake from contaminated soils. 2001.

Conférences

International Agency for Research on Cancer. Cadmium, nickel, some epoxides, miscellaneous industrial chemicals and general considerations on volatile anaesthetics. Lyon,

1976: 39-74 (IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Vol. 11).

Cadmium. Geneva, World Health Organization, 1992 (Environmental Health Criteria, No. 134).

International Organization for Standardization.
Water quality-determination of cadmium.
Geneva, 1985, 1986 (ISO 5961:1985; ISO 8288:1986).

World Health Organization. Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. Cambridge, Cambridge University Press, 1989:163-219 (WHO Food Additives Series, No. 24).

World Health Organization, Geneva, Evaluation of certain food additives and contaminants: forty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 1993 (WHO Technical Report Series, No. 837).

Sites internet :

<http://tecfa.unige.ch/tecfa/teaching/UVLibre/9899/mar008/comp.htm>

<http://www.educnet.education.fr/rnchimie/math/benichou/tests/testf/testf.htm>

www.who.int/pcs/

<http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/nte/immediato/math2001/mas42/SEANCE13-14/OBJ1301.htm>

Annexe 1

Rappel sur les besoins des plantes

Les éléments majeurs :

- Azote (N)
- Phosphore (P)
- Potassium (K)
- Magnésium (Mg)
- Calcium (Ca)
- Soufre (S)

L'azote

L'azote constitue pour toutes les plantes le pivot du métabolisme, élément de base de la multiplication et du développement des organes végétatifs, il est un des constituants de la molécule de la chlorophylle, mais également de tous les acides aminés et de nombreuses enzymes et coenzymes. L'azote est nécessaire dès le début et pendant toute la période de croissance active, il est assimilé sous ses formes minérales NO_3^- ou NH_4^+ . La carence azotée se manifeste par le jaunissement des feuilles les plus 'agées' en raison du transfert d'acides aminés de celle-ci vers les feuilles les plus jeunes.

Les plantes vivent très souvent en symbiose avec les bactéries capables de minéraliser l'azote car la majorité de l'azote présent dans le sol reste inutilisable directement.

Le phosphore

Le phosphore intervient essentiellement dans le métabolisme glucidique. Son rôle de transporteur et de pourvoyeur d'énergie (ATP) est essentiel pour le métabolisme cellulaire et il est un constituant de base du noyau cellulaire (présent dans l'ADN, l'ARN...).

Dans le sol le phosphore se trouve sous la forme de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ mais est assimilé sous la forme $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ et H_2PO_4^- , son assimilation est favorisée lorsque la plante est en présence d'un sol acide, en effet c'est à pH 6.5 que le sol fixe le moins de phosphore permettant ainsi à la plante de bénéficier de phosphore disponible.

Le potassium

Parmi les multiples rôles connus du potassium dans le métabolisme de la plante, rappelons : son action sur l'assimilation du carbone par les feuilles (régulation de l'ouverture des stomates), sur l'accumulation des anions organiques par salification, sur la migration des

glucides vers les organes de réserve et leur condensation à l'état de sucres ou d'amidon et son importance dans le régime de l'eau du végétal.

Le magnésium

Si le rôle du Magnésium est évident en tant que constituant des molécules de chlorophylle, sa place comme élément majeur, s'explique par ses diverses actions essentielles sur le métabolisme glucidique (comme véhicule du phosphore), sur la photosynthèse et sur les mouvements au sein du phloème.

Le calcium

Cet élément est indispensable à la structure des parois cellulaires, et joue un rôle essentiel au sein du mécanisme d'absorption racinaire.

Le soufre

Élément constitutif du coenzyme A indispensable à la synthèse d'ATP, le soufre est également présent dans la composition de la vitamine B1 et joue un rôle déterminant dans la structure des protéines par l'intermédiaire des ponts disulfures.

Les éléments mineurs

- **Le chlore** : nécessaire à l'oxydation de l'H₂O durant la photosynthèse, mais essentiel également pour les racines.
- **Le manganèse** : assimilé majoritairement sous la forme de Mn²⁺ responsable en partie de la rigidité des parois des thylakoïdes mais est aussi responsable de l'amorçage de nombreuses enzymes.
- **Le cuivre** : est présent au sein des cytochromes dans les enzymes oxydases et les bactéries présentes dans le rhizome en ont besoin également.
- **Le zinc** : assimilé sous la forme Zn²⁺ utilisé par les plantes afin de synthétiser une hormone de croissance connue sous le nom d'auxine.
- **Le molybdène** : le rôle le plus connu de cet élément est d'être essentiel à l'enzyme nitrate réductase et également d'être un élément déterminant de l'enzyme xanthine déhydrogénase qui permet la destruction d'acides aminés tels que la guanine et l'adénine.
- **Le bore** : cf annexe chapitre 1 et annexe 3

- **Le nickel :** a été montré comme étant primordial dans le processus de synthèse de l'uréase, cette enzyme permet la régulation de la présence d'uréides au sein des feuilles et des racines (formé lors de l'assimilation de l'azote et toxique pour la plante si présent en trop grande quantité).

Le tableau rassemble tous les éléments essentiels à la plante

Macronutriments	Forme sous laquelle l'élément est assimilé	Concentration typique retrouvée au sein de la matière sèche
		%
Carbone	CO ₂ , HCO ₃ ⁻	
Hydrogène	H ₂ O	
Oxygène	O ₂ , H ₂ O	
Azote	NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺	2.0-4.0
Phosphore	H ₂ PO ₄ ⁻ , HPO ₄ ²⁻	0.1-0.4
Potassium	K ⁺	1.0-3.0
Soufre	SO ₄ ²⁻ , SO ₂	0.2-0.5
Calcium	Ca ²⁺	0.5-3.0
Magnésium	Mg ²⁺	0.1-0.5
Sodium	Na ⁺	0.2-1.5
Micronutriments		µg g ⁻¹
Fer	Fe ²⁺	50-300
Manganèse	Mn ²⁺	20-250
Cuivre	Cu ²⁺	5-15
Zinc	Zn ²⁺	20-100
Molybdène	MoO ₄ ²⁻	<0.1-1.0
Bore	H ₃ BO ₃	10-50
Chlore	Cl ⁻	0.2-2.0

Source :

McLaren, R, G and Cameron, K, .C. Soil Science ; Oxford University Press. 1997

Annexe 2

Les peupliers

Le peuplier appartient au genre *Populus L*, il se développe généralement rapidement, medium à grand sa taille est généralement comprise entre 15 et 50 mètres ; ce feuillu natif d'un large panel de pays de l'hémisphère nord est très proche du saule. En effet ils appartiennent tous les deux à la famille des Salicaceae.

Parmi les nombreuses ressemblances liant ces deux genres on peut noter le fait que les fleurs mâles et femelles se trouvent sur des plantes différentes et que ces deux arbres ont une très grande capacité à se propager de façon végétative.

Le nombre d'espèces de peupliers a été sujet à controverse durant de nombreuses années surtout entre taxonomistes Russes et Chinois ; mais on peut dénombrer au moins 80 espèces différentes.

Le groupe populus compte d'innombrables tailles de feuilles de celle d'un stylo à celle d'une assiette; ces arbres peuvent résister à des températures de +50 à -50°C, une espèce excrète du sel (*P.euphratica*), leur système racinaire leur permet de se reproduire de façon végétative à raison de 10 arbres par hectares et d'atteindre des profondeurs de plus de 13 mètres. La densité du bois de peuplier est comprise entre 280 et 550 kg m⁻³.

Leur capacité d'hybridation entraîne un potentiel de variabilité énorme ; et jusqu'à présent les peupliers sont utilisés pour la production d'électricité, la construction de bâtiments ou encore la protection des cultures du vent. Et en raison de leur domestication par les hommes leur distribution naturel est difficile à évaluer précisément. Cependant la carte du monde ci-après délimite approximativement la distribution du peuplier (Wilkinson, 2000)

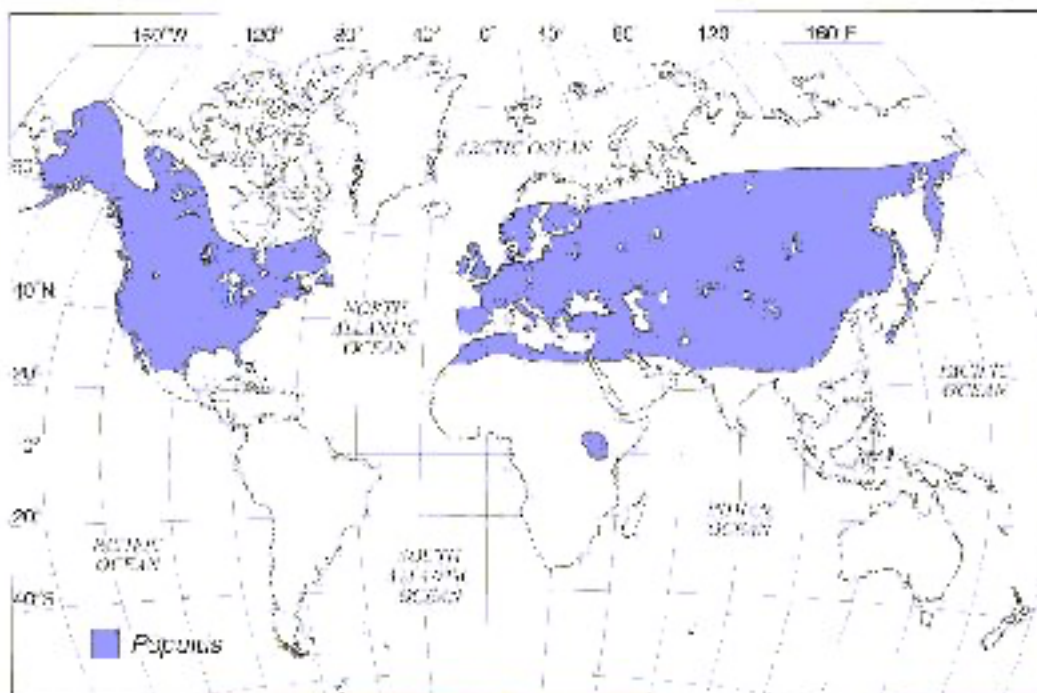


Figure 24 : Carte du monde, distribution naturelle des peupliers

Lors des expériences réalisées sur le site de Kopu, les espèces utilisées ont été les suivantes :

Toa : (*P.deltoides* x *P.nigra*) x *P.yunnanensis*

Kawa : *P.deltoides* x *P.yunnanensis*

Yeogi : *P.alba* x *P.glandulosa*

Silver poplar : *P.alba*

Le tableau ci-dessous rassemble les espèces dont sont issus les peupliers de Kopu et leur différentes origines :

<i>P.nigra</i>	Europe de l'ouest
<i>P.yunnanensis</i>	Sud ouest de la Chine
<i>P.deltoides</i>	Est des USA
<i>P.glandulosa</i>	Korea
<i>P.alba</i>	Europe de l'ouest et Eurasie

Ci dessous sont jointes des illustrations montrant la disposition des fleurs en châton et les feuilles de quelques unes des espèces mères ayant servies à créer les espèces utilisées sur le site contaminé :



Figure 25 : A gauche : fleur femelle réceptive du « Frimley » .
A droite : fleur mâle du « Robusta » émettrice de pollen

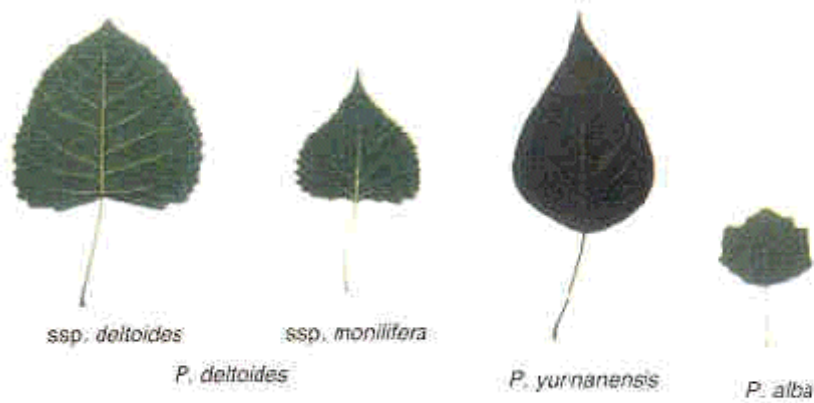


Figure 26 : Exemple de feuilles de peupliers

Annexe 3

Principe de l'ICPES (Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry) :

Le principe de ce système est le même que celui de la spectrométrie d'émission, c'est à dire que les atomes de l'échantillon sont excités (ici par nébulisation et entraîné dans un plasma à environ 8000°C) ainsi les électrons passent au niveau énergétique supérieur pour revenir ensuite à leur niveau d'origine en émettant à la longueur spécifique de chaque élément.

Cette émission de lumière est analysée dans ce cas par un capteur électrique et permet de connaître ainsi la concentration de 20 à 60 éléments en 2 ou 3 minutes de cycle.

Les sensibilités sont meilleures pour les éléments tels que le Bore, le phosphore et le soufre. Notons que la sensibilité de cette technique est de l'ordre du $\mu\text{g g}^{-1}$.

Principe de la FAAS (Flame Atomic Absorption Spectrometry) :

Le principe de cette méthode d'analyse est de nébuliser un échantillon liquide dans une flamme. Les composants de l'échantillon sont atomisés. Parallèlement, une source lumineuse monochromatique (lampe à cathode creuse) émet une longueur d'onde caractéristique à analyser. Un capteur électronique mesure le flux lumineux sortant ; en effectuant la différence du flux initial et de ce flux on obtient une absorbance qui est proportionnelle à la quantité de l'élément à analyser.

La limite de détection pour la majorité de ces éléments est de l'ordre du $\mu\text{g g}^{-1}$ la sensibilité peut être meilleur (ng g^{-1}) dans le cas du Cd et du Zn par exemple.(Brooks 1998)

Annexe 4

A) Le Bore

Nombre atomique : 5

Masse atomique relative : 10.811

Indice d'électronégativité : 2

Nombre d'oxydation : 3+

Le B est utilisé par la plante pour la consolidation de ces parois cellulaires, à l'aide des types de liaisons présentés ci dessous entre le glycérol et les complexes borates assimilés :

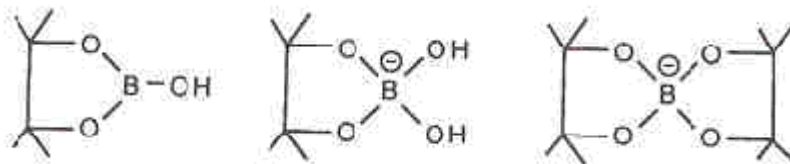


Figure 27 : De gauche à droite, liaison cis-diol ester – monoborate, et le complexe borate bis-diol. (Power and Woods, 1997)

Le B sert également à protéger la cellule du peroxyde d'hydrogène grâce au mécanisme ci dessous :

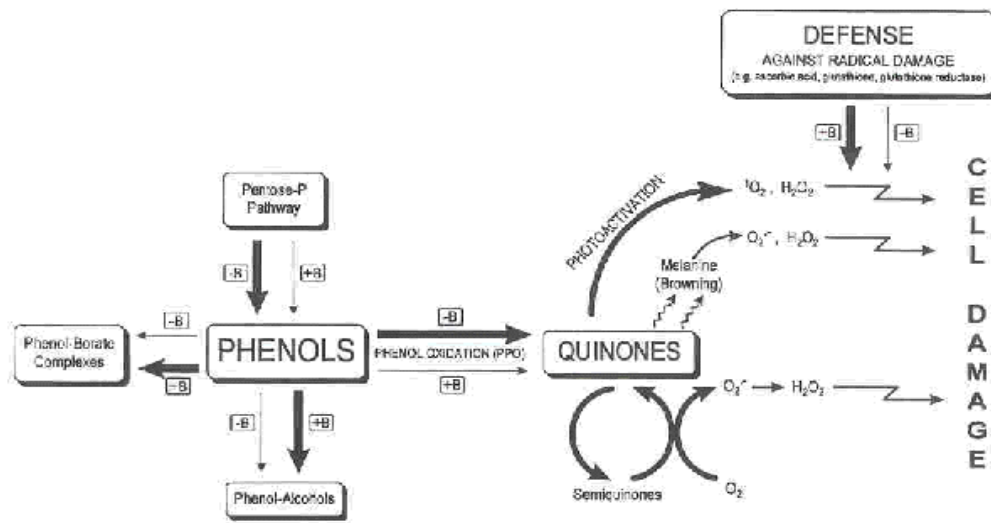


Figure 28 : Rôle du B dans la protection de la cellule

Le B en quantité suffisante diminuerait la production de quinones et de plus activerait des enzymes permettant d'atténuer les effets de H₂O₂ sur la cellule.

B) Le Cadmium

Nombre atomique : 48

Masse atomique relative : 112.41

Indice d'électronégativité : 1.7

Nombre d'oxydation : 2+

Ci dessous un schéma représentant le cycle du cadmium dans la nature :

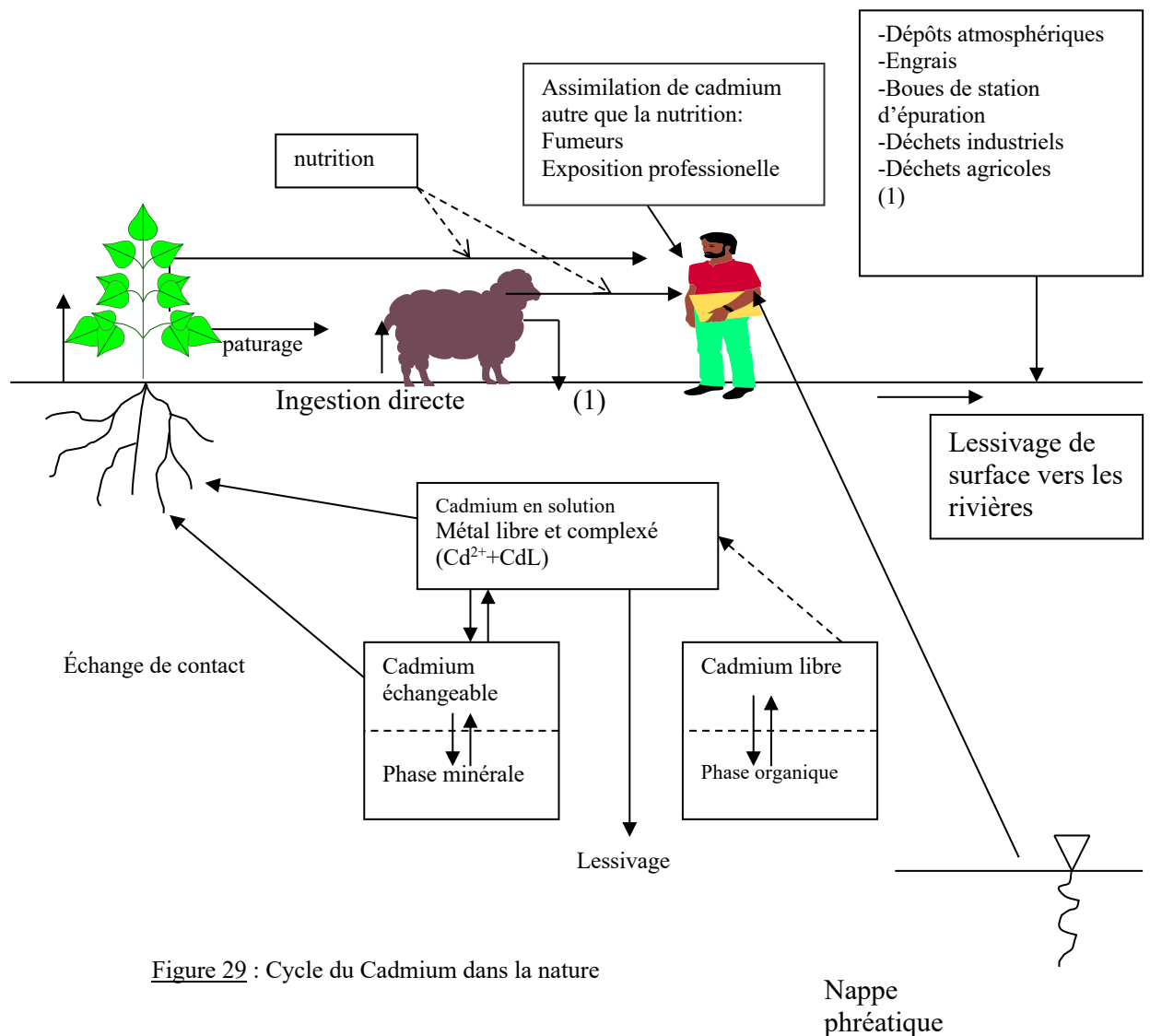


Figure 29 : Cycle du Cadmium dans la nature

Notons que l'ingestion directe existe aussi chez les humains en effet les enfants en bas âge ingèrent quelques mg de sols par jour ce qui n'est pas négligeable.

Ci dessous est représenté la structure d'un phytométallophore et sa probable utilisation par la plante.

Nicotianamine Fe(II) Complex

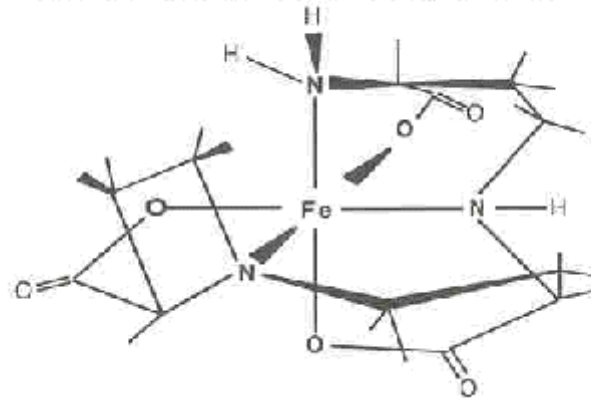


Figure 30 : Phytométallophore Complexe Nicotianamine Fe(II).

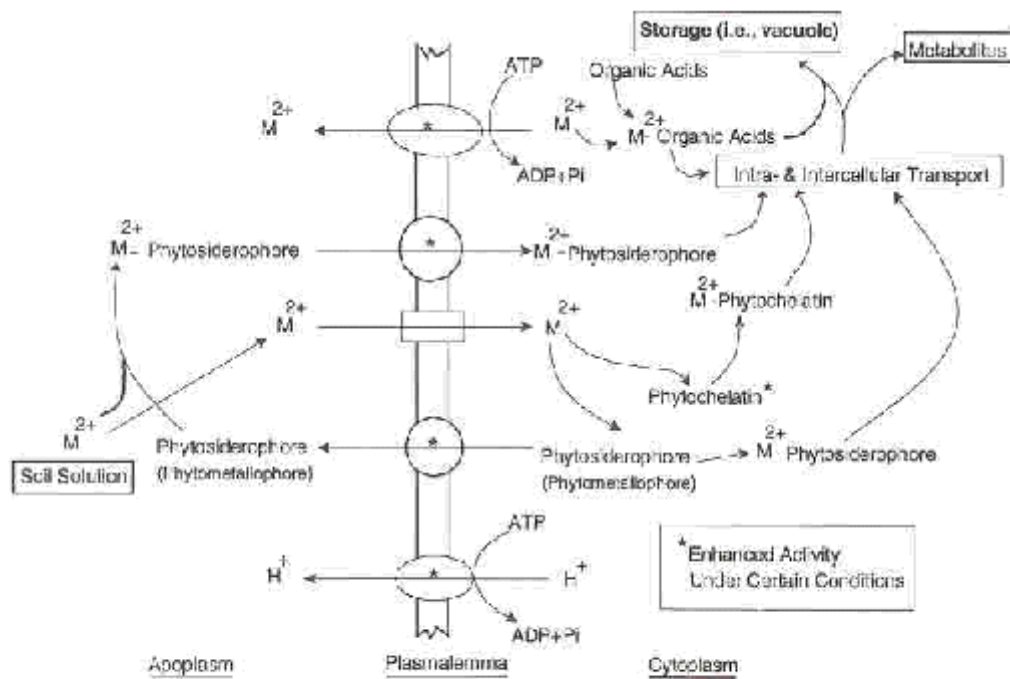


Figure 31 : Proposition du devenir des phytométallophores au sein des cellules. Les rectangles représentent des protéines canaux et les cercles des réductases.

Annexe 5

I Le test F de Fisher

C'est un test de significativité employé lors de la comparaison de plusieurs moyennes. Ce test ne peut être utilisé qu'à deux conditions : les distributions des moyennes sont normales (décrivent une courbe de Gauss) et leurs variances sont de même ordre de grandeur.

Principe d'utilisation :

On se pose la question suivante : les différences entre les moyennes observées et la moyenne globale est-elle significative ou non ?

Le test F de Fisher permet de tester ce genre d'hypothèses.

On considère communément qu'une valeur de F correspondant à un seuil $p < 0,05$ traduit une différence significative entre les moyennes. Si $p < 0,01$, alors la différence est très significative.

II Le test de Student

C'est un test de significativité qui peut être employé :

- lors de la comparaison de deux moyennes (ce test ne peut être utilisé qu'à deux conditions : les distributions des moyennes sont normales, c'est-à-dire décrivent une courbe de Gauss, et leurs variances sont de même taille)
- pour tester la significativité d'un coefficient de régression

En ce qui concerne la comparaison de deux moyennes, on se pose la question suivante : la différence entre la moyenne observée et la moyenne de la population est-elle significative ou non ?

Le test t de Student permet de répondre à ce genre de question. Le test est calculé en effectuant le rapport de la différence des moyennes sur l'erreur standard et on obtient alors une valeur appelée "Valeur de t" ou t observée.

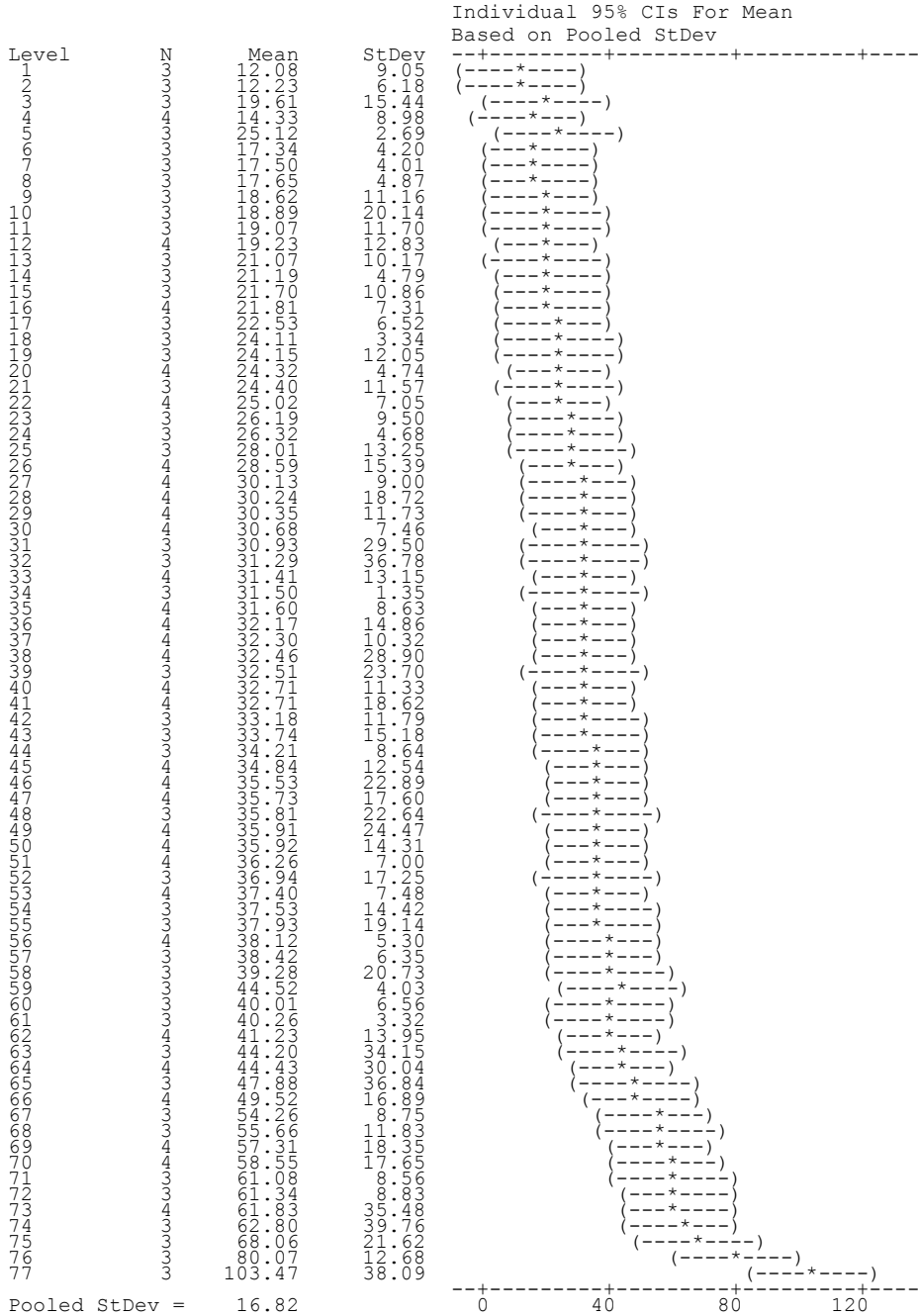
Après avoir effectué le test de significativité globale du modèle de régression multiple (test de Fisher), il est intéressant d'effectuer un test de significativité partielle sur le même modèle à l'aide du test de Student. Ce test nous permettra de savoir si chaque coefficient est significativement différent de 0 ou non et ainsi de savoir si telle variable explique réellement la variable Y.

Principe d'utilisation: La valeur observée est comparée aux valeurs contenues dans la table du t de Student. La table du t de Student permet de déterminer pour la valeur observée (en fonction du nombre de degrés de liberté correspondant le seuil de probabilité auquel correspond le t observé. Si la valeur absolue du t calculé est supérieure à la valeur du t de la table de Student, on en conclura soit que la différence est significative, soit que le coefficient est significativement différent de 0, selon l'emploi du test de Student. On considère communément qu'une valeur de t correspondant à un seuil $p < 0,05$ traduit une différence significative entre les moyennes. Si $p < 0,01$, alors la différence est très significative.

One-way Analysis of Variance

Analysis of Variance for Cadmium

Source	DF	SS	MS	F	P
RANK	76	60304	793	2.81	0.000
Error	185	52328	283		
Total	261	112632			



Les clones ont été confrontés un à un et c'est ainsi qu'on pu être créée les différentes populations.
La limite entre chaque population peut s'apprécier au fait que lorsque deux individus sont comparé les signes deviennent les mêmes.

Fisher's pairwise comparisons

Family error rate = 1.00
 Individual error rate = 0.0500

Critical value = 1.973

Intervals for (column level mean) - (row level mean)

	1	2	3	4	5	6
2	-27.24					
3	-34.19	-48.48				
4	-23.71	-45.71	-20.00			
5	-40.33	-24.45	-30.00	-33.00		
6	-33.14	-20.00	-11.11	-11.11	-13.00	
7	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
8	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
9	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
10	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
11	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
12	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
13	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
14	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
15	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
16	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
17	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
18	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
19	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
20	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
21	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
22	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
23	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
24	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
25	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
26	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
27	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
28	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
29	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
30	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
31	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
32	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
33	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
34	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
35	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
36	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
37	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
38	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
39	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
40	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
41	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
42	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
43	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
44	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
45	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
46	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
47	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
48	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
49	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
50	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
51	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
52	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11
53	-23.33	-33.00	-24.45	-24.45	-24.45	-11.11

41	-140	14	-	
42	-411	15	-	
43	-411	16	-	
44	-411	17	-	
45	-411	18	-	
46	-411	19	-	
47	-411	20	-	
48	-411	21	-	
49	-411	22	-	
50	-411	23	-	
51	-411	24	-	
52	-411	25	-	
53	-411	26	-	
54	-411	27	-	
55	-411	28	-	
56	-411	29	-	
57	-411	30	-	
58	-411	31	-	
59	-411	32	-	
60	-411	33	-	
61	-411	14	-	
62	-411	15	-	
63	-411	16	-	
64	-411	17	-	
65	-411	18	-	
66	-411	19	-	
67	-411	20	-	
68	-411	21	-	
69	-411	22	-	
70	-411	23	-	
71	-411	24	-	
72	-411	25	-	
73	-411	26	-	
74	-411	27	-	
75	-411	28	-	
76	-411	29	-	
77	-411	30	-	
		31	-	
		32	-	
		33	-	

38	-	
39	-	
40	-	
41	-	
42	-	
43	-	
44	-	
45	-	
46	-	
47	-	
48	-	
49	-	
50	-	
51	-	
52	-	
53	-	
54	-	
55	-	
56	-	
57	-	
58	-	
59	-	
60	-	
61	-	
62	-	
63	-	
64	-	
65	-	
66	-	
67	-	
68	-	
69	-	
70	-	
71	-	
72	-	
73	-	
74	-	
75	-	
76	-	
77	-	
32	-	
33	-	
34	-	
35	-	
36	-	
37	-	
38	-	
39	-	
40	-	
41	-	
42	-	
43	-	
44	-	
45	-	
46	-	
47	-	
48	-	
31	-	
32	-	
33	-	
34	-	
35	-	
36	-	
37	-	
38	-	
39	-	
40	-	
41	-	
42	-	
43	-	
44	-	
45	-	
46	-	
47	-	
48	-	

66	-4	44	44	45	46	47	48
67	-4	45	45	45	46	47	48
68	-4	46	46	46	46	47	48
69	-4	47	47	47	46	47	48
70	-4	48	48	48	46	47	48
71	-4	49	49	49	46	47	48
72	-4	50	50	50	46	47	48
73	-4	51	51	51	46	47	48
74	-4	52	52	52	46	47	48
75	-4	53	53	53	46	47	48
76	-4	54	54	54	46	47	48
77	-4	55	55	55	46	47	48
78	-4	56	56	56	46	47	48
79	-4	57	57	57	46	47	48
80	-4	58	58	58	46	47	48
81	-4	59	59	59	46	47	48
82	-4	60	60	60	46	47	48
83	-4	61	61	61	46	47	48
84	-4	62	62	62	46	47	48
85	-4	63	63	63	46	47	48
86	-4	64	64	64	46	47	48
87	-4	65	65	65	46	47	48
88	-4	66	66	66	46	47	48
89	-4	67	67	67	46	47	48
90	-4	68	68	68	46	47	48
91	-4	69	69	69	46	47	48
92	-4	70	70	70	46	47	48
93	-4	71	71	71	46	47	48
94	-4	72	72	72	46	47	48
95	-4	73	73	73	46	47	48
96	-4	74	74	74	46	47	48
97	-4	75	75	75	46	47	48
98	-4	76	76	76	46	47	48
99	-4	77	77	77	46	47	48
100	-4	78	78	78	46	47	48
101	-4	79	79	79	46	47	48
102	-4	80	80	80	46	47	48
103	-4	81	81	81	46	47	48
104	-4	82	82	82	46	47	48
105	-4	83	83	83	46	47	48
106	-4	84	84	84	46	47	48
107	-4	85	85	85	46	47	48
108	-4	86	86	86	46	47	48
109	-4	87	87	87	46	47	48
110	-4	88	88	88	46	47	48
111	-4	89	89	89	46	47	48
112	-4	90	90	90	46	47	48
113	-4	91	91	91	46	47	48
114	-4	92	92	92	46	47	48
115	-4	93	93	93	46	47	48
116	-4	94	94	94	46	47	48
117	-4	95	95	95	46	47	48
118	-4	96	96	96	46	47	48
119	-4	97	97	97	46	47	48
120	-4	98	98	98	46	47	48
121	-4	99	99	99	46	47	48
122	-4	100	100	100	46	47	48
123	-4	101	101	101	46	47	48
124	-4	102	102	102	46	47	48
125	-4	103	103	103	46	47	48
126	-4	104	104	104	46	47	48
127	-4	105	105	105	46	47	48
128	-4	106	106	106	46	47	48
129	-4	107	107	107	46	47	48
130	-4	108	108	108	46	47	48
131	-4	109	109	109	46	47	48
132	-4	110	110	110	46	47	48
133	-4	111	111	111	46	47	48
134	-4	112	112	112	46	47	48
135	-4	113	113	113	46	47	48
136	-4	114	114	114	46	47	48
137	-4	115	115	115	46	47	48
138	-4	116	116	116	46	47	48
139	-4	117	117	117	46	47	48
140	-4	118	118	118	46	47	48
141	-4	119	119	119	46	47	48
142	-4	120	120	120	46	47	48
143	-4	121	121	121	46	47	48
144	-4	122	122	122	46	47	48
145	-4	123	123	123	46	47	48
146	-4	124	124	124	46	47	48
147	-4	125	125	125	46	47	48
148	-4	126	126	126	46	47	48
149	-4	127	127	127	46	47	48
150	-4	128	128	128	46	47	48
151	-4	129	129	129	46	47	48
152	-4	130	130	130	46	47	48
153	-4	131	131	131	46	47	48
154	-4	132	132	132	46	47	48
155	-4	133	133	133	46	47	48
156	-4	134	134	134	46	47	48
157	-4	135	135	135	46	47	48
158	-4	136	136	136	46	47	48
159	-4	137	137	137	46	47	48
160	-4	138	138	138	46	47	48
161	-4	139	139	139	46	47	48
162	-4	140	140	140	46	47	48
163	-4	141	141	141	46	47	48
164	-4	142	142	142	46	47	48
165	-4	143	143	143	46	47	48
166	-4	144	144	144	46	47	48
167	-4	145	145	145	46	47	48
168	-4	146	146	146	46	47	48
169	-4	147	147	147	46	47	48
170	-4	148	148	148	46	47	48
171	-4	149	149	149	46	47	48
172	-4	150	150	150	46	47	48
173	-4	151	151	151	46	47	48
174	-4	152	152	152	46	47	48
175	-4	153	153	153	46	47	48
176	-4	154	154	154	46	47	48
177	-4	155	155	155	46	47	48
178	-4	156	156	156	46	47	48
179	-4	157	157	157	46	47	48
180	-4	158	158	158	46	47	48
181	-4	159	159	159	46	47	48
182	-4	160	160	160	46	47	48
183	-4	161	161	161	46	47	48
184	-4	162	162	162	46	47	48
185	-4	163	163	163	46	47	48
186	-4	164	164	164	46	47	48
187	-4	165	165	165	46	47	48
188	-4	166	166	166	46	47	48
189	-4	167	167	167	46	47	48
190	-4	168	168	168	46	47	48
191	-4	169	169	169	46	47	48
192	-4	170	170	170	46	47	48
193	-4	171	171	171	46	47	48
194	-4	172	172	172	46	47	48
195	-4	173	173	173	46	47	48
196	-4	174	174	174	46	47	48
197	-4	175	175	175	46	47	48
198	-4	176	176	176	46	47	48
199	-4	177	177	177	46	47	48
200	-4	178	178	178	46	47	48

60	-1	55	56	57	58	59	60
61	-2	55	56	57	58	59	60
62	-2	55	56	57	58	59	60
63	-3	55	56	57	58	59	60
64	-3	55	56	57	58	59	60
65	-3	55	56	57	58	59	60
66	-3	55	56	57	58	59	60
67	-4	55	56	57	58	59	60
68	-4	55	56	57	58	59	60
69	-4	55	56	57	58	59	60
70	-4	55	56	57	58	59	60
71	-5	55	56	57	58	59	60
72	-5	55	56	57	58	59	60
73	-4	55	56	57	58	59	60
74	-5	55	56	57	58	59	60
75	-5	55	56	57	58	59	60
76	-6	55	56	57	58	59	60
77	-9	55	56	57	58	59	60
56	-2	55	56	57	58	59	60
57	-2	55	56	57	58	59	60
58	-2	55	56	57	58	59	60
59	-3	55	56	57	58	59	60
60	-3	55	56	57	58	59	60
61	-3	55	56	57	58	59	60
62	-3	55	56	57	58	59	60
63	-3	55	56	57	58	59	60
64	-3	55	56	57	58	59	60
65	-3	55	56	57	58	59	60
66	-3	55	56	57	58	59	60
67	-4	55	56	57	58	59	60
68	-4	55	56	57	58	59	60
69	-4	55	56	57	58	59	60
70	-4	55	56	57	58	59	60
71	-5	55	56	57	58	59	60
72	-5	55	56	57	58	59	60
73	-4	55	56	57	58	59	60
74	-5	55	56	57	58	59	60
75	-5	55	56	57	58	59	60
76	-6	55	56	57	58	59	60
77	-9	55	56	57	58	59	60
62	-1	62	63	64	65	66	
63	-1	62	63	64	65	66	
64	-1	62	63	64	65	66	
65	-1	62	63	64	65	66	
66	-1	62	63	64	65	66	
67	-1	62	63	64	65	66	
68	-1	62	63	64	65	66	
69	-1	62	63	64	65	66	
70	-1	62	63	64	65	66	
71	-1	62	63	64	65	66	
72	-1	62	63	64	65	66	
73	-1	62	63	64	65	66	
74	-1	62	63	64	65	66	
75	-1	62	63	64	65	66	
76	-1	62	63	64	65	66	

77	-12.71 -90.30 -36.12	-13.49 -87.58 -36.90	-8.78 -86.37 -32.18	-10.29 -84.38 -33.69	-5.10 -82.69 -28.50	-5.20 -79.29 -28.61
68	67 -28.50 25.69	68	69	70	71	72
69	-228.40 22.29	-26.99 23.70				
70	-29.64 21.05	-28.23 22.45	-24.71 22.22			
71	-33.91 20.27	-32.51 21.68	-29.11 21.58	-27.87 22.82		
72	-34.18 20.01	-32.77 21.41	-29.37 21.31	-228.13 22.56	-27.36 -26.83	
73	-32.92 17.77	-31.52 19.17	-27.99 18.94	-26.74 20.18	-26.10 -24.59	-25.88 -24.88
74	-35.64 18.55	-34.23 19.96	-30.83 19.86	-29.59 21.10	-28.82 -25.37	-28.55 -25.64
75	-40.89 13.29	-39.49 14.70	-36.09 14.60	-34.85 15.84	-33.07 20.11	-33.81 20.33
76	-52.91 1.28	-51.50 2.69	-48.10 2.58	-46.86 3.83	-46.09 8.10	-45.88 8.36
77	-76.31 -22.12	-74.90 -20.72	-71.51 -20.82	-70.26 -19.58	-69.49 -15.30	-69.22 -15.04
74	73 -26.31 24.38	74	75	76		
75	-31.57 19.12	-32.35 21.84				
76	-43.58 7.11	-44.37 9.82	-39.11 15.08			
77	-66.98 -16.30	-67.77 -13.58	-62.51 -8.32	-50.50 3.69		

