

**DETERMINANTS BIOGEOCHIMIQUES DES EFFETS ECOTOXICOLOGIQUES
LIES A LA CONTAMINATION SUR LE LONG-TERME DES SOLS AGRICOLES PAR LES ELEMENTS TRACES
– APPLICATION AU RECYCLAGE DE PRODUITS RESIDUAIRES ORGANIQUES A LA REUNION –**

CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE

Si les éléments traces sont naturellement présents de façon ubiquiste dans l'environnement et dans les sols, de nombreuses activités anthropiques sont susceptibles de générer une contamination importante. Le recyclage de produits résiduels organiques (PRO) représente la principale source de contamination des sols agricoles pour la plupart des éléments traces (Tella et al. 2013). **Une contamination lente mais continue des sols agricoles par les éléments traces est donc classiquement observée sur le long-terme (> 10 ans) aussi bien dans les contextes du Nord que du Sud** (Oustrière et al. 2013). Parallèlement aux nombreux intérêts agronomiques (e.g. effets fertilisant et amendant) et environnementaux (e.g. stockage de carbone) du recyclage agricole de PRO, **il est donc nécessaire d'évaluer les éventuelles conséquences écotoxicologiques de cette pratique sur les organismes du sol qui déterminent en partie et exploitent la fertilité du sol.**

La démarche classique d'évaluation écotoxicologique consiste à mono-contaminer (i.e. avec un seul élément trace) artificiellement au laboratoire des sols initialement non contaminé avec des doses croissantes d'un sel soluble de l'élément trace étudié. Un effet toxique est alors mesuré à l'aide d'un ou de plusieurs organismes-cibles (e.g. élongation racinaire, reproduction de vers de terre, nitrification potentielle liée aux activités des microorganismes) pour construire une courbe dose-réponse dont la modélisation doit permettre de prédire les effets toxiques. **Cette démarche classique d'évaluation écotoxicologique pose cependant plusieurs problèmes méthodologiques lorsqu'elle est appliquée à la prédiction des effets toxiques dans les sols agricoles modérément contaminés en éléments traces par le recyclage à long-terme de PRO.**

Premièrement, les cas de mono-contamination des sols par un seul élément trace sont très rares ce qui se traduit par des difficultés à distinguer la contribution respective de plusieurs éléments traces à l'effet toxique observé dans les cas très courant de pluri-contamination (Hutte et al. 2013). Deuxièmement, la contamination fraîche de sols au laboratoire à l'aide de sels solubles d'élément trace surestime la disponibilité de l'élément trace dans le sol et donc l'effet toxique mesuré par rapport à un sol historiquement contaminé par le recyclage de PRO au champ. Troisièmement, l'apport de PRO au sol modifie profondément les propriétés du sol (« effet sol ») telles que le pH ou la teneur en matière organique et sa réactivité de telle manière que l'effet toxique mesuré est très souvent biaisé par de nombreux facteurs confondant. Quatrièmement, les organismes-cibles sont capables d'interagir avec le sol avec lequel ils sont en contact en modifiant notamment les propriétés physico-chimiques du sol et en conséquence la disponibilité des éléments traces (Bravin et al. 2012). Cet « effet organisme » n'est pas du tout pris en compte actuellement, en particulier quand il concerne l'action simultanée de plusieurs organismes. **Pour lever ces verrous méthodologiques, des tests biologiques innovants (biotests) de laboratoire doivent être spécifiquement développés pour des sols historiquement contaminés.**

RESUME DU TRAVAIL PROPOSE

Objectifs

Le premier objectif de la thèse sera d'évaluer la capacité de biotests récemment développés à discriminer les effets toxiques liés à la présence d'éléments traces issus de la contamination historique de sols agricoles par l'apport de PRO sur le long-terme. Le deuxième objectif de la thèse sera de caractériser les déterminants biogéochimiques (effets sol et organisme) des réponses écotoxicologiques mesurées.

Originalités méthodologiques

La problématique de la thèse sera appliquée au contexte agronomique de l'île de La Réunion. La Réunion est un laboratoire à ciel ouvert pour les recherches de l'unité Recyclage et risque depuis une quinzaine d'années. La Réunion présente une diversité climatique (pluviométrie de 0,5 à 10 m/an et température moyenne annuelle de 10 à 28 °C), pédologique et agricole (canne-à-sucre, prairies, et horticulture) unique pour un territoire agricole de moins de 50 000 ha. La Réunion présente également des contraintes géographique (fortes pentes), socio-économique (pression foncière, prix des intrants), et réglementaire (législations française et européenne) qui exacerbe la nécessité d'une gestion durable des PRO. A ce titre, **La Réunion est un territoire particulièrement pertinent pour la mise en œuvre en milieu tropical de recherches génériques sur le recyclage des PRO dans les agro-écosystèmes.**

Les échantillons de sol proviendront de quatre essais de terrain mis en place et suivis par le Cirad depuis 2 à 11 ans et qui sont représentatifs de la diversité agricole, pédologique et climatique présente à La Réunion. Ces essais sont inclus dans le SOERE (Systèmes d'observation et d'expérimentation au long terme pour la recherche en environnement) ou le Réseau (réseau national d'essais au champ) dédié à l'étude des intérêts agronomiques et des impacts environnementaux de l'épandage des PRO sur les sols agricoles. Ces quatre essais donneront accès à plus de 320 échantillons de sol conservés en pédothèque depuis le démarrage des essais. Les travaux préliminaires menés sur ces

quatre essais ont montré que l'apport de PRO a progressivement contaminé les sols en cuivre (Cu) et zinc (Zn) et a également augmenté le pH et /ou la teneur en matière organique des sols (Oustrière et al. 2013).

Trois niveaux d'organismes du sol seront ciblés, comprenant une plante supérieure, un invertébré (ver de terre) et les micro-organismes. Les biotests qui seront mis en œuvre sont actuellement utilisés et développés par les deux équipes (Cirad, UR Recyclage et risque, pour la plante ; Inra, UMR Ecosys pour le ver de terre et les micro-organismes) qui participeront à l'encadrement de la thèse. Pour les micro-organismes, la réponse écotoxicologique sera estimée à partir de la mesure de l'adaptation des micro-organismes à la présence d'éléments traces, telle que la quantification moléculaire des gènes de résistances et l'acquisition de résistances fonctionnelles chez les communautés à partir d'une approche PICT (Pollution Inducing Community Tolerance) (Merlin et al. 2014). Pour le ver de terre, la réponse écotoxicologique sera estimée à partir de la mesure de la bioaccumulation globale ou par fractionnement subcellulaire ainsi que par la mesure de biomarqueurs de stress tels que le niveau de réserve énergétique (glycogène et protéique) et l'expression de gènes à l'origine de la production de métallothionéines (Beaumelle et al. 2015 ; Pelosi et al. 2015). Pour la plante supérieure, la réponse écotoxicologique sera estimée à l'aide de la technique RHIZOtest par la mesure du flux de prélèvement net de chaque élément trace dans la plante entière (parties racinaires et aériennes) (Bravin et al. 2010 ; NF EN ISO 16198).

La thèse se focalisera sur deux éléments traces, Cu et Zn, particulièrement préoccupants du point de vue du risque écotoxicologique lié à l'apport à long-terme de PRO sur les sols agricoles. Les apports annuels moyens de Cu et Zn sur les sols agricoles français liés à l'épandage de PRO sont en effet 5 et 25 fois supérieurs aux apports de tous les autres éléments traces. Par ailleurs, Cu et Zn présentent des caractéristiques chimiques et écotoxicologiques très différentes. Le cuivre présente une affinité pour les phases réactives du sol (comme les matières organiques notamment) beaucoup plus importante que Zn, ce qui se traduit par une disponibilité (composante « exposition » du risque) de Cu généralement plus faible que celle de Zn. A l'inverse, la très forte affinité de Cu pour les surfaces biologiques se traduit par une toxicité beaucoup plus forte (composante « danger » du risque) de Cu pour les organismes du sol que Zn. L'étude de ces deux éléments traces est donc particulièrement pertinente dans l'optique d'une évaluation du risque écotoxicologique. Au-delà de Cu et Zn, d'autres métaux traces divalents (i.e. cadmium, nickel, et plomb) seront suivis de manière à tenir compte des éventuels effets de mélange dans le déterminisme des effets écotoxicologiques de Cu et Zn.

Programmation des activités

Tâche 1 : Mesurer la disponibilité des éléments traces dans les sols et la réponse écotoxicologique des trois organismes-cibles dans une large gamme d'échantillons de sol. Il s'agira premièrement de déterminer la disponibilité des éléments traces sur une centaine d'échantillons de sol à l'aide de deux techniques rapides : (i) par la mesure et la modélisation de la spéciation des éléments traces dans la solution du sol (Djae et al. soumis) et (ii) par la mesure du réapprovisionnement des éléments traces en solution par la phase solide du sol (Tella et al. 2016). Ce travail permettra la sélection de 30 échantillons de sol présentant des niveaux de disponibilité en Cu et Zn très contrastés. Il s'agira deuxièmement de mesurer la réponse écotoxicologique des trois organismes-cibles exposés à chacun des 30 échantillons de sol sélectionnés. Une analyse multivariée du jeu de données obtenues sera mise en œuvre pour mettre en évidence (i) les rôles joués respectivement par Cu et Zn dans les réponses écotoxicologiques mesurées et (ii) les principaux déterminants biogéochimiques de ces réponses. Cette approche statistique apportera ainsi des éléments préliminaires pour les étapes 2 et 3 qui s'intéresseront à la caractérisation fine de l'impact des propriétés physico-chimiques du sol et des interactions sol-organismes dans le déterminisme des réponses écotoxicologiques.

Tâche 2 : Caractériser le rôle des propriétés du sol dans le déterminisme des réponses écotoxicologiques – effet sol. Il s'agira d'évaluer la part des réponses écotoxicologiques qui est déterminée par les propriétés physico-chimiques du sol et leur évolution suite à l'apport à long-terme de PRO. Le pH est une des propriétés physico-chimiques du sol qui évolue le plus fortement suite à l'apport à long-terme de PRO et qui est le plus souvent évoqué dans le déterminisme des réponses écotoxicologiques. Le pH du sol est également un paramètre facilement manipulable au laboratoire. De ce fait, deux à trois échantillons de sol présentant des réponses écotoxicologiques (d'après l'étape 1) et des pH contrastés pour chacun des quatre sites seront sélectionnés pour cette étape. Pour chaque site, le pH des échantillons de sol sera ramené à la même valeur. Les réponses écotoxicologiques de chaque organisme-cible seront mesurées sur chacun des échantillons avant et après correction du pH.

Tâche 3 : Caractériser le rôle des interactions sol-organismes bi/tripartites dans le déterminisme des réponses écotoxicologiques – effet organisme. Il s'agira d'évaluer dans quelle mesure les interactions bipartites microorganismes-plante et ver-plante ainsi que l'interaction tripartite microorganismes-ver-plante modifient l'exposition de la plante aux éléments traces dans la rhizosphère et la réponse écotoxicologique de la plante (flux de prélèvement) aux éléments traces. Pour cela, la plante-cible sera cultivée en RHIZOtest sur un sol stérilisé (par rayonnement gamma) ou non (interactions microorganismes-plante), sur du sol stérilisé ou non provenant de turricules

de vers de terre (interactions ver-plante et microorganismes-ver-plante). Des dispositifs RHIZOtest sans plante permettront d'évaluer le rôle joué par la plante. Cette expérimentation sera réalisée sur un ou deux échantillons de sol sélectionné(s) à partir des résultats de l'étape 1. La disponibilité des éléments traces (cf. étape 1) sera mesurée dans la rhizosphère et le sol non rhizosphérique de chacune des modalités étudiées.

ECOLE DOCTORALE

Le(a) doctorant(e) sera inscrit(e) dans l'école doctorale Agriculture, Biologie, Environnement, Santé (ED 435, ABIES).

EQUIPE D'ENCADREMENT DE LA THESE

Encadrant principal : Matthieu Bravin (Cirad, UPR Recyclage et risque, la Réunion)

Directrice de thèse HDR : Isabelle Lamy (Inra, UMR Ecosys, Versailles)

Co-encadrant : Olivier Crouzet (Inra, UMR Ecosys, Versailles)

Co-encadrant : Céline Pelosi (Inra, UMR Ecosys, Versailles)

COMPOSITION PREVISIONNELLE DU COMITE DE THESE (en plus de l'équipe d'encadrement)

Marc Benedetti (HDR, Univ. Paris Diderot, IGP) : Spéciation des éléments traces dans les solutions de sol

Emmanuel Doelsch (HDR, Cirad, Unité Recyclage et risque) : Spéciation solide (sol et plante) des éléments traces

Cédric Garnier (HDR, Université de Toulon, Lab. Protee) : Réactivité des matières organiques

Erik Smolders (KU Leuven, Belgique) : Spéciation chimique et écotoxicité terrestre des éléments traces

MODALITES D'ACCUEIL DU DOCTORANT

Durant les trois ans de la thèse, le(a) doctorant(e) sera accueilli(e) **au sein de l'unité Recyclage et risque** sur son site de **La Réunion** où est localisé Matthieu Bravin (encadrant principal). Des missions annuelles de 2-3 mois se feront également en métropole au sein de la plateforme analytique de l'unité Recyclage et risque à **Montpellier** ainsi qu'au sein de l'UMR Ecosys à **Versailles** selon les besoins expérimentaux.

FINANCEMENT DE L'ALLOCATION DE RECHERCHE ET DU FONCTIONNEMENT DE LA THESE

Le financement de l'allocation de recherche est acquis et proviendra à 80% du programme opérationnel de recherche du Cirad à La Réunion (Dispositif de recherche en partenariat « Services et impacts des activités agricoles en milieu tropical » – DPP Siaam) et à 20 % du département scientifique « Performances des systèmes de production et de transformation tropicaux » (Persyst) du Cirad.

Les frais de fonctionnement seront couverts par le projet 1 « Recyclage des nutriments et maîtrise des contaminants » du DPP Siaam ainsi que par deux projets ANR (Terrametae) et UE Biodiversa (BioTools) récemment soumis.

LISTE DE QUELQUES PUBLICATIONS DE L'EQUIPE PROPOSANT LE SUJET (nom des encadrants soulignés)

Beaumelle L, Gimbert F, Hedde M, Guérin A, Lamy I (2015) Subcellular partitioning of metals in *Aporrectodea caliginosa* along a gradient of metal exposure in 31 field-contaminated soils. *Sci. Tot. Environ.*, 520, 136-145.

Bravin MN, Michaud AM, Larabi B, Hinsinger P (2010) RHIZOtest: A plant-based biotest to account for rhizosphere processes when assessing copper bioavailability. *Environ. Pollut.*, 158, 3330-3337.

Bravin MN, Garnier C, Lenoble V, Gérard F, Dudal Y, Hinsinger H (2012) Root-induced changes in pH and dissolved organic matter binding capacity affect copper dynamic speciation in the rhizosphere. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 84, 256-268.

Djae T, Bravin MN, Garnier C, Doelsch E Parameterizing reactive dissolved organic matter with a single default value skews the prediction of copper solution speciation and ecotoxicity in soil. *soumis à Environ. Toxicol. Chem.*

Guigues S, Bravin MN, Garnier C, Masion A, Doelsch E (2014) Isolated cell walls exhibit cation binding properties distinct from those of plant roots. *Plant Soil*, 381, 367-379.

Hutte M, Rabetokotany-Rarivoson N, Moussard G, Thuriès L, Djae T, Bravin MN (2013) Putative role of trace elements and soil chemical properties in the induction or mitigation of rhizotoxicity in tropical soils amended with organic wastes. 15^{ème} conférence internationale Ramiran, 3-5 Juin, Versailles, France.

Merlin C, Devers M, Crouzet O, Heraud C, Steinberg C, Mougouin C, Martin-Laurent F (2014) Characterization of chlordecone-tolerant fungal populations isolated from long-term polluted tropical volcanic soil in the French West Indies. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 21, 4914-4927.

NF EN ISO 16198:2015 Soil Quality - Plant-based test to assess the environmental bioavailability of trace elements to plants. Bravin MN (coord.).

Oustrière N, Lahbib-Burchard T, Doelsch E, Feder F, Wassenaar T, Bravin MN (2013) Predictive modelling of the long-term accumulation of trace metals in tropical soils amended with organic wastes – field trial validation. 15^{ème} conférence internationale Ramiran, 3-5 Juin, Versailles, France.

Pelosi C, Lebrun M, Beaumelle L, Cheviron N, Delarue G, Néliu S (2015) Sublethal effects of epoxiconazole on the earthworm *Aporrectodea icterica*. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 23, 3053-3061.

Tella M, Doelsch E, Letourmy P, Cuoq F, Bravin MN, Saint Macary H (2013) Investigation of potentially toxic heavy metals in different organic wastes used to fertilize market garden crops. *Waste Manage.*, 33, 184-192.

Tella M, Bravin MN, Thuriès L, Cazevielle P, Chevassus-Rosset C, Collin B, Chaurand P, Legros S, Doelsch E Increased zinc and copper availability in organic waste amended soil: evidence of distinct release mechanisms. *Environ. Pollut.*, 212, 299-306.