

UNIVERSITE DE TUNIS

**INSTITUT SUPERIEUR DE L'EDUCATION ET
DE LA FORMATION CONTINUE**

DEPARTEMENT DES SCIENCES NATURELLES

Bioremédiation / Phytoremédiation

SN 232

Professeur : Chedly ABDELLY

Année Universitaire

2006/07

LA BIOREMEDIATION

1. Introduction générale

Avec l'accélération du développement économique, l'homme est de plus en plus responsable de la pollution de l'environnement. La diversité des produits d'origine industrielle conduit à une augmentation considérable du nombre de substances totalement étrangères au monde vivant, dites xénobiotiques. Certains de ces polluants ont contaminé les sols et proviennent des décharges, des installations industrielles, comme conséquence d'accidents de transport ou encore par le biais des rejets urbains et industriels ou en raison de pratiques agricoles.

Les microorganismes telluriques éliminent plus ou moins rapidement les polluants organiques biodégradables, mais les métaux lourds (cadmium, cuivre, mercure, plomb et zinc) et les métalloïdes (sélénium et arsenic) persistent dans l'environnement et s'accumulent inévitablement. Ils peuvent migrer vers les eaux de surface ou souterraines ou pénétrer la chaîne alimentaire *via* les végétaux pour se retrouver dans les animaux et éventuellement dans l'homme. Confiner les sites pollués à l'aide de barrières physiques n'élimine pas les substances toxiques et nécessite une surveillance, et un entretien permanent de ces barrières.

Lorsque le risque pour les écosystèmes et l'homme est très élevé, la dépollution s'impose. Il existe certes des méthodes physico-chimiques permettant la décomposition des polluants. Les plus utilisées sont l'incinération et les méthodes de décomposition chimique. Elles sont très efficaces pour certains types de contaminants présents dans le milieu mais présentent des inconvénients. Les interventions sont lourdes et onéreuses et laissent en général un sol stérile. Par exemple, le traitement chimique par lavage élimine aussi les microorganismes telluriques et l'humus.

La bioremédiation, c'est-à-dire l'emploi de procédés biologiques pour éliminer les polluants industriels qui contaminent le cycle biogéochimique des substances naturelles, est une option avantageuse pour diminuer la pression exercée sur l'environnement. La bioremédiation consiste à utiliser des systèmes biologiques pour réduire le niveau de pollution présents dans l'air, l'eau ou le sol. Ce sont des microorganismes ou des plantes qui sont normalement utilisés comme systèmes biologiques. Le plus souvent on choisit de mener les opérations de bioremédiation en laissant faire les biodégradations à des microorganismes. Pour assurer leur croissance et/ou leurs besoins en énergie, les microorganismes peuvent utiliser, en les dégradant la plupart des substances chimiques. Ces processus de dégradation biologique peuvent exiger la présence de l'air, ou non. Dans certains cas, les voies métaboliques que les organismes utilisent pour s'accroître ou pour obtenir de l'énergie

peuvent aussi être utilisées des molécules de substances polluantes. Dans ce cas nommé co-métabolisme, le microorganisme ne retire aucun bénéfice direct. Les chercheurs tirent avantage de ce phénomène pour l'appliquer dans le domaine de la bioremédiation. Complète, une biodégradation parvient à détoxiquer des polluants jusqu'au stade du dioxyde de carbone, de l'eau et des sels minéraux inoffensifs. Une biodégradation incomplète peut fournir des produits de dégradation moins toxiques que le polluant initial, mais pas forcément. Par exemple, la biodégradation du trichloro- ou du tétrachloro éthylène peut libérer du chlorure de vinyle qui est plus toxique et plus cancérigène que les composés initiaux.

Le phénomène de biodégradation peut apparaître spontanément ; on utilise alors les termes de bioremédiation intrinsèque ou d'atténuation naturelle. Cependant, très souvent, les conditions naturelles ne sont pas suffisamment favorables, par manque d'éléments nutritifs, d'oxygène ou de bactéries appropriées. On peut améliorer ce genre de situations en complétant l'un ou l'autre des facteurs nécessaires ou même plusieurs. Par exemple, en 1989 lors de la marée noire due au pétrolier géant Exxon Valdez, on a dispersé des éléments nutritifs nécessaires pour accélérer la dégradation des hydrocarbures qui avaient été répandues sur 1000 miles le long de la côte d'Alaska. Dans le domaine de la bioremédiation, on aura de plus en plus tendance à observer la vitesse de la biodégradation naturelle et à intervenir seulement si l'activité naturelle ne suffit pas pour éliminer assez rapidement le polluant.

Les méthodes biologiques faisant appel aux microorganismes dépolluants ont prouvé leur efficacité pour les polluants organiques : dépollution biologique de l'air, des eaux usées, des milieux marins et des sites pollués par les hydrocarbures polycycliques, les composés chlorés ou les explosifs.

Connue sous le nom de la phytoremédiation, l'utilisation des plantes pour l'extraction des produits toxiques à partir du sol (plus particulièrement les métaux lourds) est passée depuis une dizaine d'années de la phase conceptuelle à la phase commerciale. Des recherches ont montré que certaines plantes peuvent accumuler des métaux lourds dans leurs parties aériennes avec des teneurs de 1,5% de la matière sèche. Elles également absorber et dégrader les produits pétroliers et les composés chlorés. Les faibles coûts associés à la technologie de phytoremédiation, ainsi que la possibilité de recyclage de certains métaux expliquent l'intérêt grandissant pour son développement.

2. Les origines de la pollution

L'origine des principales substances qui contaminent l'atmosphère est très variée. L'utilisation des combustibles fossiles comme source d'énergie constitue sans doute une

cause primordiale de la pollution de l'air. Il existe, cependant, d'autres sources de contamination de la biosphère : rejet des sous produits gazeux de l'industrie chimique, de poussières de certaines installations métallurgiques et les cimenteries industrielles. Les fermentations de matière organiques peuvent également dégager des gaz riches en hydrogène sulfuré et autres composés soufrés. La pollution atmosphérique peut résulter soit d'une augmentation de la concentration dans l'air de certains de ses constituants comme par exemple le gaz carbonique ou l'ozone (O₃), soit de l'introduction de composés étrangers à ce milieu (radioéléments, métaux lourds et composés organiques volatils), soit d'une conjugaison de ces deux phénomènes.

Les grands indicateurs de la pollution urbaine sont le dioxyde de soufre (SO₂), le monoxyde de carbone (CO), les oxydes d'azote (NO_x), l'ozone et les particules en suspension. Plusieurs travaux ont montré que ces substances présentent un risque potentiel pour la santé humaine. Les composés organiques volatils sont souvent des agents toxiques dont certains sont cancérogènes. Les hydrocarbures aromatiques monocycliques, les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les aldéhydes sont des composés organiques volatils qui ont des conséquences néfastes sur la santé. Ils peuvent engendrer des leucémies (benzène), le cancer du poumon (hydrocarbures aromatiques polycycliques) ou l'irritation des yeux et des muqueuses respiratoires (aldéhydes).

La pollution des sols affecte les campagnes. Elle est avant tout une conséquence de l'expansion de certaines techniques agricoles modernes. L'agriculture contemporaine doit produire des quantités croissantes d'aliments alors que la surface de la terre cultivable disponible par habitant diminue sans cesse, à cause de l'accroissement démographique, de l'extension ininterrompue des villes, de l'industrialisation et d'autres usages non agricoles du sol. Elle y parvient par une intensification des pratiques culturales qui conduit à perturber de plus en plus le flux d'énergie et le cycle de la matière dans les agro écosystèmes.

Les engrais chimiques sont ajoutés dans le sol afin d'accroître les rendements des cultures. Le principe de leur usage est fondé sur la constatation que l'on emporte avec la récolte une certaine quantité d'éléments nutritifs : azote, phosphore, potassium et dans une certaine mesure, soufre, calcium, magnésium et oligoéléments. Il faut donc restituer au sol ces substances sous forme de phosphates, nitrates, sels de potassium etc.

Le nitrate d'ammonium, le nitrate de calcium, le sulfate d'ammonium, l'urée, les phosphates et le chlorure de potassium sont les engrais chimiques les plus utilisés. Leur consommation mondiale a été multipliée par 18 entre 1946 et 1989, années où elle a atteint 145,7 x 10⁶ tonnes.

Les plantes utilisent le nitrate (NO_3^-) comme principale source d'azote. Elles le prélèvent dans le sol par l'intermédiaire de leurs racines et l'assimilent de façon à former l'azote organique, indispensable à la synthèse de toute protéine. L'assimilation du nitrate par les plantes est l'une des principales voies d'entrée de l'azote dans le monde vivant. L'importance considérable de cet anion pour la croissance des plantes en fait un élément incontournable de la fertilisation des sols cultivés. Il est, par conséquent, largement utilisé sous forme de sels pour la quasi-totalité des plantes d'intérêt économique. Ainsi, ce sont chaque année, entre 75 et 80 millions de tonnes d'engrais azotés qui sont répandues dans les cultures dans le monde et qui se retrouvent en partie dans les végétaux. Une absorption excessive de nitrate ou de ses produits dérivés (nitrites et nitroamines) peut avoir des effets néfastes sur la santé et la prudence veut qu'on en limite le taux dans les aliments. De plus, très facilement entraînés par les eaux de pluie, les nitrates s'accumulent dans les nappes phréatiques. Leur présence en quantité importante dans les eaux provoque un développement anarchique de microorganismes, d'algues et de plantes qui perturbent les équilibres naturels (eutrophisation). L'utilisation massive d'engrais azotés s'accompagne également d'un rejet important de monoxyde d'azote (NO) dans l'atmosphère, lequel contribue à la destruction de couche d'ozone et à l'aggravation de l'effet de serre.

Pour des raisons économiques les phosphates ne sont pas purifiés. Ils renferment ainsi, à l'état de traces, de nombreux métaux et métalloïdes toxiques. A cet apport de métaux lourds par la fumure, il faut ajouter ceux qui résultent des pulvérisations des pesticides (sels de cuivre, arséniate de plomb) et des retombées atmosphériques (plomb, cadmium, molybdène etc..)

Chaque année, plus de 4 millions de tonnes de pétrole sont répandus accidentellement dans les océans et sur les côtes. A ces hydrocarbures s'ajoutent de nombreux autres polluants d'origine urbaine, agricole et industrielle véhiculés par les rivières ou émanant de retombées atmosphériques : polychlorobiphényles, hydrocarbures aromatiques polycycliques, herbicides et insecticides, nitrates et phosphates, métaux lourds (cadmium, mercure, plomb, nickel) radionucléides (strontium et uranium).

2. Bioremédiation par les microorganismes

2.1. Introduction

La nécessité de dépolluer les sites contaminés a conduit au développement de nouvelles technologies de l'environnement qui ont pour objectif de détruire les composés xénobiotiques plutôt que de les accumuler dans les décharges. La bioremédiation est une option qui offre la possibilité de détruire ou de rendre moins toxiques les polluant, en utilisant des activités biologiques naturelles. Les microorganismes sont utilisés depuis environ un siècle pour le traitement des eaux usées et des composts. Ce qui est nouveau c'est l'utilisation de ce procédé microbiologique pour nettoyer les sols, les eaux souterraines, les estuaires etc. Les systèmes sont différents en raison de la nature du polluant et du milieu où se déroule la dégradation. Les sites sont fréquemment contaminés par un mélange de composés organiques très complexes comme par exemples les huiles minérales ou les solvants industriels. A cela s'ajoutent des polluants inorganiques comme les métaux lourds.

2.2. Principe de la bioremédiation

Le procédé de la bioremédiation consiste à activer la capacité naturelle que possèdent de nombreux organismes, la plupart des temps microscopiques (bactéries, microalgues, champignons), à dégrader les polluants en composés inertes, comme l'eau et le gaz carbonique. Ces organismes peuvent être indigènes (déjà présents dans la zone polluée), ou exogènes (ajoutés au milieu), ou encore être prélevés sur le site contaminé, cultivées au laboratoire puis réintroduits dans le sol (bioaugmentation). La bioremédiation se déroule généralement en condition d'aérobie, cependant l'application de systèmes de bioremédiation en condition d'anérobie permet la dégradation d'un certain nombre de molécules récalcitrantes. Les principales technologies utilisées dans la bioremédiation sont les suivantes :

La bioaugmentation :

Cette technologie consiste à introduire des cultures de microorganismes à la surface du milieu contaminé dans l'objectif d'augmenter la biodégradation des contaminants organiques. Généralement les microorganismes sont sélectionnés sur la base de leur aptitude à dégrader les composés organiques présents dans le site à dépolluer. La culture peut comprendre une ou plusieurs espèces de microorganismes. Des éléments nutritifs sont généralement apportés dans la solution contenant les microorganismes. Cette suspension de microorganisme est apporté à la surface du sol dans les conditions naturelles ou injecte dans le site contaminé sous pression.

Cette technologie est largement utilisée pour décontaminer les sites contenant des hydrocarbures : Les microorganismes choisis sont des bactéries dotées d'une grande capacité de digestion de ces hydrocarbures.

La biofiltration consiste à l'utilisation d'un biofiltre pour traiter les émissions gazeuses : Le principe consiste à utiliser des microorganismes pour dégrader les polluants contenus dans l'air à traiter : la phase aqueuse (l'air contaminé) est mise en contact avec une phase aqueuse dans laquelle se développe la population microbienne, connue aussi sous le nom de la biomasse. Dans une unité de biofiltration, l'air à épurer (à dépolluer) traverse d'abord un filtre et un humidificateur afin de supprimer les particules (poussières, graisses) présentes dans le gaz et d'amener le niveau d'humidité à 100%. L'air est ensuite introduit dans un réacteur (une cuve) contenant un garnissage formé de matériaux très poreux (très avide pour l'humidité). A la surface des particules qui constituent le garnissage se trouve un biofilm qui correspond à une pellicule d'eau contenant des microorganismes (bactéries et champignons) dont la fonction est de dégrader les polluants présents dans l'air à traiter.

Cette technologie est par exemple utilisé pour traiter l'air polluer par le xylène ou par des composés azotés

La biostimulation Cette technologie consiste à stimuler l'activité des populations microbiennes indigènes (présentes dans le sol ou dans les eaux souterraines) par apport de nutriments et par ajustement des conditions du milieu (potentiel d'oxydo-réduction, humidité).

Le compostage peut être défini comme un procédé biologique contrôlé qui assure la transformation et la valorisation des matières organiques (sous produits de la biomasse, déchets organiques d'origine biologique) en un produit stabilisé, hygiénique, semblable à un terreau riche en composés humiques le compost. C'est la fermentation des ordures ménagères organiques (résidus alimentaires) et des déchets verts (feuillages, résidus de jardinage) afin de produire un compost réutilisable en agriculture ou dans le jardin pour fertiliser la terre. L'aération et l'humidité sont deux éléments indispensables pour entretenir les conditions d'une bonne fermentation. Le compostage peut se faire chez soi ou collectivement par des procédés industriels.

La biolixiviation. C'est la lixiviation favorisée par la voie biologique (généralement bactérienne). Elle correspond à une méthodologie de solubilisation des métaux lourds grâce à des bactéries acidophiles fonctionnant en présence ou en l'absence d'oxygène. Deux facteurs sont importants pour la biolixiviation : la température qui doit être comprise entre 25 et 35 °C. La taille des particules qui doivent être très proches de celle des bactéries.

2.3. Les microorganismes utilisés en bioremédiation

Ils proviennent de milieux très variés et peuvent vivre dans des conditions extrêmes : des températures en dessous de 0°C ou au contraire, très élevées, dans des milieux inondés ou en plein désert, en présence d'un excès d'oxygène ou milieu anaérobie. En raison de leur pouvoir d'adaptation, ces microorganismes sont utilisés pour éliminer les composés xénobiotiques.

Parmi les bactéries aérobies reconnues pour leur pouvoir de dégradation, nous pouvons citer celles appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas* et *Mycobacterium*. Elles peuvent dégrader les pesticides, les hydrocarbures, les alcanes et les composés polyaromatiques. Souvent, elles utilisent le polluant comme source de carbone et d'énergie. Les bactéries anaérobies sont moins fréquentes que les aérobies. Cependant, elles présentent un grand intérêt dans la bioremédiation des polyphényles polychlorés, du trichloroéthylène et le 1,2 dichloroéthane. Dans tous les cas, l'opération implique le contrôle non seulement de la disponibilité des dépollueurs mais aussi l'ajustement en permanence des conditions de leur efficacité: quantité et type de nutriments, concentration en oxygène, pH, température et salinité.

2.4. Exemples de biodégradation

2.4.1. Biodésulfuration des carburants

Afin de minimiser l'impact des oxydes de soufre libérés par la combustion des sources d'énergie fossile, les législations actuelles imposent une réduction sensible de la teneur en soufre des carburants issus du pétrole. Ainsi dans l'union européenne, la teneur maximale autorisée en soufre est passée de 0.2 à 0.035% dans une première phase, puis à 0.005% à partir de 2005. Les méthodes chimiques de désulfuration (hydrosulfuration) sont coûteuses et exigeraient des dépenses de 38 milliards de dollars dans les 10 ans à venir. Ce sont en effet les composés les plus résistants qu'il faudra désulfurer comme les thiophènes condensés. Aussi, certaines compagnies pétrolières accordent actuellement un intérêt particulier à l'utilisation de nouveaux procédés tels que la désulfuration microbiologique, appliquée en particulier au

gazoale, produit intermédiaire entre l'essence dont la désulfuration chimique est plus facile et les fiouls lourds riches en composés soufrés complexes souvent difficiles à traiter.

Le soufre étant indispensables aux microorganismes pour la synthèse des acides aminés soufrés et de certaines vitamines. Les chercheurs ont sélectionné des souches capables d'utiliser le dibenzothiophène (DBT) comme unique source de soufre. En réalité, les bactéries privilégient le sulfate (SO_4^{2-}), très répandu dans la nature pour s'approvisionner. Les souches capables d'oxyder le DBT ne sont donc pas très abondantes. Elles ne peuvent exister que dans des environnements exempts de sulfate et riches en soufre organique.

Depuis quelques années, des progrès considérables ont été effectués dans les mécanismes de dégradation du DBT par la souche modèle *Rhodococcus* IGTS8. Deux étapes sont nécessaires à la production de bactéries actives par fermentation puis leur utilisation comme biocatalyseurs de désulfuration à température et pression ambiante. La firme américaine Energy Biosystems expérimente un pilote de biosulfuration capables de traiter jusqu'à 800 litres par jour de produits pétroliers (<http://energybiosystems.com>). Le principe en est le suivant : le biocatalyseur mélangé à l'eau est transféré dans un bioréacteur où il opère en présence d'oxygène, l'eau servant à extraire du bioréacteur le sous produit soufré (sulfite) résultant de la dégradation enzymatique. Le carburant, une fois désulfuré, est séparé du mélange actif pour être récupéré, tandis que le biocatalyseur est recyclé.

Il reste, cependant, de nombreux points à maîtriser pour convaincre les compagnies pétrolières d'implanter un procédé biologique dans leur raffinerie. L'optimisation de la production de biocatalyseur (concentration finale, productivité), la stabilité du système et la spécificité (le DBT est l'une des plus importantes molécules soufrées du gazole mais il existe d'autres plus complexes).

2.4.1. Biofiltration des effluents

la dégradation des composés organiques volatils (COV) par les microorganismes capables de les utiliser comme source d'énergie ou de carbone, abrités dans un bioréacteur filtrant les effluents gazeux, représente une solution moins onéreuse que les méthodes physico-chimiques, qui peuvent dégager des composés toxiques comme les oxydes d'azote. Déjà largement utilisé pour le traitement de l'eau et de certains rejets liquides industriels, le traitement biologique s'étend depuis quelques années aux effluents gazeux, en particulier en Hollande, en Allemagne et plus récemment aux USA.

Selon la nature des polluants à éliminer, la transformation biologique implique des bactéries, des algues ou des champignons. De manière générale, de nombreuses souches microbiennes métabolisent les alcools, les acides, les esters et les cétones. Les hydrocarbures aromatiques nécessitent une assez longue adaptation de la population microbienne dans le réacteur. Il faut considérer éventuellement la toxicité de certains composés présents dans les gaz à traiter comme le dioxyde de soufre. Il est donc indispensable d'analyser soigneusement l'effluent et de concevoir une unité de biotraitement. Certaines institutions comme l'Institut de Pasteur (Paris) proposent des catalogues de souches pures adaptées à des polluants précis. Il est cependant plus simple d'ensemencer le réacteur avec de la boue active provenant d'une station d'épuration d'eau, dont la population microbienne s'adaptera d'elle-même. Quelque soit l'origine de la souche dégradant le polluant, une population microbienne extrêmement variée se développera dans le bioréacteur. Il arrive souvent que les bactéries ne dégradent pas complètement les composés organiques volatils mais les transforment en métabolites secondaires, eux-mêmes utilisés comme substrats nutritifs par d'autres espèces. Ainsi de proche en proche, les microorganismes finissent par dégrader totalement les COV en eau, sels et gaz carboniques (CO₂). Les cellules mortes servent à leur tour de substrat à des espèces saprophytes, si bien que le réacteur peut être considéré comme un système fermé.

Exemples : Un système de biofiltres sert à éliminer les oxydes d'azote et de soufre au niveau des gaz s'échappant de la cheminée des hauts fourneaux (ce système a été développé pour remplacer le procédé classique au gypse). C'est à l'aide d'un biofiltre contenant des champignons qu'on retire le styrène (hydrocarbure benzénique C₆H₅CH=CH₂) présent dans les déchets gazeux résultant du traitement du polystyrène (Matière thermoplastique obtenue de la polymérisation du styrène).

2.4.2. Dépollution des eaux usées et des effluents industriels

Dans les stations d'épuration, ce sont des microorganismes qui retirent des eaux usées les polluants les plus courants, avant qu'elles ne rejoignent la rivière, le lac ou la mer. Les pollutions croissantes (dues à l'industrie et à l'agriculture) nécessitent le développement de procédés capables d'éliminer des polluants spécifiques comme l'azote, le phosphore, les métaux lourds et les composés chlorés.

Selon la vieille méthode des boues activées, les eaux usées passent dans un premier bassin dit biologique, où un agitateur mécanique brasse les boues (mélange de biomasse, de polluants et de débris) pour les maintenir en suspension et stimuler la biodégradation du substrat. Les bactéries se développent librement dans ce bassin où les effluents sont fournis de manière continue et les boues se décantent. L'eau est alors libérée dans la nature (et utilisée) alors que les boues sont maintenues dans ce bassin biologique.

Plusieurs dizaines d'espèces bactériennes, en particulier du genre *Pseudomonas*, peuvent dégrader les polluants organiques. Ces organismes hétérotrophes se reproduisent très vite et les boues sont renouvelées au bout de 2 à 10 jours. En revanche les *Nitrosomas*, qui transforment en nitrite les fortes concentrations d'ammoniac des eaux résiduaires et les *Nitrobacters* qui convertissent ces nitrites en nitrates ont un faible taux de croissance. Pour laisser à ces bactéries le temps d'opérer, on ne peut renouveler les boues qu'en 20 jours environ.

A la place des cultures libres, les professionnels développent depuis quelques années des cultures de bactéries sur des supports minéraux fixes ou sur des supports mobiles constitués de billes de polystyrène en suspension. Le recyclage des déchets en produits utiles peut réduire les coûts du traitement des eaux usées. Par exemple, grâce à des bactéries utilisant le soufre dans leur métabolisme, les métaux lourds et les composés soufrés, présents dans les eaux usées peuvent être retirés puis réutilisés. La production d'aliments pour les animaux à partir la biomasse de champignons qui demeure après l'extraction de la pénicilline en est un autre exemple. Enfin la plupart des systèmes de traitement des eaux usées produisent un gaz utilisable (biogaz).

2.4.3. Traitement des sols et de la terre agricole

Certaines méthodes ont été développées pour dépolluer les sols et les eaux de la nappe phréatique aussi bien in situ (à leur place originelle) que ex situ (ailleurs). Les traitements in situ peuvent comprendre l'introduction de microorganismes (bioaugmentation, bioaddition ou encore bioenrichissement), l'aération et/ou l'addition de solutions nutritives (biostimulation).

Le traitement *ex situ* suppose qu'on retire l'eau de la nappe phréatique pour les traiter en surface. Le sol peut être traité sous forme de compost, amassé en surface dans des andains, ou traité dans des bioréacteurs à boues spéciales. L'eau de la nappe phréatique est traitée dans des bioréacteurs puis soit repompée vers le sol soit drainée et conduite vers les eaux superficielles. La bioremédiation de la terre agricole (bioréhabilitation) coûte souvent moins cher que les méthodes physiques. Son action nécessite toutefois du temps et immobilise les capitaux et la terre. La bioremédiation *in situ* du sol situé sous les exploitations de pétrole est déjà une pratique courante, mais la bioremédiation *in situ* est aussi possible pour les solvants chlorés. La faisabilité de cette méthode de bioremédiation *in situ* dépend des paramètres physiques du sol. La bioremédiation peut utiliser des plantes: on la nomme alors phytoremédiation ou phyto-assinissement. Cette technique est déjà utilisée pour éliminer les métaux contaminant les sols et l'eau de la nappe phréatique; on cherche à la développer dans la décontamination biologique d'autres polluants. L'utilisation combinée de plantes et de bactéries pourrait aussi être possible. Des bactéries vivent en étroite association avec les racines de certaines plantes et dépendent de substances excrétées par les racines. Ces rhizobactéries, qui dépassent en nombre les autres bactéries du sol, pourraient être génétiquement transformées de manière à dégrader des substances polluantes. Des recherches sont en cours pour examiner cette voie.

2.4.4. Dépollution du milieu marin

Pour lutter contre les marées noires (arrivée de nappes de pétrole provenant d'un navire qui a été accidenté ou qui a purgé ses réservoirs ou de l'éruption accidentelle d'une tête de puits sous marine), l'expérience a prouvé que la plupart des produits commercialisés à base de microorganismes exogènes ne sont pas plus efficaces que les organismes oléophiles (microorganismes qui dégradent les produits pétroliers) indigènes, dont la prolifération est stimulée par la marée noire. Le mouvement des marées apporte l'oxygène nécessaire, ainsi un simple ajout de fertilisants azotés dans les zones contaminées suffit pour éliminer la pollution 3 à 5 fois plus vite que dans les zones non traitées. Malheureusement un tel succès dans le nettoyage d'une marée noire reste rare. La bioremédiation ne devient efficace que lorsque la couche de pétrole n'est pas épaisse, c'est-à-dire après plusieurs nettoyages mécaniques. Lorsque la couche est épaisse, l'absence d'oxygène à l'intérieur de la couche d'hydrocarbures diminue l'action des microorganismes.

Un autre problème auquel est confronté la dépollution est la contamination des sédiments des océans et des estuaires. Au cours du temps, un grand nombre de polluants comme les

polychlorobiphényles, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les pesticides s'accumulent. Leur attaque par les bactéries est parfois difficile en raison de leur adsorption sur les particules sédimentaires. Des détergents (produits permettant d'éliminer d'un milieu solide les particules étrangères qui y adhèrent par leur mise en suspension ou en solution) d'origine microbienne, les bio surfactants peuvent permettre leur désorption et faciliter leur attaque par les bactéries.

Les chercheurs travaillant sur les microorganismes qui utilisent des hydrocarbures comme seule source de carbone pour leur croissance, ont observé que ces microorganismes libèrent leurs propres agents surfactants dans le milieu. En facilitant la désorption des nutriments dans la matrice du sol ou leur dispersion dans l'eau, ces biosurfactants rendent les souches microbiennes qui les sécrètent plus compétitives.

Au cours de ces dernières années, la recherche sur les biosurfactants a fortement augmenté sous l'effet des progrès de la biotechnologie. Aussi efficaces que leurs homologues chimiques, les biosurfactants présentent l'avantage d'être biodégradables et non toxiques. De plus certains qui sont sécrétés par des organismes extrêmophiles (et sont donc très efficaces), restent fonctionnel malgré les conditions sévères de température, de salinité et de pH.

De nombreux microorganismes producteurs de biosurfactants ont été déjà isolés et il est devenu maintenant possible de produire par voie biologique une grande variété de biosurfactants dont la nature chimique et les propriétés dépendent des paramètres physiques de l'environnement (pH, température, salinité,...) et de la composition du milieu nutritif (N, P, K, Fe et Mn). Les conditions qui existent dans le futur milieu d'utilisation du biosurfactant déterminent d'ailleurs en grande partie le choix d'une souche pour une application donnée. Etant donné leur diversité chimique et fonctionnelle, les biosurfactants trouveront probablement des applications aussi variées que leurs homologues de synthèse.

LA PHYTOREMEDIATION

1. Introduction

La phytoremédiation est définie comme l'utilisation des plantes pour éliminer ou transformer les polluants en composés moins toxiques. Bien que les plantes soient utilisées depuis longtemps pour dépolluer les sols, d'importantes découvertes scientifiques réalisées au cours de ces dix dernières années ont contribué à améliorer le processus et à étendre son champ d'application. Elle peut être utilisée aussi bien contre les polluants organiques que les polluants inorganiques présents dans les milieux solides (sols), liquides (eaux de surface et souterraines) et gazeux. La phytoremédiation regroupe :

- (i) *la phytoextraction* : utilisation des plantes pour extraire du sol les polluants organiques et les métaux et les concentrer dans les organes de la plante destinés à la récolte,
- (ii) *la rhizofiltration*, correspond à l'utilisation des racines pour absorber et accumuler les polluants (métaux) des eaux usées,
- (iii) *la phytostabilisation* ; utilisation des plantes pour limiter l'érosion et immobiliser les polluants dans les couches superficielles évitant en particulier leur migration vers les eaux de surface et souterraines,
- (iv) *la phytovolatilisation* : utilisation des plantes pour extraire les polluants du sol et les transformer en composés volatils
- (v) *la phytodégradation* : utilisation de l'association plantes/microorganismes pour dégrader les polluants organiques du sol.

2. Phytoremédiation des sols contaminés par les métaux

Parmi les différentes méthodes de phytoremédiation, la plus utilisée est la phytoextraction. Elle a été en particulier appliquée pour la dépollution des métaux. La liste des éléments les plus connus pour leurs effets toxiques et susceptibles de polluer les sols, est représentée dans le tableau suivant.

Tableau. Gamme des concentrations des polluants métalliques les plus répandus dans l'environnement

Eléments	Gamme des teneurs (mg.kg ⁻¹)	Limite réglementaire (mg.kg ⁻¹)
Plomb	1-6900	600
Cadmium	0.1- 345	100
Arsenic	0.1-102	20
Chrome	0.005-3950	100
Mercuré	0.0001-1800	270
Cuivre	0.030-550	600
Zinc	0.150-5000	1500

2.1. Phytoextraction

C'est la voie dans laquelle les chercheurs se sont le plus investis depuis le début de cette décennie. La phytoextraction utilise des plantes capables de prélever les éléments traces toxiques et de les accumuler dans les parties aériennes qui seront ensuite récoltées puis incinérées (Figure 1). Les cendres seraient alors mises en décharges ou mieux réutilisées en métallurgie. Deux stratégies sont actuellement développées dans la phytoextraction. Il y a la *phytoextraction assistée* par des chélateurs de métaux. Cette méthode est désignée également par la *phytoextraction induite* et d'autre part la *phytoextraction continue*. Parmi ces deux procédés la phytoextraction assistée est la plus développée. Cependant, la phytoextraction continue commence à être appliquée pour la dépollution des métaux lourds (Zinc, Cadmium, nickel) et des métalloïdes (Sélénium, Arsenic). Les deux stratégies ont fait l'objet d'essais en plein champ et les résultats, bien qu'encourageants, nécessitent plus d'efforts pour améliorer le processus.

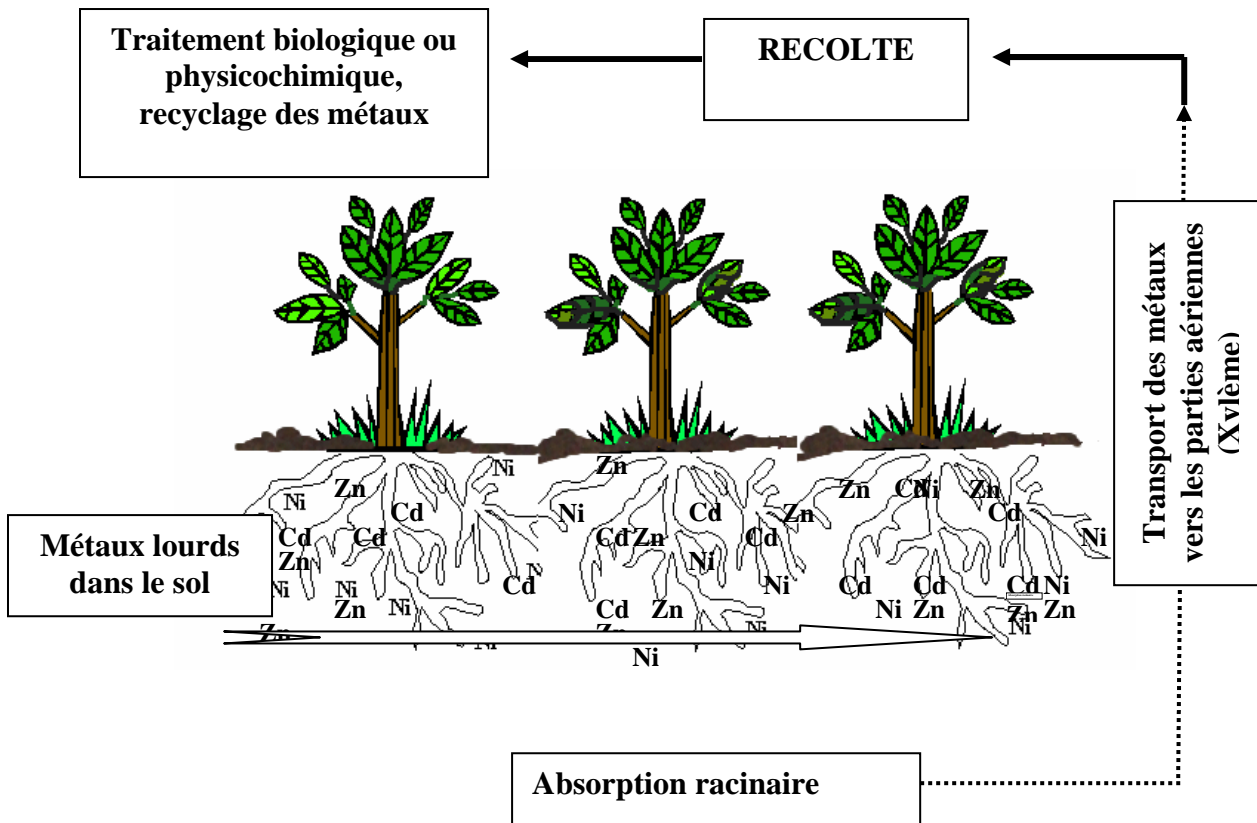


Figure I : Représentation schématique du processus de phytoextraction des métaux lourds.

2.1.1. Phytoextraction assistée

2.1.1.1 Concept de la phytoextraction assistée

Pour le plomb, le cadmium, l'arsenic, on ne connaît pas de nos jours des plantes capables d'accumuler naturellement de grandes quantités de ces éléments. Par exemple, la végétation qui croît sur un milieu contaminé par le plomb renferme seulement 0.01 à 0.06 % de ce polluant dans la partie aérienne. Ces teneurs sont inférieures à celles requises pour une phytoextraction efficace. Des expériences réalisées ont montré que l'application d'un chélateur synthétique comme l'acide éthylènediaminetétraacétique EDTA aux sols stimulait l'absorption et l'accumulation du plomb dans la partie aérienne. Ces travaux ont montré que le taux de plomb dans la partie aérienne pouvait dépasser 1% de la matière sèche. Cette découverte a été à l'origine de l'amélioration du procédé de la phytoextraction du plomb et a ouvert la voie au développement de cette technologie à d'autres métaux en utilisant des chélateurs appropriés.

La quantité du métal extraite du sol est représentée par sa teneur dans le matériel végétal multipliée par la quantité de biomasse récoltée. Le fait que des plantes produisant une

grande quantité de biomasse, comme par exemple le colza, le maïs, le tournesol puissent être stimulées pour accumuler le plomb dans leur partie aérienne, représente un autre atout pour le développement de la phytoextraction assistée par les chélateurs.

Le concept de la phytoextraction induite est également applicable à d'autres métaux. D'autres expériences réalisées sur des sols contaminés par plusieurs métaux, montrent une accumulation simultanée du plomb, du cadmium, du cuivre, et du zinc chez des plantes de colza après application de l'EDTA. La stimulation de l'accumulation du métal est directement reliée à l'affinité du chélateur pour le métal et suggère que, pour obtenir une phytoextraction, un chélateur synthétique ayant une grande affinité pour le métal à extraire doit être utilisé.

Sur la base de cette information, un protocole pour la phytoextraction assistée par des chélateurs a été récemment proposé :

- (i) le site contaminé est évalué et une étude préliminaire permet de déterminer la combinaison appropriée chélateur / plante,
- (ii) le site est préparé et les plantes sont cultivées,
- (iii) une fois que la production de biomasse est optimale, le chélateur approprié est appliqué,
- (iv) après une période d'accumulation pouvant s'étendre sur une période allant de quelques jours à quelques semaines, la récolte est réalisée

Selon la saison et la fréquence des récoltes, le site peut être cultivé de nouveau pour d'autres phytoextractions. Les estimations suggèrent que les plantes peuvent extraire entre 180 et 530 kg ha⁻¹ de plomb par an et que la dépollution d'un sol qui renferme plus de 2500 mg / Kg de plomb est possible sur une dizaine d'années. Après chaque récolte, le matériel végétal contaminé est réduit par incinération et les cendres sont déposées en décharge. Si le coût le permet, le métal extrait d'un sol pollué peut être réutilisé de nouveau dans les différentes activités industrielles.

2.1.1.2 Développement de la phytoextraction assistée

La découverte de l'absorption assistée par des chélateurs chez les plantes est très récente. La phytoextraction assistée est basée sur deux principes : (i) augmenter la concentration du métal dans la solution du sol, (ii) augmenter l'absorption et le transport de ce métal vers la partie aérienne de la plante, qui est plus facile à récolter. L'augmentation de la concentration du métal dans la solution du sol peut s'expliquer par la forte affinité du

chélateur utilisé. Ce dernier peut se lier au métal et passer dans la solution du sol. Cependant, les mécanismes impliqués dans l'absorption et la translocation, assistée par des chélateurs, ne sont pas encore connus

Après application de l'EDTA, l'accumulation du plomb dans la partie aérienne est directement corrélée avec l'accumulation de l'EDTA. Ce résultat suggère clairement que ce métal est transporté dans la plante sous la forme du complexe Pb-EDTA. La présence d'une teneur élevée en EDTA dans les tissus de la plante pourrait augmenter la concentration du plomb soluble par la formation du complexe Pb-EDTA et augmenter ainsi sa migration vers la partie aérienne où il s'accumule. Cette migration vers la partie aérienne est assurée par le courant de la transpiration. Au niveau de la feuille, l'eau s'évapore et le complexe métal-chélateur se concentre (ou s'accumule).

2.1.2 Phytoextraction continue

Parallèlement au développement de l'accumulation assistée par des chélateurs, d'autres auteurs se sont intéressés aux processus physiologiques particuliers qui permettent aux plantes d'accumuler les métaux durant toute la période de leur croissance. Le mode d'absorption des métaux est optimisé chez les plantes hyperaccumulatrices qui poussent sur des sols riches en métaux lourds et capables d'accumuler de grandes quantités de métaux dans leur partie aérienne où le taux de Zn, Ni, Mn est parfois supérieur à 1% de la matière sèche.

Contrairement à l'absorption assistée par des chélateurs, la phytoextraction continue est basée sur les capacités génétiques et physiologiques des plantes spécialisées dans l'absorption, la translocation et la tolérance des métaux. Les inconvénients majeurs de l'utilisation de ces plantes dans la phytoremédiation sont représentées par une faible production de biomasse et une croissance beaucoup trop lente. A cela s'ajoute l'inexistence de plantes hyperaccumulatrices de métaux fortement impliqués dans la pollution de l'environnement (plomb, cadmium, arsenic). Cependant, une recherche approfondie sur les mécanismes biologiques des plantes hyper accumulatrices pourrait contribuer au développement des plantes supérieures pour la phytoremédiation des métaux.

2.1.2.1 . Concept de la phytoextraction continue

Depuis longtemps déjà, les botanistes et les géologues à la recherche de gisements miniers, ont rapporté l'existence de plantes tolérantes aux métaux lourds. Elles colonisent

les secteurs métallifères où les autres espèces disparaissent. Cependant, la majorité de ces plantes accumulent les métaux dans leurs racines et seule une légère partie des métaux atteint les tissus aériens où les teneurs comme pour la plupart des espèces végétales, ne dépassent pas 0.005 à 0.5 % de la matière sèche. Ces plantes présentent donc peu d'intérêt pour la phytoextraction continue. Certains chercheurs ont utilisé le terme hyper accumulateur pour décrire les plantes avec une teneur en Nickel supérieure à 1000 µg/g MS au niveau des feuilles, ce qui correspond à une valeur nettement plus élevée que celle rencontrée généralement chez les plantes voisines non accumulatrices. D'autres plantes hyperaccumulatrices comme *Viola calaminaria* et *Thlaspi caerulescens*, qui poussent sur des sols naturellement riches en métaux lourds accumulent le zinc dans les feuilles avec des taux respectifs d'environ 1 et 1,7 % de la matière sèche. Par comparaison, les plantes qui poussent sur des sols non contaminés ont un taux de zinc qui varie entre 0.001 et 0.02%. Des plantes pouvant accumuler des taux élevés de cobalt, cuivre, manganèse et probablement plomb ont été également décrites. Les premiers hyper accumulateurs caractérisés appartenaient aux familles des Brassicacées et des fabacées. Actuellement environ 400 espèces hyper accumulatrices ont été répertoriées et ce nombre est appelé à changer avec l'exploration de nouveaux sites contaminés

Tableau. Nombre d'espèces hyper accumulatrices

Métal	Critères (% MS des feuilles)	nombre d'espèces
Cadmium	>0.01	1
Cobalt	>0.1	28
Cuivre	>0.1	37
Plomb	>0.1	14
Manganèse	>1	9
Nickel	>0.1	317
Zinc	>1	11

2.1.2.2. Développement de la phytoextraction continue

La capacité des plantes hyper accumulatrices à concentrer les métaux lourds au niveau de la feuille représente un facteur important pour leur utilisation dans le développement de la phytoextraction continue. La majorité des plantes hyper accumulatrices présentent une faible production de biomasse et une croissance lente, tandis que les plantes à croissance rapide et produisant beaucoup de biomasse sont sensibles aux métaux lourds et les accumulent généralement au niveau des racines. Pour pallier à ces inconvénients et développer avec succès une phytoextraction continue, deux stratégies sont actuellement envisageables. La première consiste à prospecter d'autres sites pollués avec pour objectif la découverte de plantes ayant une forte production de biomasse. La deuxième approche consiste à comprendre et exploiter les mécanismes impliqués dans la résistance, l'absorption et l'accumulation des métaux. Les données bibliographiques sur la nutrition minérale sont riches en informations concernant ces mécanismes. Ceci permet d'identifier des gènes utilisables pour la transformation par génie génétique des plantes sensibles à forte production de biomasse en plantes hyper accumulatrices.

2.1.2.3. Différentes espèces hyper accumulatrices des métaux

La flore des sols riches en serpentine, une roche métamorphique riche en métaux, comprend un grand nombre de plantes contenant plus de 0.1% de Nickel. Ce taux peut atteindre 5% alors que chez les végétaux ordinaires ce métal devient toxique, dès 0.005 à 0.01%. Le record revient à *Sebertia acuminata*, un arbre poussant sur les sols de serpentine de nouvelle Calédonie et dont le latex contient plus de 20% de Nickel. Ces hyper accumulateurs de nickel appartiennent à diverses familles dont les Brassicacées et les Euphorbiacées. On les trouve sous les tropiques (Nouvelle Calédonie, Asie, Cuba, Zimbabwe, Zambie, ex Zaire) et dans les régions tempérées (Europe, Californie) où les genres *Alyssum* et *Thlaspi* de la famille des Brassicacées sont très fréquentes.

Le nombre des hyper accumulateurs de Zinc est moins important que pour le Nickel. Une vingtaine d'espèces peuvent accumuler plus de 1% de Zinc. Elles ont été identifiées tant sur des gisements métallifères affleurant que sur d'anciens sites miniers ou industriels. *Thlaspi caerulescens* peut accumuler jusqu'à 4% de la matière sèche dans sa partie aérienne.

L'hyperaccumulation du cadmium correspond à des teneurs supérieures à 0.01% de matière sèche reste un phénomène rare. *Thlaspi caerulescens* qui est un hyper

accumulateur de Zinc peut accumuler en même temps le Cadmium dans la partie aérienne avec une concentration de 1000 µg / g MS.

La république démocratique du Congo (Ex Zaïre) détient le monopole des plantes hyper accumulatrices de cuivre. 24 hyper accumulateurs ont été répertoriés, parmi eux certains peuvent aussi accumuler le cobalt. Ces espèces appartiennent pour la plupart à la famille des Laminacées et des Scrophulariacées. La plus forte teneur en cuivre rencontrée (13700 µg / g MS) se retrouve chez *Aeollanthus biformifolius* (Laminacées).

2.1.2.4. Mécanismes de la résistance aux métaux

La phytoextraction continue implique l'accumulation du métal dans la partie aérienne de la plante, et ceci durant tout son cycle de développement. Pour y parvenir, les plantes possèdent des mécanismes performants pour la détoxification du métal accumulé. Par exemple, des travaux ont montré que la résistance au Nickel chez *Thlaspi caerulescens* est déterminante pour l'hyperaccumulation du métal. De plus la manipulation génétique peut constituer une autre voie de développement de plantes performantes pour la phytoextraction. Ainsi des plantes transformées d'*Arabidopsis thaliana* pouvant exprimer une mercure réductase bactériennes sont devenues résistantes et peuvent extraire une grande quantité de mercure à partir des sols pollués, ce qui les rend apte à la phytoremédiation.

Pour développer des plantes hypertolérantes capables de supporter de fortes concentrations d'ions métalliques, il est indispensable de comprendre les mécanismes moléculaires et biochimiques adoptés par les plantes pour résister aux effets toxiques des métaux. L'hypertolérance repose sur le fait qu'une substance n'est néfaste pour un organisme que si elle s'insère dans son métabolisme. Les hyper accumulateurs mettent en œuvre une stratégie de séquestration qui rend l'élément biologiquement indisponible (inactif), bien que présent dans la plante. Pour le cadmium par exemple, plusieurs mécanismes de détoxification ont été décrits. Certains sont en étroite relation avec la phytoremédiation, comme par exemple la chélation et la compartimentation (Figure 2).

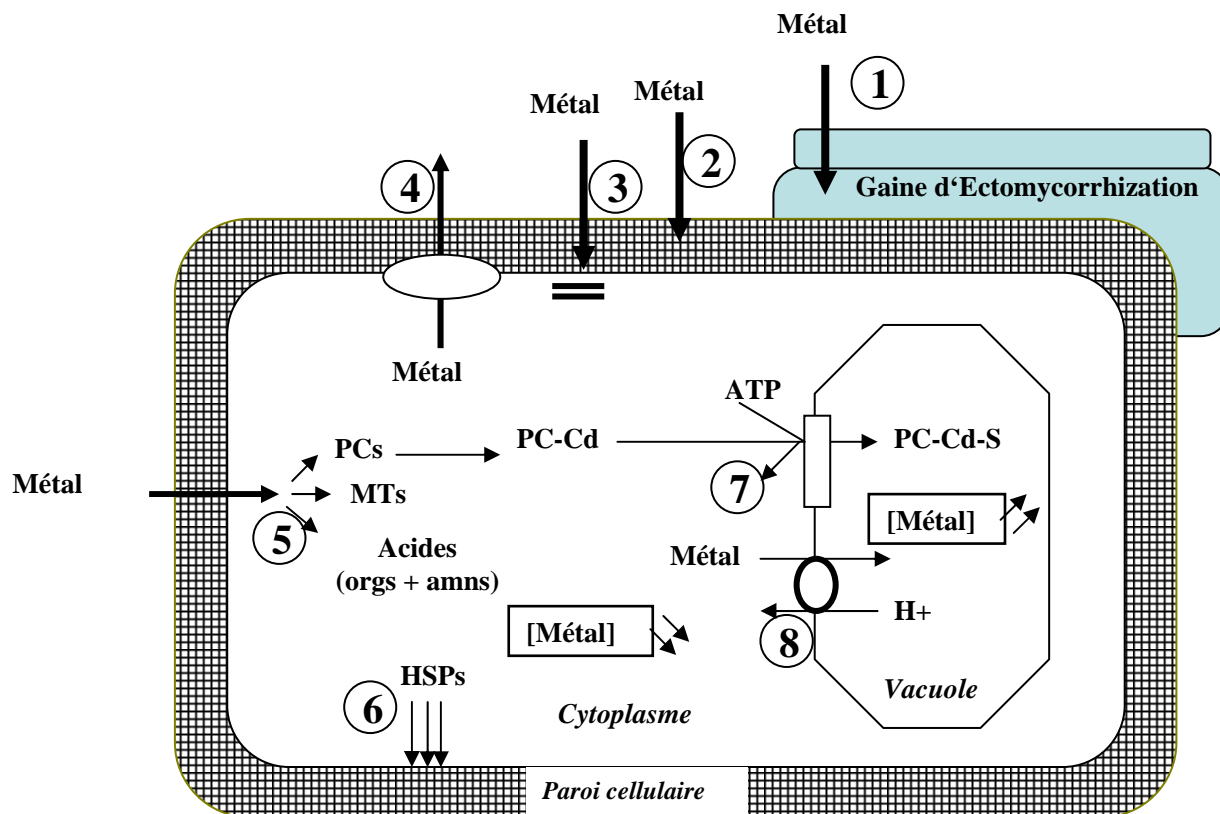


Figure 2 : Mécanismes cellulaires impliqués dans la détoxification des métaux et la tolérance chez les plantes supérieures. 1. limitation du passage des métaux dans les cellules racinaires par les mycorhizes, 2. La fixation des métaux sur la paroi cellulaire et par les exsudats racinaires, 3. Réduction de l'influx des métaux à travers la membrane plasmique, 4. Efflux actif des métaux à partir du cytoplasme, 5. La chélation cytoplasmiques par divers ligands, 6. Protection et réparation de la membrane plasmique contre les destructions induites par les métaux, 7. Transport des complexes Cd-phytochélatines dans la vacuole, 8. Compartimentation vacuolaire d'autres métaux non chélates.

Chélation

La fixation des ions métalliques par des ligands spécifiques à forte affinité réduit leur concentration dans les compartiments intracellulaires et par voie de conséquence leur phytotoxicité. Chez les plantes, il existe plusieurs types de ligands: acides organiques, acides aminés et peptides.

Les plantes photosynthétiques sont riches en acides organiques comme le malate, le malonate, l'oxalate, le tartrate et l'isocitrate qui peuvent établir des liaisons avec les ions métalliques. Ainsi, il a été montré chez certaines espèces que les acides maliques et malonique chélatent l'essentiel du nickel absorbé. D'autres auteurs ont remarqué que chez les plantes hyperaccumulatrices, le nickel est lié de préférence au citrate. L'acide malique serait également impliqué dans le transport du zinc du compartiment cytoplasmique vers

la vacuole. Après dissociation du complexe Zn-malate, le Zn se lierait à l'oxalate formant ainsi le complexe Zn-oxalate qui représenterait la forme du stockage du métal et le malate serait renvoyé vers le cytoplasme pour un nouveau transport.

Deux classes de peptides sont capables de fixer des métaux lourds. D'une part il y a les métallothionines dont la composition en acide aminés est riche en cystéine. Leur synthèse est induite par le cuivre. De plus, d'autres travaux ont montré que l'expression des gènes codant ces protéines est fortement corrélée avec la résistance à ce métal. D'autre part, il y a les phytochélatines. Ces peptides sont riches en cystéine et présentent une grande affinité pour le cadmium. La découverte des phytochélatines a eu lieu en 1986. Dans ces travaux, les chercheurs ont sélectionné des cellules de tomates tolérantes au cadmium, après des cultures successives sur des milieux contenant des concentrations croissantes en cet élément. Ces cellules synthétisent plus de phytochélatines que les cellules non tolérantes. De même il a été remarqué que l'inhibition de la synthèse des PCs par des procédés chimiques transforme ces cellules tolérantes en cellules sensibles. Le rôle des PCs dans cette tolérance aux métaux lourds a suscité de nombreux débats. Pour certains auteurs, la tolérance est le résultat d'une surproduction de phytochélatines ou d'une synthèse plus importantes de PCs à chaînes peptidiques longues. Pour d'autres, c'est l'incorporation de Soufre (S²⁻) dans le complexe Cd-phytochélatines qui les rend plus stable et capable de fixer une plus grande quantité de cadmium. Ces peptides sont essentiels pour la détoxification du Cd chez *A. thaliana*

La précipitation du Zn sous forme de Zn-phytate et celle du plomb par des carbonates, des sulfates et des phosphates ont été proposées comme un mécanisme de détoxification de ces métaux.

Compartimentation

Depuis 1988, différents travaux ont montré l'importance de la formation du complexe PCs-Cd-S²⁻ dans les mécanismes de la tolérance au Cd. La présence des deux types de complexes, appelés respectivement LMW ou PCs-Cd et HMW ou PCs-Cd-S²⁻ a été observée en premier lieu chez la levure. Depuis le complexe HMW a été retrouvé chez des plantes comme la tomate, le piment et le colza.

Des travaux réalisés sur le tabac ont montré que le complexe Cd-phytochélatines et la totalité du Cd présent dans le proplaste étaient localisés dans la vacuole. Pour ces auteurs, les phytochélatines ne joueraient pas un simple rôle de chélateur dans le milieu cytoplasmique, mais seraient probablement impliquées dans le transport du métal vers la

vacuole. Dans ce cadre, un transporteur utilisant l'ATP a été localisé au niveau du tonoplaste et qui est responsable du transport des PCs et des complexes PCs-Cd à l'intérieur de la vacuole. Dans la vacuole ces composés vont incorporer du Cd^{2+} et S^{2-} pour former le complexe PCS-Cd-S²⁻ de poids moléculaire plus élevé.

Biotransformation

La transformation chimique de certains éléments (Sélénium, Chromium et Arsenic) et leur incorporation dans les voies métaboliques rendent ces éléments très toxiques pour les plantes. La toxicité du sélénium est due à sa transformation en sélélocystéine et sélénométhionine qui remplaceront la cystéine et la méthionine dans la synthèse des protéines. Cependant, certaines espèces d'*Astragalus* sont capables de réduire le sélénium et peuvent ainsi l'accumuler sous forme non toxique dans la partie aérienne. Une enzyme responsable de la méthylation de la sélélocystéine a été isolé et caractérisée chez ces plantes. Ce résultat constitue une première étape dans la connaissance des bases génétiques de la résistance des plantes à cet élément.

Biodisponibilité, absorption et translocation

La résistance des plantes, bien qu'indispensable à la phytoremédiation, n'est pas suffisante pour assurer une forte accumulation des métaux dans la partie aérienne de la plante. La biodisponibilité de ces éléments, leur absorption par les racines et leur translocation sont aussi essentielles pour l'amélioration de cette pratique. La concentration des ions métalliques dans la solution du sol dépend principalement du pH, la teneur en matière organique ou inorganique et du potentiel rédox. Ainsi, il est admis que les pH élevés favorisent les processus d'adsorption et d'association d'éléments métalliques comme Cd, Zn, Pb, Fe, Mn, Cu à la matière organique ou à d'autres constituants de la phase solide du sol. L'addition des chélateurs pour augmenter la biodisponibilité des ions métalliques est essentielle pour la phytoextraction. Par ailleurs, les excréctions racinaires acides peuvent contribuer à l'abaissement du pH et par voie de conséquence à augmenter la biodisponibilité des métaux au niveau de la rhizosphère.

Les plantes ont développé plusieurs stratégies pour augmenter la biodisponibilité des oligoéléments essentiels. Ceci est illustré par les mécanismes mis en œuvre pour acquérir le fer et d'autres éléments minéraux. Ces stratégies comprennent la production de chélateurs de métaux (les phytosidérophores) comme l'acide mugénique ou l'acide avénique qui sont produits par la plante en réponse à une déficience en fer et

probablement aussi en Zinc. Au niveau de la rhizosphère, les phytosidérophores fixent et mobilisent Fe, Cu, Zn et Mn. Le passage à travers la membrane cellulaire se fait sous forme de complexe métal-phytosidérophore grâce à des transporteurs spécialisés.

La présence simultanée d'un transport actif et d'un transport passif du cadmium a été proposée pour les racines de soja, du lupin et du maïs. Des travaux réalisés récemment ont montré que le transport passif pourrait correspondre au déplacement du Cd par la voie apoplasmique et qu'il serait négligeable aux faibles concentrations. L'autre type de transport utilise un transporteur de nature protéique qui existerait au niveau de la membrane plasmique.

Une fois absorbés par les racines, les ions métalliques peuvent s'y accumuler soit être transportés vers la partie aérienne. Le transport ascendant des métaux se fait essentiellement par le xylème. Le taux de Cadmium dans les organes autres que les racines, dépend de la quantité absorbée de cet élément, de la répartition intracellulaire du métal et de sa translocation des racines vers les parties aériennes. Chez certaines plantes, comme la tomate, le piment, le maïs et l'orge le Cd est préférentiellement accumulé dans les racines. Cependant, chez certaines plantes le cadmium peut s'accumuler fortement en dehors des racines, c'est par exemple le cas du Tabac utilisé dans la fabrication des cigarettes où on peut retrouver jusqu'à 80% du Cd accumulé dans les feuilles. Le transport du Cadmium dans la sève du xylème serait dépendant du courant de transpiration. Des données suggèrent que le transport du Cd se ferait sous la forme d'un complexe Cd-citrate. Le citrate serait impliqué également dans la translocation vers la PA du Fer et du Zn^{2+} alors que pour Cu^{2+} ce sont des acides aminés comme l'histidine ou l'asparagine qui joueraient le rôle de chélateur.

L'isolement d'un complexe Ni-citrate chez une plante hyper accumulatrice de ni renforce le rôle des acides organiques dans le transport des métaux.

D'autres chélateurs pourraient également jouer un rôle important dans la mobilité de l'ion métallique à l'intérieur de la plante. C'est le cas de l'acide nicotiamine présents chez toutes les plantes et qui peut transporter les cations divalents comme Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , $Zn^{2+}Fe^{2+}$ et Mn^{2+} .

2.2. Phytostabilisation

Lorsque des problèmes ne permettent pas de recourir à la phytoextraction (la dépollution d'un site par cette méthode demande plusieurs cycles de culture), on a parfois recours à d'autres solutions. Par certains procédés, il est possible d'immobiliser les métaux lourds dans les sols pollués et éviter ainsi la contamination des eaux de ruissellement ou souterraines, qui pourrait avoir lieu suite à l'infiltration des eaux de pluie. Un apport élevé de composés organiques, d'hydroxydes de fer ou de fertilisants phosphatés comme l'acide phosphorique, le phosphate de calcium, stimule la formation de composés qui modifient la forme chimique ainsi que leur biodisponibilité et contribuent ainsi à l'immobilisation des métaux lourds (une forme d'inactivation des contaminants). Cependant, les plantes peuvent également stabiliser la pollution dans un terrain. La phytostabilisation (Figure 4) consiste à installer des végétaux tolérants la présence de polluants toxiques dans le sol. Ils limitent aussi l'érosion et empêchent que les poussières passent dans l'atmosphère. Ils peuvent également sécréter des substances qui stabilisent chimiquement les métaux lourds au niveau de la rhizosphère, évitant en particulier leur migration vers les eaux de ruissellement et souterraines. Les plantes pouvant également accumuler les métaux lourds dans leur système racinaire sont intéressantes pour la phytostabilisation.

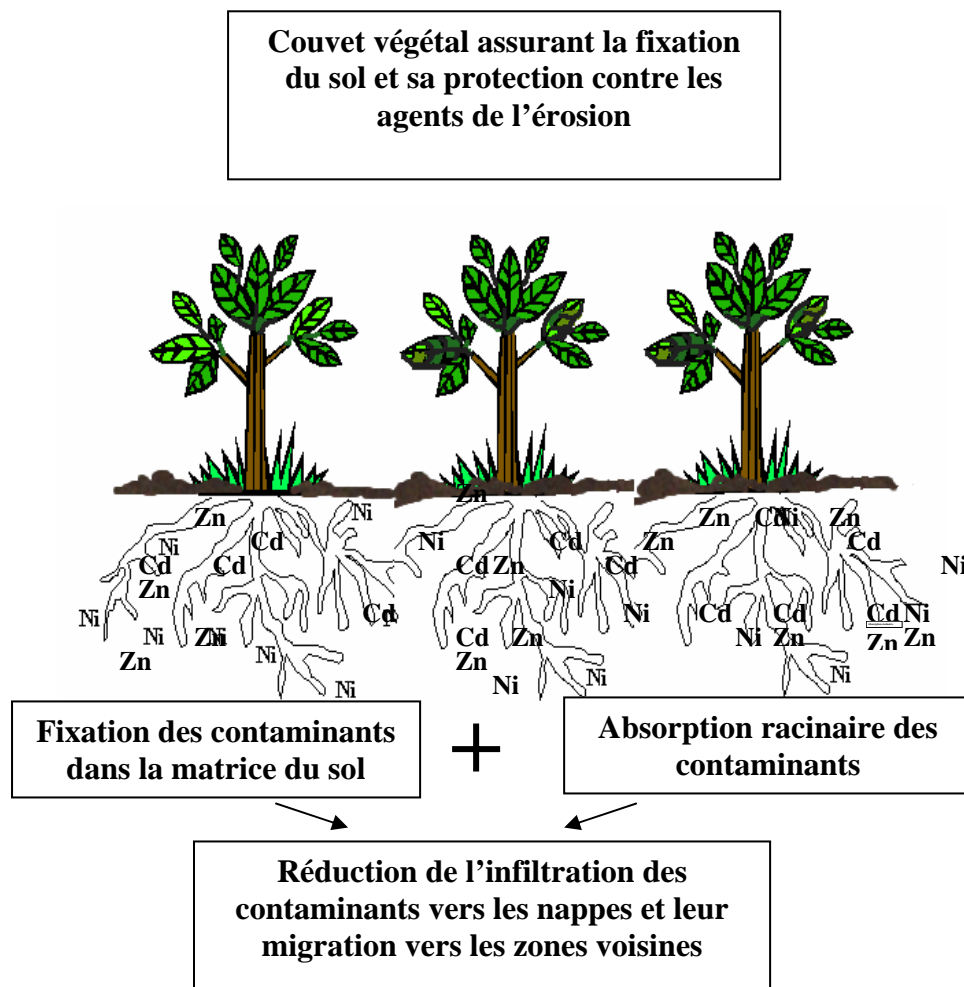


Figure 4 : Processus de la phytostabilisation des contaminants au niveau du sol (Scott, 1995).

2.3 Phytovolatilisation des métaux

Des plantes ont naturellement l'aptitude d'absorber des contaminants. Puis, lors du métabolisme, les contaminants ou leurs dérivés sont associés dans des composés volatils qui sont libérés in fine dans l'atmosphère. Un exemple est le traitement des sites contaminés en Sélénium (Se).

La volatilisation du sélénium (Figure 5) à partir des tissus de la plante constitue un mécanisme de détoxification de cet élément. La transformation du sélénium en composés volatils non toxiques a été signalée dans le monde animal depuis 1984. Il a fallu attendre une décennie pour mettre en évidence pour la première fois un mécanisme similaire chez les végétaux. Ce résultat a été retrouvé plus tard par d'autres auteurs. Le sélénium est volatilisé par les plantes hyperaccumulatrices, comme par exemple *Astragalus racemosus*, sous la forme de diméthyldisélenite alors que chez la luzerne, une plante non accumulatrice de sélénium, cette volatilisation se fait sous forme de diméthylsélénite. Ces deux composés volatils ne sont pas toxiques et ont l'odeur de l'ail. Cependant, on ne connaît toujours pas sous quelle forme le sélénium est absorbé par les plantes, puis transformé en une forme méthylée volatile. Cependant, certains travaux (Zayed et Terry, 1944) ont montré que l'addition de la pénicilline dans la solution nutritive de *Brassica juncea* entraîne une inhibition de 90% de la volatilisation du sélénium lorsque ce dernier est ajouté sous forme de sélénate. Ces données suggèrent que l'association plante-bactérie peut jouer un rôle important dans la réduction et l'assimilation du sélénium. Cependant d'autres travaux sont nécessaires pour clarifier le rôle des bactéries et des plantes dans le processus biochimique de la volatilisation de l'élément.

La volatilisation de l'arsenic sous forme de diméthylarsénite a été également proposée comme étant un mécanisme de résistance chez les algues marines. Les études réalisées chez les plantes montrent que cet élément est essentiellement accumulé dans les racines et qu'une très faible quantité est transportée vers la partie aérienne. Cependant, les plantes peuvent stimuler la biodégradation au niveau de la rhizosphère et contribuer indirectement à l'augmentation de la volatilisation de l'arsenic.

Enfin, des manipulations génétiques ont permis l'augmentation de la phytovolatilisation chez les plantes. Par exemple : Par transgénèse, des gènes d'autres organismes, en particulier de micro-organismes ont été transférés à des végétaux pour leur permettre de rendre volatils des contaminants (exemple : peupliers transformés volatilisant le mercure de sites contaminés).

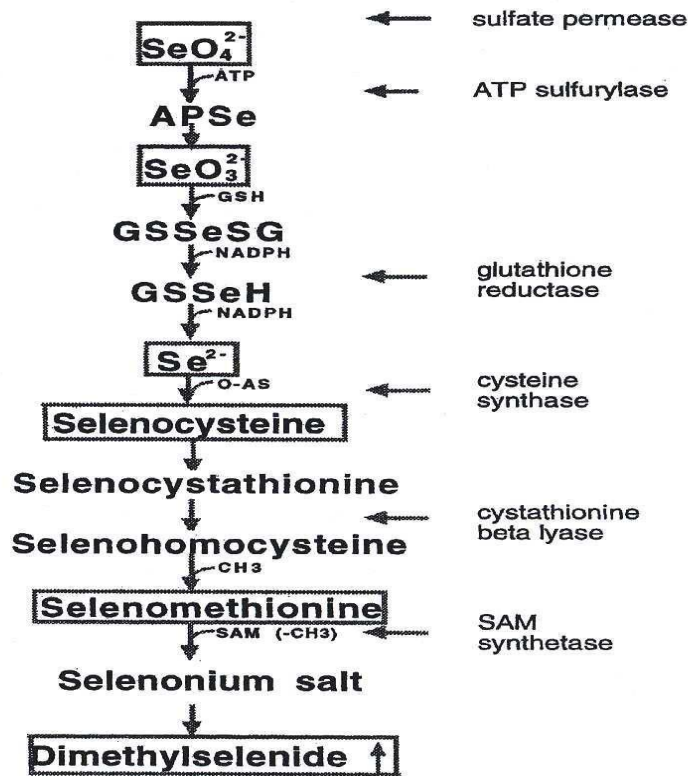


Figure 5: Schéma de volatilisatión du sélénium chez les plantes non accumulatrices (Zayed, A. and N. Terry., 1994).

3. Phytoremédiation des sols pollués par des composés organiques

L'utilisation des plantes dans la remédiation des eaux contaminées par des polluants organiques ou inorganiques existe depuis plus de 100 ans. Ce procédé a été à la base des traitements des eaux usées. Cependant, le nettoyage des sols contaminés par les composés organiques est un concept nouveau. Son développement est basé sur le fait que la biodégradation des polluants organiques est plus rapide pour les sols cultivés que pour les sols nus. Par la suite, des études ont montré que les plantes sont capables d'absorber et de

métaboliser un grand nombre de polluants organiques comme par exemple les explosifs (TNT) les polychlorophénols (PCB) et le trichloéthylène (TCE). En plus de l'absorption et du métabolisme des composés organiques, les plantes sécrètent des exsudats racinaires qui stimulent la bioremédiation microbienne au niveau de la rhizosphère, appelé phytormédiation ex planta.

3.1 ; Absorption et métabolisme des polluants organiques

3.1.1. Biodisponibilité des polluants organiques

Par analogie avec la phytoextraction des métaux lourds, la dépollution des polluants organiques dépend principalement de leur disponibilité et des mécanismes impliqués dans leur absorption. Les polluants organiques du sol peuvent se trouver à l'état liquide, gazeux ou solide. Exceptionnellement pour quelques hydrocarbures pnyaromatiques qui se trouvent sous forme de gaz, l'absorption des composés organiques comme par exemple les pesticides et les herbicides, se fait à partir de la phase liquide (solution du sol). Elle est influencée par les caractéristiques du sol (pH, matière organique, teneur en eau, texture) et de la physiologie de la plante. Contrairement aux métaux lourds, très peu de résultats concernant la dépollution par les plantes des composés organiques sont actuellement disponibles. D'après certains travaux, la phytoremédiation est étroitement liée à la transpiration qui, à son tour, dépend du cycle de la plante, de la surface foliaire, de la nutrition minérale, des conditions du sol et de l'humidité relative de l'air. Comme pour la phytoextraction des métaux lourds, la disponibilité des composés organiques représente une première restriction dans la phytoremédiation. De la même façon que des ligands sont ajoutés au sol dans le cas de la phytoextraction assistée des métaux lourds, des détergents synthétiques (Triton X100, SDS) ou des biosurfactants sont utilisés pour augmenter la dispersion des polluants organiques ainsi que leur dégradation par les microorganismes. A notre connaissance il n'existe pas de travaux se rapportant à l'addition de surfactants pour stimuler l'absorption des composés organiques par les plantes. Leur application pourrait stimuler la disponibilité et l'absorption des polluants. Une autre voie envisageable serait la production de biosurfactants par des plantes ou des microorganismes génétiquement modifiés. L'avantage des biosurfactants est qu'ils sont dégradés plus facilement que leurs homologues synthétiques.

3.1.2. Biotransformation et compartimentation

Les composés organiques généralement lipophiles sont facilement absorbés par la plante, qui peut les intégrer dans de nouvelles structures cellulaires via la lignification, les volatiliser, les compartimer dans la vacuole ou les métaboliser. Les composés xénobiotiques, qui présentent un site électrophile, peuvent engendrer des effets toxiques suite à une liaison avec des sites nucléophiles.

La biotransformation implique une ou plusieurs réactions enzymatiques qui catalysent la conversion de la molécule étrangère en donnant des formes dérivées chimiquement distinctes les unes des autres. L'intensité de la transformation chimique et le nombre de métabolites formés dépend des espèces végétales et constitue la base de la tolérance aux polluants, de même que la sélection des herbicides dans les pratiques agricoles. Les produits de transformation sont généralement moins toxiques et plus hydrophiles que les composés d'origine.

Les réactions de transformation chimiques sont de deux types. Il y a les réactions de la phase I qui sont généralement des réactions d'hydrolyse ou d'oxydation et conduisent à la forme active du polluant organique et les réactions de la phase II qui sont des réactions de conjugaison.

Dans la phase I, les réactions d'hydrolyse catalysées par des estérases et des amidases sont minoritaires par rapport aux réactions d'oxydation catalysées par le système cytochrome P-450 localisé au niveau du réticulum endoplasmique. L'existence de plusieurs isoformes (plus de 60 gènes ont été identifiés chez *Arabidopsis*) permet au système d'utiliser différents substrats et de catalyser un grand nombre de réactions. Certains, présentant le groupement fonctionnel impliqué dans les réactions de la phase II ne nécessitent pas d'activation préliminaire

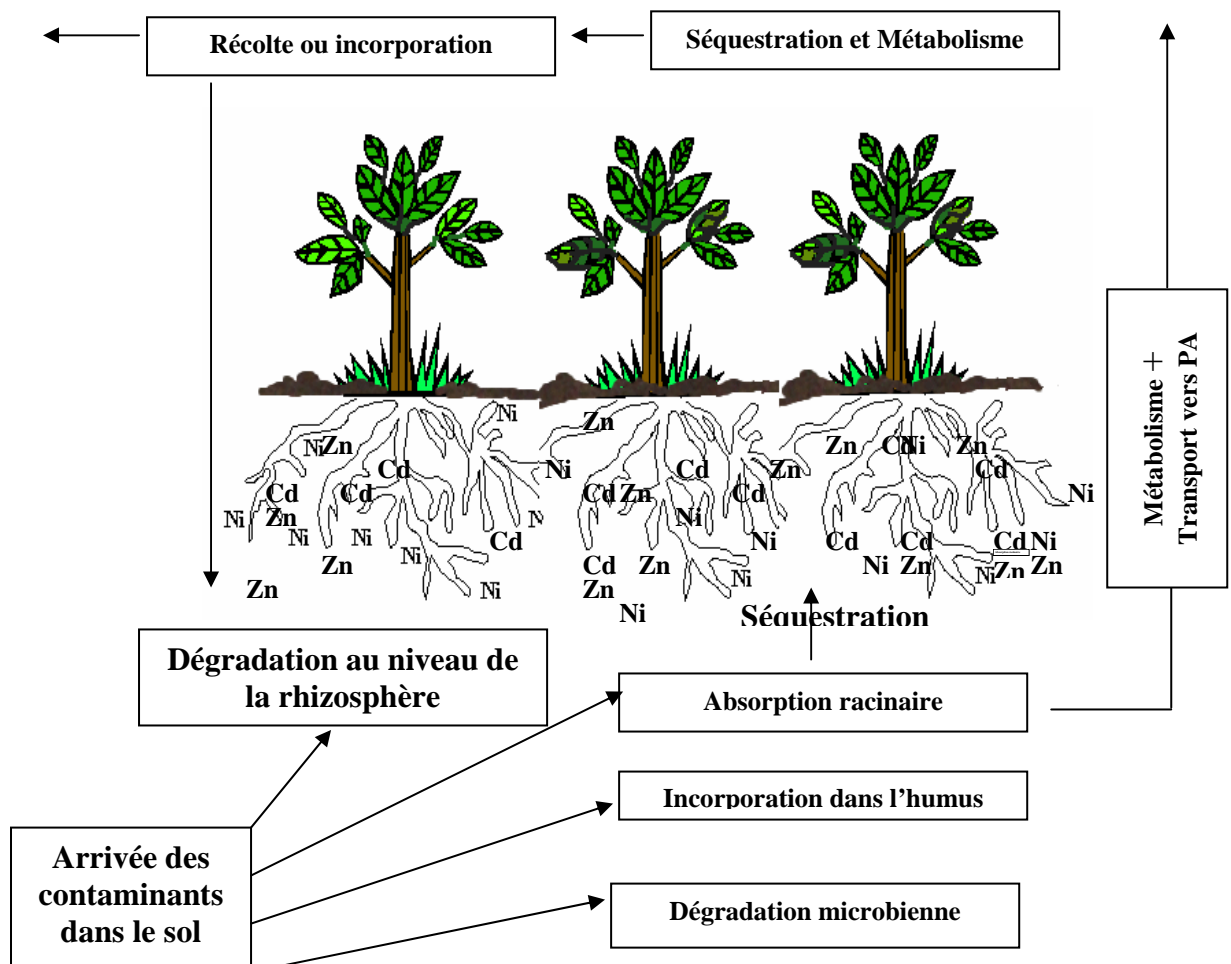
Dans la phase II, les composés xénobiotiques ou les produits activés de la phase I sont inactivés par des liaisons covalentes avec des molécules endogènes comme le glucose, le malonate, le glutathion, en formant des produits conjugués solubles en milieu aqueux. Contrairement à la phase I qui peut donner naissance à des métabolites toxiques, les produits de la phase II ne sont pas toxiques. De ce fait, les enzymes qui catalysent les réactions de la phase II jouent un rôle important dans le mécanisme de détoxication.

La compartimentation cellulaire (Phase III) des formes conjuguées, produites par la phase II est assurée par des transporteurs membranaires ATP dépendants. Après leur transfert dans la vacuole, les composés conjugués du glutathion sont soumis à d'autres réactions métaboliques. Les carboxypeptidases peuvent catalyser la dégradation du glutathion et

libérer la glycine. Cette première étape est suivie par l'action de la dipeptidase qui catalyse la libération de l'acide glutamique. Il en résulte la formation d'un produit conjugué X-cystéine. La voie métabolique de ce composé est encore incertaine ; cependant certains travaux suggèrent qu'après l'efflux des composés liés à la cystéine, d'autres réactions entrent en jeu pour les exporter au niveau de l'apoplasme où ils peuvent se lier à la lignine.

3.2. Phytodégradation ex-planta

Les champignons et les bactéries qui vivent au niveau de la rhizosphère utilisent les exsudats libérés par les racines pour leur croissance et leur activité métabolique, ce qui explique pourquoi leur nombre est deux à quatre fois plus important dans cette région du sol. Comme les microorganismes peuvent également dégrader les polluants, il n'est pas étonnant de constater une accélération de la bioremédiation dans les sols recouverts d'une végétation par rapports aux sols dénudés. Certains composés phénoliques sécrétés par les racines sont utilisés en tant que co-métabolites par les bactéries dégradant des composés polychlorobenzoniques. En plus de la sécrétion des composés organiques, les plantes peuvent également libérer dans le sol des enzymes capables de dégrader les polluants organiques les plus récalcitrants. A titre d'exemple, on peut citer la dégradation des explosifs (le trinitrotoluène, le dinitromonoaminotoluène et mononitrodiaminotoluène) qui est catalysée par la nitroréductase.



CONCLUSION

Parallèlement à la biodégradation, qui est un procédé biologique qui fait appel aux microorganismes pour éliminer les polluants organiques, l'utilisation des plantes pour l'accumulation des produits toxiques est une approche qui prend de l'importance. En effet, une flore spontanée et tolérante s'installe toujours sur des sites miniers, des friches industrielles et des terrains contaminés par des hydrocarbures que par des métaux lourds. Pour ces derniers, il existe de nombreux bioindicateurs utilisés en prospection minière, comme les plantes hyperaccumulatrices. Ces plantes peuvent absorber des quantités élevées de contaminants par leurs racines.

C'est à partir de ce constat que depuis quelques années, se sont développées des méthodes de dépollution utilisant les potentialités particulières vis-à-vis des polluants. Les plantes peuvent agir sur les composés minéraux ou organiques de plusieurs façons, et ces modes vont être à l'origine de l'usage que l'on peut faire des plantes en fonction des objectifs à atteindre et de la nature de polluant.

On distingue ainsi la phytoextraction (la plante extrait le polluant du sol et le concentre dans ses tissus), la phytostabilisation (le chevelu racinaire de la plante bloque les polluants dans le sol et empêche leur migration vers la nappe phréatique), et la phytodégradation (les plantes et leur rhizosphère dégradent les molécules organiques présentes dans le sol en composés plus simples).

Les performances de la phytoremédiation ou plus particulièrement la phytoextraction dépendent des limites des plantes utilisées et plusieurs obstacles s'opposent encore à son développement : (1) faible production de biomasse et croissance lente, (2) concentration des métaux dans les racines au lieu de la partie aérienne, (3) transfert des contaminants dans la chaîne alimentaire par les animaux et les insectes, et (4) temps requis pour l'absorption des contaminants d'un site et qui demande plusieurs cycles de culture. Il faudrait donc combiner les avantages respectifs des différentes plantes capable de bioremédiation. Les techniques de sélection classique et la biotechnologie sont donc des outils indispensables pour améliorer des caractères comme la concentration des métaux dans les tissus aériens, la production de biomasse, la morphologie de la plante, le développement du système racinaire et l'adaptation au climat.