



HAL
open science

Renaturation des berges de cours d'eau et phytorémédiation

Philippe Druard, Claude Husson, - Paul Roger

► **To cite this version:**

Philippe Druard, Claude Husson, - Paul Roger. Renaturation des berges de cours d'eau et phytorémédiation : Utilisation d'écotypes ligneux de ripisylves pour l'ingénierie végétale. Les Presses Agronomiques de Gembloux, 156 p., 2013, 978-2-87016-126-5. hal-02808714

HAL Id: hal-02808714

<https://hal.inrae.fr/hal-02808714>

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

RENATURATION DES BERGES DE COURS D'EAU ET PHYTOREMÉDIATION

UTILISATION D'ÉCOTYPES LIGNEUX DE RIPISYLVES
POUR L'INGÉNIERIE VÉGÉTALE

Dans la même collection

- Berti F. et al., 2006. *Le coton dans tous ses états*. 118 p., 20 fig., 15 tab.
- Bock L. et al., 2011. *3^{ème} Journée d'étude du Projet de Cartographie Numérique des Sols de Wallonie. L'information pédologique... comment mieux la valoriser : vers un système d'information sur les sols ?* 116 p., 59 fig., 21 tab.
- Boudru M., 1989. *Forêt et sylviculture. Traitement des forêts*. 356 p., 62 fig., 35 tab., 25 photos.
- Boudru M., 1992. *Forêt et sylviculture. Boisements et reboisements artificiels*. 348 p., 6 fig., 36 tab., 5 photos.
- Bousson E., 2003. *Gestion forestière intégrée. Approche structurée basée sur l'analyse multicritère*. 303 p., 79 fig., 52 tab., 7 photos.
- Colson V., Granet A.M., Vanwijnsberghe S., 2012. *Loisirs en forêt et gestion durable*. 304 p., 286 ill., 7 tab.
- Dagnelie P., 1975. *Analyse statistique à plusieurs variables*. 362 p., 20 fig., 28 tab.
- Dagnelie P. et al., 1988. *Tables de production relatives à l'épicéa commun*. 124 p., 44 tab.
- Dagnelie P., 2012. (2^e éd.). *Principes d'expérimentation. Planification des expériences et analyse de leurs résultats*. 413 p., 71 fig., 86 tab.
- Dagnelie P. et al., 2013. *Cubage des arbres et des peuplements forestiers : tables et équations*. 176 p., 100 tab.
- Delacharlerie S. et al., 2008. *HACCP organoleptique. Guide pratique*. 176 p., photos en couleur.
- Delvigne F. et al., 2010. *2^{ème} journée de réflexion de l'EDT GEPROC : génie des procédés appliqué aux bio-industries*. 94 p., 51 fig., 29 tab.
- Delvingt W., 2001. *La forêt des hommes. Terroirs villageois en forêt tropicale africaine*. 288 p., 39 fig., 51 tab., 22 photos en couleur.
- Delvingt W., Vermeulen C., 2007. *Nazinga*. 312 p., 38 fig., 54 tab., 282 photos en couleur.
- Demol J., 2002. *Amélioration des plantes. Application aux principales espèces cultivées en régions tropicales*. 584 p., 77 fig., 20 tab., 72 photos en couleur.
- Didderen I. et al., 2009. *Le bioéthanol de seconde génération. La production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique*. 128 p., 65 fig., 24 tab.
- Doucet J.L. et al., 2012. *Regards croisés sur la foresterie communautaire. L'expérience camerounaise*. 216 p., 141 photos couleur.
- Feltz C., Toussaint A. (coord.), 2006. *Conversations paysagères 2004*. 77 p., 24 photos, 2 tab.
- Laitat E., Marcoen J.-M. (coord.), 2004. *Terre wallonne – Humains admis*. 92 p., 22 fig., 24 tab.
- Ledent A., Burny P., 2002. *La politique agricole commune des origines au 3^e millénaire*. 600 p., 4 fig., 41 tab.
- Mahy G. et al. (coord.), 2005. *Les pelouses calcicoles : du paysage aux gènes*. 80 p., 23 fig., 7 tab., 10 photos.
- Malaisse F., 2010. *How to Live and Survive in Zambezi open Forest (MIOMBO Ecoregion)*. 424 p., 76 fig., 85 tab., 41 photos + 1 CD-ROM (387 photos en couleur).
- Nanson A., 2004. *Génétique et amélioration des arbres forestiers*. 712 p., 103 ill., 25 tab.
- Neuray G., 1982 (Réimpression 2004). *Des paysages. Pour qui ? Pourquoi ? Comment ?* 590 p., 300 ill.
- Rondeux J., Thibaut A., 1996. *Tables de production relatives au douglas*. 152 p., 5 fig., 61 tab.
- Rondeux J., 1997. *La forêt et les hommes. Arrêt sur images 1900-1930*. 94 p., 82 photos.
- Rondeux J., 1999. *La mesure des arbres et des peuplements forestiers*. 544 p., 70 fig., 67 tab., 20 photos.
- Sindic M. et al., 2010. *Valorisation de l'amidon de blé. Incidences des modalités de culture sur les propriétés techno-fonctionnelles*. 72 p., 29 fig., 6 tab.
- Vandenbergh Ch., Marcoen J.M. (Éds), 2010. *Atelier Nitrate-Eau. Évaluation du programme de Gestion Durable de l'Azote*. 125 p., 55 fig., 67 tab.
- Vandenbergh Ch. et al. (Éds), 2013. *2^e Atelier Nitrate-Eau. Évaluation du Programme de Gestion Durable de l'Azote*. 154 p., 59 fig., 54 tab.
- Vermeulen Ph. et al. (coord.), 2009. *Feed Safety International Conference 2007*. 70 p., 11 tab., 20 fig.
- Vermeulen Ph. et al., 2011. *3rd International Feed Safety Conference Methods and Challenges*. 72 p., 23 tab., 20 fig. dont 2 en couleur.

Druart Philippe, Husson Claude, Paul Roger

RENATURATION DES BERGES DE COURS D'EAU ET PHYTOREMÉDIATION

**UTILISATION D'ÉCOTYPES LIGNEUX
DE RIPISYLVES POUR
L'INGÉNIERIE VÉGÉTALE**

LES PRESSES AGRONOMIQUES DE GEMBOUX

© 2013, LES PRESSES AGRONOMIQUES DE GEMBOUX, A.S.B.L.
Passage des Déportés 2 — B-5030 Gembloux (Belgique)
Tél. : +32 (0) 81 62 22 42 – Fax : +32 (0) 81 62 25 52
E-mail : pressesagro@ulg.ac.be URL : <http://www.pressesagro.be>
D/2013/1665/126
ISBN 978-2-87016-126-5

Aux termes de la loi belge du 30 juin 1994 relative au droit d'auteur, l'auteur a
seul le droit de reproduire ce livre ou d'en autoriser la reproduction de quelque
manière et sous quelque forme que ce soit.
Ce droit comporte le droit d'en autoriser la traduction.

Publié avec l'aide du Service publique de la Wallonie
(Aides à la promotion de l'emploi)

Préface

Financement

L'essentiel des travaux relatés dans cet ouvrage a été mené dans le cadre du projet Interreg IV-A « Grande Région » ECOLIRIMED « Développement d'une filière d'écotypes ligneux pour la fixation durable et la phytoremédiation des berges de cours d'eau » avec :

- Le financement du FEDER (Fonds Européen de Développement régional) – Convention n° 024-WLL-2-1.017 ;
- Les cofinancements de la Direction Général Opérationnelle Agriculture, Ressources naturelles et Environnement du Service Public de Wallonie et de la Région Lorraine ;
- Les investissements sur fonds propres
 - du Centre wallon de Recherches agronomiques (Belgique, Wallonie),
 - de l'Institut National de la Recherche Agronomique et d'Arexhor Grand Est (France, Lorraine),
 - du Centre de Recherche Public – Gabriel Lipmann (Grand-Duché de Luxembourg).





CRA-W

Le **Centre wallon de Recherches agronomiques** effectue des recherches agronomiques au sens large suivant une démarche proactive vers une agriculture écologiquement intensive. Le programme couvre autant l'amont (les écosystèmes, les ressources biologiques, les intrants) que l'aval de la production agricole (alimentation et santé) en passant par la transformation des produits et leur valorisation qu'elle soit alimentaire ou non alimentaire.

Les projets sont mis en œuvre au sein d'Unités de recherches qui se distinguent par des thématiques spécifiques. Trois Unités interviennent conjointement dans le projet ECOLIRIMED pour traiter une problématique transversale.

L'Unité «Génie biologique» intègre les divers outils biotechnologiques actuellement disponibles parmi lesquels se trouvent les techniques d'analyses moléculaires les plus récentes en vue d'identification génétique (microsatellites, AFLP), de traçabilité et de caractérisation de la biodiversité des végétaux, et les technologies de multiplication végétative employées pour développer de nouvelles variétés adaptées à l'environnement. Spécialisée de longue date dans la fixation et la multiplication de ligneux fruitiers (depuis 1963) et forestiers (depuis 1978) par le clonage recourant aux techniques horticoles classiques et à la culture *in vitro* (multiplication de génotypes sélectionnés), elle développe des nouvelles méthodes de sélection *in vitro* en vue d'accélérer les programmes d'amélioration classiques en se basant sur le contrôle des processus de régénération végétale dès le stade cellulaire. Parmi ces espèces se trouvent des variétés multiclonales sélectionnées par les généticiens forestiers.

L'Unité «Biologie des nuisibles et biovigilance» comporte notamment la «phytopathologie» parmi ses attributions. Le laboratoire de mycologie y est actif pour la détection des champignons responsables de maladies des plantes et des milieux naturels (forêt, zone rivulaire). Il effectue des missions de service (identification de maladies et conseils de lutte) et des missions de recherches. À cet égard, il est actif dans l'étude de la maladie de l'aulne causée par *Phytophthora alni* (thème de recherche étudié depuis 2001), et dans la surveillance phytosanitaire des essences ligneuses des berges des cours d'eau. Il fait partie du consortium de laboratoires de référence pour la détection des champignons de quarantaine en Belgique.

L'Unité «Biomasse, bioproduits et énergies» traite entre autres des systèmes d'exploitation et de valorisation de la biomasse.

Centre wallon de Recherches agronomiques (CRA-W), Unité Génie biologique. Bâtiment Jean-Baptiste de La Quintinie. 234 Chaussée de Charleroi. B-5030 Gembloux, Belgique.

Unité Biologie des nuisibles et biovigilance, Bâtiment Émile Marchal. 4 rue de Liroux. B-5030 Gembloux, Belgique.

Centre wallon de Recherches agronomiques, Unité Biomasse, bioproduits et énergies. Bâtiment Francini. 146 Chaussée de Namur. B-5030 Gembloux, Belgique.

Site Internet : www.cra.wallonie.be



INRA Nancy

Le **Centre INRA de Nancy-Lorraine** regroupe 16 unités de recherche ou d'appui.

Parmi ces unités, les recherches de l'UMR1136 « Interactions Arbres/Micro-organismes » ont pour thème central la biologie et l'écologie des interactions entre micro-organismes et arbres forestiers. Elles visent à améliorer notre connaissance et notre compréhension des interactions qui s'établissent entre les arbres, les champignons et les bactéries rhizosphériques, et qui contribuent au fonctionnement et à la durabilité des écosystèmes forestiers. Ces recherches sont organisées autour de deux axes : (1) la biologie intégrative des associations arbres-champignons-bactéries (du gène à l'organisme) et (2) l'écologie des interactions arbres-champignons-bactéries (de l'individu à la communauté).

Les recherches de l'Unité sont déclinées en quatre objectifs stratégiques :

- Développer des outils d'investigation pour la biologie intégrative, par confrontation d'approches telles que la génomique, la génétique, la transcriptomique, la protéomique, la métabolomique et la bioinformatique, afin de décrypter les mécanismes d'interaction biotique et caractériser de nouvelles fonctions cellulaires.
- Utiliser les ressources génomiques acquises pour décrypter les processus intégrés de développement, de fonctionnement et d'adaptation à l'environnement des associations arbres-champignons-bactéries.
- Comprendre les interactions des micro-organismes, pour mieux appréhender le fonctionnement des écosystèmes forestiers, notamment pour ce qui concerne les flux de matière et d'énergie entre les compartiments du sol et de l'arbre, et pouvoir fournir des indicateurs permettant d'évaluer l'état et les capacités d'évolution de la diversité génétique et fonctionnelle des micro-organismes forestiers.
- Coupler écologie évolutive / épidémiologie / génétique et génomique des populations pour mieux comprendre les mécanismes d'émergence de nouvelles maladies, c'est-à-dire identifier les facteurs qui déterminent l'évolution des populations de champignons pathogènes des arbres et l'impact de ces agents pathogènes sur la structure et la dynamique des peuplements forestiers. Cela implique de modéliser la progression de la maladie et les conséquences génétiques de la dispersion. Le projet ECOLIRIMED s'intègre bien dans ce dernier objectif.

INRA, UMR1136 INRA. Université de Lorraine « Interactions Arbres/Micro-organismes », IFR110 EFABA. Centre INRA de Nancy. F-54280 Champenoux, France.

Site Internet : www.nancy.inra.fr



Né de la Cellule d'Hydrobiologie créée en 1988, le département **Environnement et Agro-biotechnologies (EVA) du Centre de Recherche Public – Gabriel Lippmann à Belvaux**, GD Luxembourg, a connu une belle croissance et compte aujourd'hui plus de 100 chercheurs et techniciens. Le département s'est développé en se faisant l'écho des enjeux majeurs du développement durable, en particulier sur le plan national luxembourgeois. Depuis près de 20 ans, le département entend accompagner les acteurs impliqués dans la gestion durable des ressources et des risques naturels. Le département EVA a développé une expertise pluridisciplinaire selon cinq axes stratégiques de développement et d'innovation portés par cinq unités de recherche :

- Unité de recherche « Biomasse, Bioénergie et Biopolymères » (EVA-BIO3)
- Unité de recherche « Plantes, Aliments et Nutrition » (EVA-NUTOX)
- Unité de recherche « Écosystèmes Aquatiques et Terrestres » (EVA-ECOSAT)
- Unité de recherche « Environnement, Risques et Santé » (EVA-ERIS)
- Unité de recherche « Géo-hydrosystèmes et Aménagement du Territoire » (EVA-GEOSAT).

Le groupe ayant participé au projet ECOLIRIMED fait partie de l'Unité de recherche EVA-BIO3 spécialisée dans la production de biomasse végétale en vue de sa valorisation comme biopolymères ou bioénergie. Au travers de ses différents domaines de compétence, les activités de l'Unité de recherche EVA-BIO3 ont trait aux thématiques de recherche autour de la valorisation de la biomasse végétale pour la production de bioénergie et de matériaux biosourcés. En effet, la recherche d'alternatives aux hydrocarbures en tant que source d'énergie ou de matériaux pousse à considérer l'utilisation industrielle de la biomasse végétale comme une ressource alternative. Au cours des dernières années, le groupe ayant participé au projet ECOLIRIMED a acquis une renommée scientifique internationale dans des domaines étroitement liés aux thèmes pertinents pour ce projet: impact des contraintes environnementales sur la physiologie et le comportement des végétaux, et ce notamment dans les cas de déséquilibres minéraux. Pour ce faire, l'unité EVA-BIO3, forte de sa collaboration avec les plates-formes technologiques du département EVA, à savoir la plate-forme en Protéomique et Métabolomique Végétale et la plate-forme en Chimie Analytique, a développé l'utilisation des techniques dites « omiques » et l'intégration des données biologiques provenant de nombreuses sources analytiques en vue de décrire et de comprendre les interactions entre la physiologie des plantes et leur environnement. Ces études sont valorisées dans des brevets ainsi que dans des publications scientifiques internationales de haut niveau.

Centre de Recherche Public – Gabriel Lippmann, Département Environnement et Agrobiotechnologies. 41 rue du Brill. L-4422 Belvaux, Luxembourg.

Site Internet : www.crpgl.lu



Gembloux Agro-Bio Tech – LTE

Le **Laboratoire de Toxicologie environnementale** mène des recherches dans le domaine de l'écotoxicité depuis les années 1980 et plus particulièrement sur la quantification et les mécanismes physiologiques de transferts des polluants (métalliques et organiques) du sol vers les plantes. Il applique ses compétences en matière d'étude de la physiologie des plantes au profit d'une meilleure gestion du risque associé aux polluants présents dans l'environnement. Les résultats sont toujours intégrés dans une démarche appliquée et environnementale.

Laboratoire de Toxicologie environnementale, Unité de Biologie Végétale. Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech. 2 Passage des Déportés. B-5030 Gembloux, Belgique.

Site Internet : www.gembloux.ulg.ac.be/to/toxfpres.htm



Arexhor

La **Station AREXHOR Grand Est**, membre de l'Institut Technique Horticole français ASTREDHOR, met en place des programmes d'expérimentation dans les secteurs de la pépinière (pleine terre ou conteneur) et de l'horticulture (sous tunnel et serre) depuis plus de vingt ans. Les thèmes travaillés ont évolué au fil des ans et aujourd'hui de nombreux tests visent à accompagner les professionnels vers une horticulture plus respectueuse de l'environnement. Les principaux axes de travail s'articulent autour de la maîtrise de l'énergie, la gestion de l'eau et des éléments fertilisants, les méthodes alternatives à l'utilisation des produits phytosanitaires ou la recherche d'innovation dans les techniques culturales.

Association Inter Régionale d'Expérimentation Horticole. Arexhor Grand Est. 28 rue du chêne. 88700 Roville-aux-Chênes, France.

Site Internet : www.astredhor.fr/arexhor-grand-est-655.html



Service public de Wallonie – Département de la Ruralité et des Cours d'Eau – DCENN



La **Direction des Cours d'Eau non navigables** gère directement les 1651 km de cours d'eau au sein du Service public de Wallonie Département de la Ruralité et des Cours d'Eau, (dits de 1^{ère} catégorie). Cette gestion particulière consiste, d'une part à sauvegarder ou restaurer les caractéristiques de l'écosystème rivière et, d'autre part à préserver les droits et intérêts des riverains. Le service étudie, conçoit, fait réaliser, surveille et finance certains aménagements locaux en vue de la lutte contre les inondations (maîtrise du flux liquide) et de la protection des berges (érosion, flux solide).

Le service est conseiller technique pour les agriculteurs dans le drainage des terres agricoles; il subsidie les travaux spécifiques des wateringues (groupements essentiellement d'agriculteurs ayant le statut d'administration publique) ainsi que les travaux extraordinaires réalisés par les provinces et les communes sur leurs cours d'eau.

SPW – DGO3. 15 Avenue Prince de Liège. B-5100 Jambes, Belgique.

Site Internet : www.environnement.wallonie.be/administration/drce.htm#non_navigables



DEMNA DMF



Le **Département de l'Étude du Milieu Naturel et Agricole** fait partie du service public de Wallonie. Il comporte la **Direction du Milieu Forestier** qui représente l'Observatoire wallon de la santé des forêts, visant à maintenir un état de développements des ressources forestières et ligneuses en équilibre avec l'environnement biotique et abiotique.

Service Public de Wallonie, Département de l'Étude du milieu naturel et agricole. 23 Avenue Maréchal Juin. B-5030 Gembloux, Belgique.

Site Internet : www.environnement.wallonie.be/cgi/dgrne/plateforme_dgrne/visiteur/

Ministère de l'Intérieur – Grand-Duché de Luxembourg – Administration de la Gestion de l'Eau

L'**Administration de la Gestion de l'Eau** existe officiellement depuis le 13 mai 2004. Elle fait partie des administrations et divisions de services compétentes en matière de protection et de gestion de l'eau depuis 1999. Dépendante du Ministère, elle comporte 4 Divisions que sont la Division de l'hydrologie, la Division de la Protection des eaux, la Division des eaux souterraines et eaux potables et la Division du laboratoire de l'eau et de l'environnement.

Parmi les missions générales actuelles qui lui sont attribuées se trouvent :

- l'établissement d'un inventaire des rejets dans le milieu aquatique;
- l'établissement d'un inventaire de la qualité des eaux superficielles et souterraines et le contrôle de son évolution.

Elle doit appliquer la Directive européenne 2000/60/CE (« Directive Cadre sur l'Eau ») :

- définition et application des plans de gestion comprenant des programmes de mesures;
- gestion intégrée des eaux par bassin hydrographique (Luxembourg : Rhin et Meuse);
- récupération des coûts des services liés à l'utilisation de l'eau;
- rétablir un bon état écologique dans les eaux de surface;
- rétablir un bon état quantitatif et chimique dans les eaux de surface.

La tâche de l'administration consiste en une gestion intégrée et durable des ressources d'eau et du milieu aquatique et en une protection efficace. Elle est notamment chargée :

- d'étudier les problèmes concernant la gestion et la protection de l'eau;
- de conseiller les autorités publiques et les collectivités sur toutes les questions du domaine de l'eau;
- de veiller à l'observation des dispositions légales, réglementaires et administratives en matière de gestion et de protection de l'eau et d'exercer la police y relative;
- de contribuer à l'élaboration de plans d'aménagement et de gestion de l'eau et à la définition de programmes de mesures à mettre en œuvre pour atteindre les objectifs fixés;
- d'engager les mesures correctives et curatives nécessaires pour améliorer l'état qualitatif et quantitatif des eaux superficielles et souterraines et d'entreprendre toute action pour en prévenir la pollution ou la détérioration;
- de coordonner les actions en matière de lutte contre les inondations;
- d'instruire les dossiers de demandes d'autorisations au titre de la nouvelle loi sur l'eau qui va être déposée en 2006;
- de réaliser des travaux d'analyse et de laboratoire dans le domaine de l'eau;
- de mener des travaux de recherche dans le domaine de l'eau;
- de participer sur le plan des institutions internationales à l'élaboration et à l'application de la politique commune en matière de gestion de l'eau;
- de déterminer l'état de la meilleure technique disponible en matière de technologies dans le domaine de l'eau;
- d'assurer l'information du public et d'encourager toute initiative en matière de gestion durable de l'eau.

Site Internet : www.eau.public.lu

Liste des auteurs

Adant Stéphane : SPW – DGO3, Direction des Cours d'Eau non navigables. E-mail : stephan.adant@spw.wallonie.be

Bajji Mohammed : Centre wallon de Recherches agronomiques, Département Sciences du Vivant, Unité Génie Biologique. E-mail : bajji.mohammed@base.be

Bender Jerry : Ministère de l'Intérieur et de l'Aménagement du Territoire, Gestion de l'Eau. L-2146 Luxembourg, Grand-Duché de Luxembourg. E-mail : Jerry.Bender@eau.etat.lu

Campanella Bruno : Laboratoire de Toxicologie environnementale, Unité de Biologie Végétale. Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech. E-mail : Bruno.Campanella@ulg.ac.be

Chandelier Anne : Centre wallon de Recherche agronomique, Département Science du vivant, Unité Biologie des nuisibles et biovigilance. E-mail : a.chandelier@cra.wallonie.be

Delcarte Jérôme : Centre wallon de Recherches agronomiques, Département valorisation des productions, Unité Biomasse, bioproduits et énergies. E-mail : delcarte@cra.wallonie.be

Delecourt Bernard : Service public de Wallonie, Département de la Ruralité et des Cours d'Eau. Direction des Cours d'Eau non navigables. E-mail : Bernard.Delecourt@spw.wallonie.be

Druart Philippe : Centre wallon de Recherches agronomiques, Département Sciences du Vivant, Unité Génie biologique. E-mail : druart@cra.wallonie.be

Evlard Aricia : Laboratoire de Toxicologie environnementale, Unité de Biologie Végétale. Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech. Belgique. E-mail : aevlard@gmail.com

Gossiaux Lucas : Laboratoire de Toxicologie environnementale, Unité de Biologie Végétale. Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech.

Hausman Jean-Francois : Centre de Recherche Public – Gabriel Lippmann, Département Environnement et Agrobiotechnologies. E-mail : hausman@lippmann.lu

Husson Claude : INRA, UMR1136 INRA. Université de Lorraine « Interactions Arbres/ Micro-organismes », IFR110 EFABA. E-mail : claude.husson@nancy.inra.fr

Jousset Marie-Anne : Association Inter Régionale d'Expérimentation Horticole. Arexhor Grand Est. France. E-mail : arexhor@astredhor.fr

Lambot Francis : SPW – DGO3, Direction des Cours d'Eau non navigables. E-mail : francis.lambot@spw.wallonie.be

Leclercq Martine : Centre wallon de Recherches agronomiques, Département Sciences du Vivant, Unité Génie biologique. E-mail : ecoliri@cra.wallonie.be

Marçais Benoit : INRA, UMR1136 INRA, Université de Lorraine « Interactions Arbres/ Micro-organismes », IFR110 EFABA. E-mail : marçais@nancy.inra.fr

Mertens Patrick : Service Public de Wallonie, Département de l'Étude du milieu naturel et agricole. Belgique. E-mail : Patrick.Mertens@spw.wallonie.be

Mingeot Dominique : Centre wallon de Recherches agronomiques (CRA-W),
Département Sciences du Vivant, Unité Génie biologique. E-mail : mingeot@cra.
wallonie.be

Paul Roger : Laboratoire de Toxicologie environnementale, Unité de Biologie Végétale.
Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech. E-mail : roger.paul@ulg.ac.be

Printz Bruno : Centre de Recherche Public – Gabriel Lippmann, Département Environ-
nement et Agrobiotechnologies. E-mail : printz@lippmann.lu

Table des matières

Préface	5
Partenaires	7
Liste des auteurs	13
1 La revégétalisation des cours d'eau : une stratégie écologique nécessaire	19
1.1 Introduction	20
1.2 Cadre des missions de gestion des cours d'eau et stratégie	20
1.3 Principes de revégétalisation des cours d'eau	21
1.4 Techniques de revégétalisation et réalisations concrètes	22
1.4.1 La plantation	22
1.4.2 Les fascines de saules	25
1.4.3 Les peignes	26
1.4.4 Le tressage et le clayonnage	26
1.4.5 Les épis	27
1.5 Réalisations concrètes et évolution de diverses formes de végétalisations ...	28
1.5.1 Sur la Ligne à Saint-Martin	28
1.5.2 Sur la Lesse à Furfooz	28
1.5.3 Sur l'Our à Ouren	31
1.6 Conclusion	31
1.7 Bibliographie	31
2 Aspects sanitaires de la filière aulne glutineux, frêne commun et saule dans le cadre de la renaturation des cours d'eau	33
2.1 Revue des principales maladies et des ravageurs des essences ligneuses rivulaires	34
2.2 Risques d'introduction de maladies liés aux interventions humaines dans les ripisylves	35
2.3 Deux exemples de maladies émergentes et invasives en ripisylve sur aulne et frêne	37
2.3.1 La chararose du frêne	37
2.3.2 Le dépérissement de l'aulne causé par <i>Phytophthora alni</i>	38
2.4 Recherches de résistance chez l'aulne glutineux vis-à-vis de <i>Phytophthora alni</i>	43
2.4.1 Mise au point de méthodes d'évaluation de la sensibilité d'aulnes glutineux à <i>P. alni</i>	43
2.4.2 Recherche d'aulnes tolérants à <i>P. alni</i> dans des semis sélectionnés et non sélectionnés	45
2.5 Conclusion	45
2.6 Bibliographie	46
3 Évaluation par marqueurs moléculaires microsatellites de la diversité d'une collection d'aulnes glutineux provenant de Wallonie (Belgique), de Lorraine (France) et du Grand-Duché du Luxembourg	49

3.1 Introduction	50
3.2 Étude de diversité de l'aulne glutineux dans la région Wallonie – Lorraine – Grand-Duché du Luxembourg	53
3.2.1 Utilisation de marqueurs microsatellites comme outil de discrimination et de gestion d'une collection	53
3.2.2 Diversité génétique de la collection et comparaison avec la diversité d'un peuplement	54
3.3 Conclusions	56
3.4 Bibliographie	57
4 Impact des éléments-traces métalliques sur les plantes et les techniques de phytoremédiation	59
4.1 Introduction	60
4.2 Les éléments-traces métalliques dans l'environnement	60
4.2.1 Définition et origine des éléments-traces métalliques	60
4.2.2 Mobilité et biodisponibilité des éléments-traces métalliques	61
4.3 Les éléments-traces métalliques chez les végétaux	62
4.3.1 L'interaction entre les métaux	63
4.3.2 Les espèces réactives d'oxygène (ROS)	63
4.3.3 Systèmes de tolérance des métaux	65
4.4 La phytoremédiation	69
4.4.1 La phytostabilisation	70
4.4.2 La phytoextraction	70
4.5 Conclusion	71
4.6 Bibliographie	71
5 Étude du saule et de l'aulne pour la phytoremédiation des berges de cours d'eau non navigables	77
5.1 Introduction	78
5.2 Le potentiel des ligneux	79
5.2.1 Le saule	79
5.2.2 L'aulne	80
5.3 Les expériences mises en place pour l'étude de tolérance des ligneux aux éléments-traces métalliques	81
5.3.1 Expériences en hydroponie sur l'aulne	81
5.3.2 Expériences en substrat terreux sur le saule et l'aulne	82
5.3.3 Évaluation de la tolérance aux ETM chez les souches fongiques associées aux racines d'aulnes et de saules	84
5.4 Conclusions et perspectives pour la phytoremédiation des berges	85
5.5 Bibliographie	87
6 Apports de la culture <i>in vitro</i> à l'amélioration de la phytoremédiation : cas de l'aulne glutineux le long des berges de cours d'eau	91
6.1 Introduction	92
6.2 L'aulne glutineux comme écotype ligneux de choix	93
6.2.1 Rôle stabilisateur et « phytoremédiateur » de l'aulne glutineux	93
6.2.2 Culture <i>in vitro</i> de l'aulne glutineux	93
6.3 La culture <i>in vitro</i> comme outil de recherche en phytoremédiation	95

6.4 La culture <i>in vitro</i> comme outil d'amélioration de la phytoremédiation	95
6.4.1 Criblage <i>in vitro</i> de clones d'aulne glutineux en présence du cadmium	96
6.4.2 Sélection <i>in vitro</i> de régénérants d'aulne glutineux en présence du cadmium	99
6.5 Conclusions	101
6.6 Bibliographie	102
7 Valorisation énergétique du bois produit à des fins de phytoremédiation	107
7.1 Introduction	107
7.2 Valorisation énergétique des déchets de bois : le point sur les législations .	109
7.3 Comparaison des teneurs en ETM mesurées dans le bois produit sur sols pollués, avec les valeurs seuils décrites dans la législation relative aux déchets de bois	113
7.3.1 Cas du saule	113
7.3.2 Cas de l'aulne	114
7.4 Discussion	114
7.5 Conclusions et perspectives	116
7.6 Bibliographie	117
8 Construction et développement d'une filière de production d'écotypes ligneux pour l'application des techniques végétales à la renaturation des berges de cours d'eau	121
8.1 Introduction	123
8.2 Construction de la filière d'écotypes ligneux	124
8.2.1 La prospection des bassins versants	125
8.2.2 La fixation	127
8.2.3 Établissement en parcs à clones	130
8.3 Approvisionnement en matériel végétal d'origine certifiée	131
8.3.1 La gestion des parcs à bois	131
8.3.2 La production du matériel végétal pour la végétalisation	134
8.4 Conditions de diffusion des variétés multiclones	144
8.4.1 Précautions à la construction de la filière	144
8.4.2 Enjeu de la diffusion des variétés multiclones d'écotypes	145
8.4.3 Gestion des risques et maintien des performances des écotypes	147
8.5 Conclusions	151
8.6 Bibliographie	152



1

La revégétalisation des cours d'eau : une stratégie écologique nécessaire

Lambot Francis, Adant Stéphan

Résumé

La Direction des Cours d'Eau non navigables du Service public de Wallonie (SPW) est gestionnaire des 1 651 km de cours d'eau non navigables de première catégorie, caractérisés par des largeurs de 5 à 35 mètres pour des vitesses d'écoulement de 0,25 à 1 mètre/seconde environ. Ses actes de gestions doivent non seulement répondre à ses missions de base de protection des biens et des personnes mais doivent également s'inscrire dans la stratégie européenne. Celle-ci vise, à travers différentes directives, l'atteinte d'un bon état écologique de nos cours d'eau. L'utilisation des techniques alternatives de gestion des cours d'eau et des berges en particulier, est donc devenue une nécessité afin de pouvoir répondre aux exigences qualitatives sévères imposées par ces différentes directives européennes. Le SPW est fort d'une expérience de 20 ans portant sur plusieurs centaines de chantiers de moyennes et grandes importances. Les gestionnaires des cours d'eau, en charge de la mise en œuvre des chantiers de techniques végétales, ont maintenant acquis un savoir-faire certain dans l'utilisation des différentes techniques courantes du génie végétal (bouturage, plançons, tapis de branches, fascines, peignes...). Celui-ci a été complété par des recherches scientifiques menées dès les premiers chantiers afin d'en vérifier l'efficacité ou d'en déterminer les causes d'échec.

Mots-clés : génie végétal, cours d'eau, écologie d'eau douce, administration régionale, restauration couverture végétale, végétation ripicole.

Renaturation the water courses; a necessary ecological strategy

The non-navigable rivers unit within *Service public de Wallonie* (the Public Service of Wallonia) manages 1 651 km of category one non-navigable water courses, whose widths range between 5 and 35 metres, with flow rates ranging from approximately 0.25 meters to 1 metre per second. Its management measures not only have to meet its own core objectives of protecting people and property, but equally they must fall within European strategy. It focuses, by way of its various directives, on the attainment of good ecological status of our water courses. The use of alternative management techniques for water courses and their banks in particular, has therefore become a necessity, so as to be able to meet the rigorous quality requirements imposed by the various European directives. The Public Service of Wallonia now

has 20 years of experience and focuses on several hundreds of sites of medium and large-scale significance. Water body management units, which are responsible for the implementation of sites using vegetal techniques, have now acquired specific expertise in the use of the various current vegetal techniques (propagation by stem cuttings, large cuttings without roots, branch bundles, fascines, combs...). This has been completed through scientific research conducted from the initial sites in order to ascertain efficacy, or determine the causes of failure.

Keywords: plant engineering, rivers management, ecology of fresh water, regional government, revegetation, riparian vegetation.

1.1 Introduction

La Direction des Cours d'eau non navigables (DCENN) gère directement 1 651 km de cours d'eau en Région Wallonne (D'GARNE : Direction Générale Agriculture, Ressources naturelles et Environnement). Dits de 1^{ère} catégorie, ces cours d'eau se caractérisent par un bassin hydrographique d'au moins 5 000 hectares, une largeur comprise entre 5 et 35 mètres et une vitesse d'écoulement, en période normale, de moyenne à rapide (0, 25 à 1 mètre par seconde).

Ce type de cours d'eau, traversant à la fois des zones naturelles, agricoles et urbaines exige une gestion particulière. Il convient, d'une part, de sauvegarder – voire de restaurer – les caractéristiques de l'écosystème rivière et, d'autre part de préserver les droits et intérêts des riverains en procédant, le cas échéant, à des aménagements locaux en vue de la lutte contre les inondations (maîtrise du flux liquide) et la protection des berges (érosion, flux solide).

1.2 Cadre des missions de gestion des cours d'eau et stratégie

Au niveau européen, une cohérence entre les législations nationales est recherchée en vue de généraliser l'application du « principe de précaution ». Ce dernier permet de réagir rapidement face à un possible danger pour la santé humaine, animale ou végétale, ou pour la protection de l'environnement, particulièrement dans le cas où les données scientifiques ne permettent pas une évaluation complète du risque.

Les cours d'eau sont actuellement concernés par la mise en œuvre de législations relatives :

- Au réseau écologique européen « Natura 2000 », qui comprend la Directive Oiseaux (2009/147/CE) et la Directive Habitats-Faune-Flore (92/43/CEE);

- À la décision M (2009)1 du 16/06/2009 abrogeant la décision M (96) 5 du 26 avril 1996 du Comité de Ministres de l'Union économique BENELUX relative à la libre circulation des poissons;
- Au règlement (CE) N° 1100/2007 du Conseil du 18 septembre 2007 instituant des mesures de reconstitution du stock d'anguilles européennes;
- À la Directive 2007/60 ayant pour objet les «Évaluation et gestion des risques d'inondation»;
- À la Directive 2000/60 sur l'Eau, mieux connue sous le nom de Directive «Cadre sur l'Eau».

Au niveau de la Région wallonne, le plan P.L.U.I.E.S. (http://environnement.wallonie.be/de/dcenn/plan_pluies/index.htm) dont les actions sont coordonnées au niveau du «Groupe Transversal Inondations» prévoit notamment d'«Aménager les lits des rivières et des plaines alluviales en tenant compte des aléas météorologique et hydrologique, tout en respectant et en favorisant les habitats naturels, gages de stabilité».

Toutes ces directives et règlements ont un commun dénominateur : la nécessité de gérer le mieux possible les berges et les lits des cours d'eau, autrement dit la qualité hydromorphologique des rivières, en prenant, comme unité d'évaluation, la masse d'eau définie dans la Directive Cadre Eau (2000/60/CE). Cette Directive impose l'arrêt de la dégradation des masses d'eau mais également l'atteinte d'un bon état ou potentiel (selon la masse d'eau) écologique.

L'atteinte du bon état écologique nécessite une qualité biologique et physico-chimique suffisante. L'hydromorphologie ne définit que le très bon état écologique de la masse d'eau. Toutefois, l'ensemble de ces critères de qualité sont interconnectés dans l'écosystème rivière et une amélioration de la qualité hydromorphologique du cours d'eau, par le biais d'une gestion intégrant une stratégie écologique est de nature à améliorer les autres critères de classification de la masse d'eau concernée.

1.3 Principes de revégétalisation des cours d'eau

Les techniques du génie végétal ont pour but de freiner l'érosion en milieu rivulaire en consolidant et en stabilisant les berges et le lit mineur par les racines végétales et en développant la structure et l'effet drainant du sol (Jund, 2003). Elles préservent aussi le caractère naturel des berges par l'emploi des éléments végétaux (plants entiers, boutures...) et, s'il le faut, d'autres matériaux naturels (bois, pierres...).

Ces pratiques exigent donc une maîtrise des comportements morphologiques et physiologiques des végétaux parmi lesquels les saules sont particulièrement privilégiés. Dans tous les cas, les espèces indigènes sont préconisées.

Le génie végétal propose des techniques éprouvées selon les exigences des aménagements de couvertures, de pied de berge, des ouvrages construits et des techniques indirectes (Frossard et al., 2009). La combinaison de plusieurs d'entre-elles est fréquente voire indispensable (Agence de l'Eau Rhin Meuse, 1997). La solution pour chaque site est particulière et demande une analyse du gestionnaire. Son rôle est d'atteindre les objectifs en combinant les techniques selon l'état du milieu et sur base d'un aménagement raisonné. Par exemple, la traversée d'une zone agricole n'implique pas les mêmes obligations que lorsqu'il s'agit d'une zone habitée en ville.

Ces techniques aboutissent à de véritables ouvrages vivants de protection des cours d'eau, répondant à des critères techniques et mécaniques exigeants où des végétaux sont utilisés comme matériaux de construction (Lachat, 1994). La résistance de ces ouvrages est comparable à celle des aménagements de génie civil. Elle se renforce avec le temps si un entretien approprié est assuré et permet, en outre, de restaurer un cycle de colonisation végétale naturelle lorsque celle-ci a disparu.

Les diverses techniques ligneuses du génie végétal destinées à consolider les berges des cours d'eau sont adaptées au lieu d'application. Celles-ci sont décrites par Barby (2003) et Verniers et al. (1999).

1.4 Techniques de revégétalisation et réalisations concrètes

Le texte et les illustrations reproduits ci-dessous sont extraits de la publication de Verniers et al. (2009).

1.4.1 La plantation

La plantation d'espèces ligneuses est une technique simple de protection de la berge par la mise en terre de végétaux enracinés. En général, elle se complète d'autres techniques, notamment de stabilisation du pied de berge.

«Il est nécessaire de respecter l'ordre naturel des successions végétales sur la berge, la distribution géographique et spatiale de chaque espèce, les besoins physiologiques de chaque espèce, etc. Le choix des espèces se fait parmi les essences autochtones (régions, type de substrat, altitude, etc.) (Lachat, 1994). Les espèces exotiques et ornementales sont exclues, de même que les résineux et les peupliers hybrides.»

❑ Le bouturage

« Une bouture est un segment de branche (diamètre 2-4 cm, longueur 40-100 cm) ayant une forte capacité de rejets, que l'on plante isolément ou en groupe et qui, en poussant, forme un nouveau buisson ou un nouvel arbre. Cette technique utilise la capacité qu'ont certains végétaux, principalement les saules, de développer des racines adventives à partir d'un fragment de rameau séparé de la plante mère. » Elle est adaptée à des lits peu soumis à l'érosion et permet une revégétalisation rapide des berges, mais nécessite de bonnes conditions hydriques du sol : l'implantation des boutures est souvent limitée au bas de la berge.

Les principales espèces de saules préconisées pour le bouturage sont *Salix purpurea* L. (le saule pourpre), *Salix triandra* L. (le saule à trois étamines) et *Salix viminalis* L. (le saule des vanniers) pour un développement buissonnant et arbustif (pied de berge) ainsi que *Salix alba* L. (le saule blanc), *Salix fragilis* L. (le saule fragile) et *Salix rubens* Schrank (le saule hybride blanc × fragile) pour un développement arborescent favorable au haut de berge). Cette liste est bien entendu non exhaustive et doit être adaptée et complétée pour chaque cours d'eau et pour chaque situation.

Toutes les espèces ne se prêtent toutefois pas au bouturage. Les boutures sont généralement prélevées sur des arbres locaux et sur les exemplaires croissant le mieux et exempts de maladies, ce qui leur assure un maximum de chances d'adaptation. Elles sont prélevées sur des pousses de 1 à 2 ans maximum. Le bouturage se fait en automne (dès le mois d'août pour certaines espèces) afin d'assurer un meilleur enracinement.

On distingue les grandes boutures (de 0,5 à 1,50 mètre d'enfoncement), placées en haut de berge, des petites boutures, placées en pied de berge (deux tiers d'enfoncement) (**Figure 1.1**). Dans certains cas, il peut être nécessaire de stabiliser le pied de berge. Le bouturage peut être appliqué en complément d'autres techniques tels les peignes, les caissons...

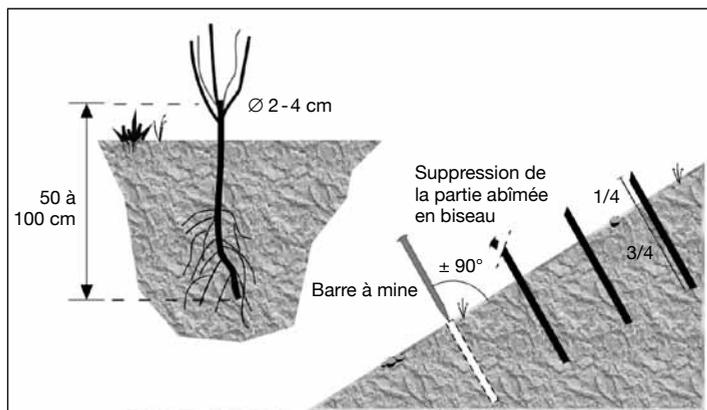


Figure 1.1. Le bouturage (Verniers et al., 2009).

❑ Le tapis de branches

La technique consiste à plaquer contre la partie supérieure de la berge des couches de branches vivantes de saule (dont la base est recouverte de terre) maintenues par des pieux reliés entre eux. Le but principal consiste à dissiper le courant et permettre un dépôt d'alluvions.

La couche de branches permet la formation rapide, par marcottage, de saulaies denses et résistantes qui vont protéger et consolider la partie supérieure des berges. Le matériau est constitué essentiellement de baguettes ébranchées de saule des vanniers (*S. viminalis*) ou de saule pourpre de 1,5 à 6 cm de diamètre et de longueur comprise entre 2 et 5 mètres.

«C'est une technique adaptée aux berges soumises à de fortes contraintes érosives qui nécessite de bons sols (matériaux terreux) pour une reprise et un développement optimaux.»

❑ Les plançons

«Le plançon est composé de branches de saules capables de rejeter ainsi que de plants à racines nues qui sont disposés côte à côte en rang serré, dans de petites tranchées sur plusieurs niveaux (**Figure 1.2**).

Les branches ont un effet drainant et stabilisent bien les fonds mouvants. La structure créée par les rangées de branches diminue l'érosion superficielle par ruissellement et prévient les glissements de terrain superficiels.

Cette technique offre une très bonne garantie de reprise des végétaux (enracinement profond et rapide dans la berge) et est adaptée aux pentes raides et sujettes au glissement.»

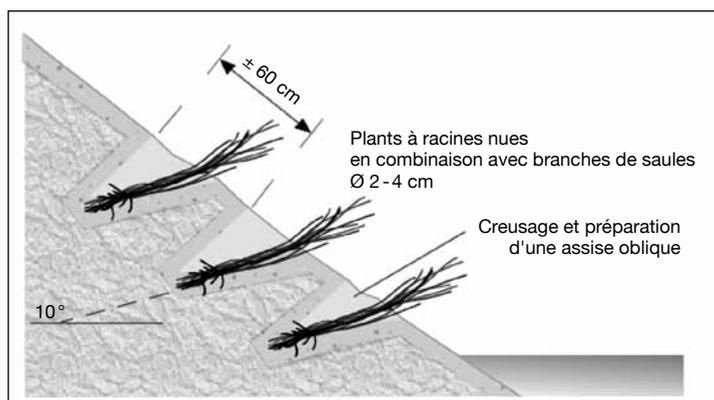


Figure 1.2. Les plançons (Verniers et al., 2009).

1.4.2 Les fascines de saules

«La fascine de saules est une protection du pied de berge réalisée avec des branches de saules vivantes, assemblées en fagots et fixées par une ou deux rangées de pieux» (**Figure 1.3**). C'est une technique efficace qui apporte une protection mécanique immédiate, capable de résister à de fortes contraintes hydrauliques, et ce, même avant que les végétaux aient repris. Elle permet la réalisation d'épis vivants sur les bords des cours d'eau.

«Les fagots peuvent contenir en leur centre un noyau fait de galets, graviers ou matériaux terreux. Ces fascines de lestage complètent la protection du pied de berge.»

Des branches peuvent être placées en dessous et en arrière des fagots de saules pour limiter l'effet d'affouillement. À terme, les branches des fagots vont se développer et créer un linéaire de saules le long de la berge, et le système racinaire puissant des saules empêchera l'érosion.

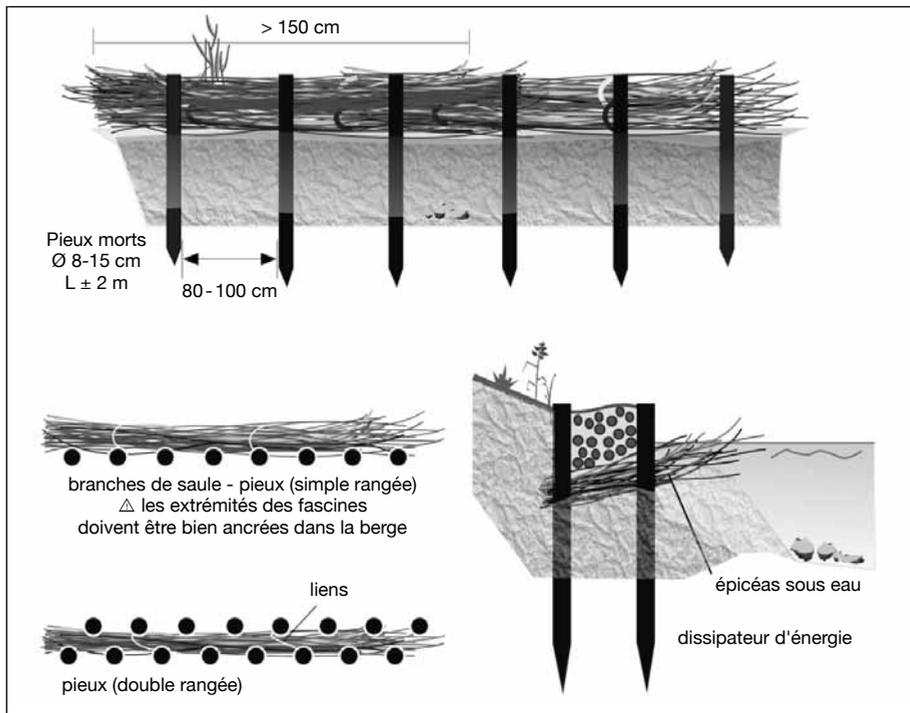


Figure 1.3. Les fascines (Verniers et al., 2009).

1.4.3 Les peignes

Cette technique consiste à entasser de manière enchevêtrée, au pied d'une berge sapée, quantité de grosses branches, solidement attachées, de manière à former un ensemble végétal capable de filtrer les éléments en suspension dans l'eau (**Figure 1.4**). «La densité des branches crée des séparations dans le courant qui traverse le peigne, réduit la vitesse d'écoulement, et les sédiments fins peuvent alors se déposer et reconstituer le pied de berge.

L'effet de protection est immédiat. L'intervention est peu coûteuse et rapide, et applicable en cas d'urgence mais uniquement sur des cours d'eau qui transportent beaucoup de fins alluvions.»

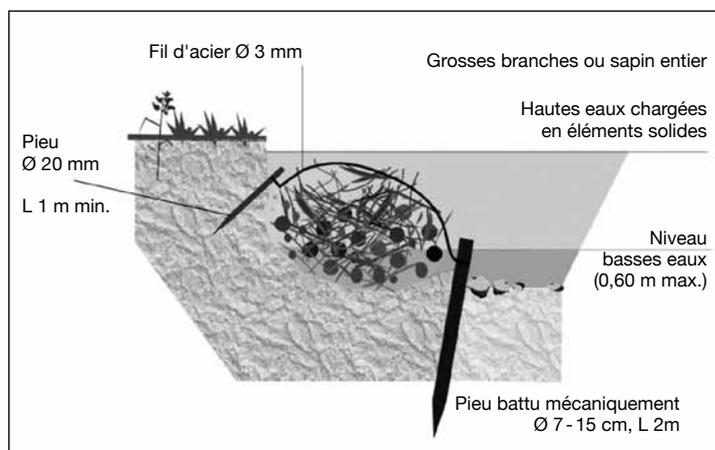


Figure 1.4. Les peignes (Verniers et al., 2009).

1.4.4 Le tressage et le clayonnage

«Le tressage est une protection de pied de berge de faible hauteur (maximum 40 cm) réalisée avec des branches de saules vivantes, entrelacées autour de pieux battus mécaniquement. Le clayonnage, quant à lui, est un tressage plus haut que 40 cm, il est plaqué, à plat, sur la berge talutée et nettoyée pour favoriser le contact avec le sol (**Figure 1.5**).

C'est une méthode rapide et efficace pour stabiliser les bords de cours d'eau en pied de berge, sur des cours d'eau peu agressifs du point de vue érosif. Elle permet de modeler le pied de berge de manière très souple pour diversifier l'écoulement et les habitats. Cette technique est particulièrement adaptée aux petits cours d'eau du fait de sa grande souplesse dans la mise en œuvre qui permet une très bonne adaptation aux variations du terrain.

Pour un fonctionnement optimal de l'aménagement, le tressage doit se situer deux tiers au-dessus du niveau moyen des eaux et un tiers sous ce niveau. Si le tressage a une grande hauteur sous l'eau, son développement est moins bon. Si le tressage sort excessivement de l'eau, les branches se dessèchent et se développent moins vite, voire pas du tout (hauteur totale comprise entre 40 et 60 cm). »

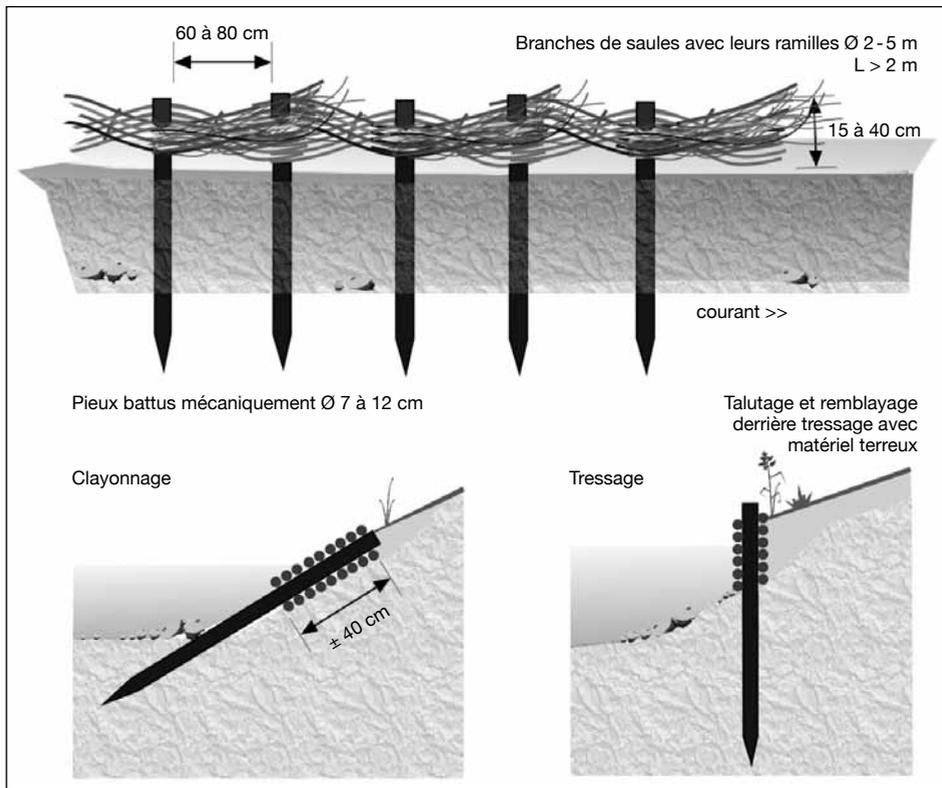


Figure 1.5. Le tressage et le clayonnage (Verniers et al., 2009).

1.4.5 Les épis

« Il s'agit d'ouvrages construits en partant de la berge, obliquement au courant, comme des jetées, et orientés vers l'amont. Leur rôle est de dévier le courant ou de ralentir sa vitesse, créant ainsi une zone de sédimentation. Cette technique n'est envisageable que sur des cours d'eau suffisamment larges (environ 10 mètres).

L'épi modifie la répartition des vitesses et la direction du courant. Selon son implantation et son orientation, il permet soit d'approfondir, soit de remblayer une partie du lit. Le caractère semi-perméable de l'épi végétal permet un aménagement subissant des contraintes hydrauliques moins importantes, tout en augmentant la capacité de sédimentation par rapport à un épi en dur. Il existe différents types d'épis

en fonction du rôle qui leur est attribué : épi directionnel pour réorienter le courant ou épi filtrant pour provoquer une sédimentation, par exemple.

Les épis sont souvent combinés avec d'autres techniques, notamment les fascines.»

Une foule de possibilités existent encore dans le domaine du génie végétal, notamment celles utilisant des plantes héliophytes ou bien encore la mise en œuvre d'ouvrages beaucoup plus complexes ou combinés. Certaines réalisations ont fait l'objet d'un suivi scientifique par des équipes universitaires (Verniers, 1995) afin d'évaluer le taux de réussite des travaux et d'améliorer les techniques, notamment sur le choix des espèces végétales, la conception, l'adéquation au contexte local, biodiversité, l'impact sur la rugosité du lit, sur la vitesse du courant, sur la sédimentation...

1.5 Réalisations concrètes et évolution de diverses formes de végétalisations

1.5.1 Sur la Ligne à Saint-Martin

Sur la Ligne (mars 2002) (**Figure 1.6**), le site d'implantation présentait des dégradations importantes dues au bétail (**Figure 1.6A**).

Les travaux entrepris avec l'accord préalable de l'agriculteur, ont consisté à établir des peignes (**Figure 1.6B**) dans les encoches d'érosion (**Figure 1.6C**) et à construire des zones « abreuvoirs » clôturées (**Figure 1.6D**), rendant au bétail, l'accès à l'eau par l'intermédiaire d'une rampe empierrée. Les boutures de saules insérées avaient été placées verticalement dans le peigne.

Il y a ici combinaison entre différentes techniques indissociables : peigne favorisant la sédimentation dans le cours d'eau, géotextile biodégradable et plantations stabilisant la berge, associées à de bonnes pratiques agricoles.

1.5.2 Sur la Lesse à Furfooz

L'objectif était d'établir des épis et fascines de saules. Il a été procédé à la création de 6 épis perpendiculaires à la berge et à l'installation.

Les épis (**Figure 1.7A**) ont pleinement joué leur rôle de piège à sédiment (**Figure 1.7B**) tout en s'épuisant progressivement (étiolement). Les pieds de berges sont parfaitement consolidés par les fascines (**Figure 1.7C**). Il s'agit là d'un stade intermédiaire où le saule est dominant par manque de concurrence. Le but ultime est de reconstituer une aulnaie alluviale qui assurera la pérennité de la berge.



Figure 1.6. Aménagement d'un peigne sur la Ligne (Saint-Martin : District de Namur) : Situation avant les travaux (A), établissement du peigne (B, C) et d'une zone abreuvoir (D), en mars 2002, vue 3 mois (E) plus tard et 2 ½ ans (F) plus tard.



Figure 1.7. Recolonisation des berges de la Lesse avec épis et fascines (A). État de la végétation après 2 ans (B) et 5 ans (C).



Figure 1.8. Installation d'un caisson végétalisé sur l'Our (A) et développement végétatif obtenu après 3 ans (B).

1.5.3 Sur l'Our à Ouren

Dans ce cas, il a été décidé de construire un caisson végétalisé qui épouse le profil de la berge en amont, avec l'apposition d'une protection par géotextile (**Figure 1.8A**) suivi du bouturage de saules au pied de la digue (**Figure 1.8B**).

La résistance purement mécanique de l'ouvrage a progressivement fait place à une armature végétale pour évoluer à terme vers une ripisylve classique.

1.6 Conclusion

Depuis une vingtaine d'années, la Direction des Cours d'eau non navigables (DCENN) du Service public de Wallonie a réalisé quelques centaines de chantiers d'aménagement et de stabilisation des berges par les techniques du génie végétal. Les saules indigènes offrent par leurs diversités de formes et de milieu de développement des matériaux locaux adaptés à ces ouvrages vivants. Les chantiers mis en place, améliorés depuis deux décennies et évalués scientifiquement montrent l'efficacité des techniques appliquées.

Les améliorations environnementales d'actualité viennent amplifier l'importance de l'application du génie végétal. Elle peut en effet aussi contribuer à la réintroduction des saules sans intérêt pour la production de bois le long des cours d'eau stabilisés par des ouvrages non végétaux et reconstituer ainsi une partie de la diversité perdue des saules. Les précautions de détermination des espèces et écotypes indigènes devront être assurées lors de la multiplication en tenant compte en outre du caractère évolutif (dynamique à long terme) de ces boisements et de leur impact par rapport à la végétation rivulaire existante. La nature interactive des mesures de protection des zones rivulaires peut aussi agir sur la qualité des eaux en favorisant la phytostabilisation et la phytoextraction des polluants.

1.7 Bibliographie

- Anonyme, 1997. *Guide de restauration des rivières*. Moulins-Lès-Metz, France : Agence de l'Eau Rhin-Meuse, 62 p.
- Barbry Y., 2003. *Guide des techniques végétales – Guide d'application*. Béthune, France : Voies Navigables de France, 23 p.
- Frossard P.A. & Evette A., 2009. Le génie végétal pour la lutte contre l'érosion en rivière : une tradition millénaire en constante évolution. *Ingénieries – EAT*. Numéro spécial, 99-109.
- Lachat B., 1994. *Guide de protection des berges de cours d'eau en techniques végétales*. Paris : Ministère de l'Environnement, 143 p.

- Mignot J.F. & Kleiber E., 2003. *Retour d'expérience des travaux réalisés en techniques végétales sur les cours d'eau français. Guide technique*. Orléans, France : Les Agences de l'Eau, 59 p.+ fiches.
- Verniers G., 1995. *Aménagement écologique des berges des cours d'eau. Techniques de stabilisation*. Namur, Belgique : Presses Universitaires de Namur / ETEC, 80 p.
- Verniers G., Petit F., Hallot E. & Houbrechts G., 2009. *Techniques végétales. Conception, application et recommandations*. Namur, Belgique : SPW, Direction générale des Cours d'Eau non navigables, 60 p.

2

Aspects sanitaires de la filière aulne glutineux, frêne commun et saule dans le cadre de la renaturation des cours d'eau

Chandelier Anne, Mertens Patrick,
Marçais Benoit, Husson Claude

Résumé

La renaturation des cours d'eau passe par des programmes de production, de transport et de plantation d'écotypes de frêne, de saule et d'aulne. Ces activités nécessitent, à chaque étape, une grande vigilance pour éviter l'installation et le développement de problèmes phytosanitaires. Ce chapitre fait le point sur les principales maladies qui touchent ces trois essences, dresse un bilan des risques d'introduction d'agents pathogènes dus à l'action de l'homme en bordure de rivières et cite en exemple deux maladies létales émergentes en Europe sur le frêne commun et l'aulne glutineux. Enfin, les questions de fréquence et de niveau de résistance putative chez l'aulne envers l'agent pathogène *Phytophthora alni* dans les populations sauvages seront abordées. Estimer la part de résistance disponible chez l'aulne est un élément clé pour prédire l'avenir de l'espèce dans les ripisylves.

Mots-clés : *Alnus glutinosa*, *Fraxinus excelsior*, *Salix*, maladie des plantes, *Phytophthora*, *Chalara*, zone ripicole, protection des berges.

Phytosanitary issues in common alder, common ash and willow within the context of riverbank restoration

Riverbank restoration involves several stages, including plant production in nurseries, transport and the plantation of woody ecotypes (alder, ash and willow). Great care is required in all these activities in order to prevent pathogen establishment and development. This chapter focuses on the major diseases affecting these tree species, assesses the risk of pathogen introduction as a result of human activity on riverbanks and reports on two lethal emerging diseases affecting common ash and black alder in Europe. It also discusses putative resistance to the pathogen *Phytophthora alni* in natural alder stands (resistance evaluation method, frequency and levels of resistance). Estimating available resistance in *Alnus glutinosa* is a key element in predicting the future of the species in riparian forests.

Keywords: *Alnus glutinosa*, *Fraxinus excelsior*, *Salix*, plant diseases, *Phytophthora*, *Chalara*, riparian zones, riverbank protection.

2.1 Revue des principales maladies et des ravageurs des essences ligneuses rivulaires

Parmi les essences ligneuses qui peuplent les berges des cours d'eau, trois sont particulièrement représentées dans la zone qui couvre la Wallonie, le Luxembourg et le nord-est de la France : l'aulne glutineux (*Alnus glutinosa*), le frêne commun (*Fraxinus excelsior*) et les saules (*Salix* spp.). Ces essences, qui jouent un rôle majeur dans l'écosystème rivulaire, tant au niveau écologique que sociétal, peuvent être affectées par divers ravageurs (insectes et acariens) et agents pathogènes (champignons, bactéries) (Abras et al., 2008 ; Delhayé et al., 2010).

Jusqu'à la découverte du dépérissement de l'aulne causé par *Phytophthora alni*, un oomycète proche des algues bleues responsable de la mort de nombreux aulnes rivulaires en Europe (Gibbs, 1994), l'aulne glutineux était considéré comme un arbre peu sensible aux maladies et ravageurs (Claessens, 2005). Deux insectes (la galéruque de l'aulne, *Agelastica alni*, et la cécidomyie des feuilles, *Dasineura tortilis*) et deux acariens (les phytoptes galligènes, *Eriophyes inangulis* et *Eriophyes laevis*, et le phytopte de l'aulne, *Acalitus brevitarsus*), causant des dégâts foliaires, peuvent être observés occasionnellement. Plusieurs champignons provoquent aussi des dégâts foliaires et sont responsables de maladies, comme l'antracnose de l'aulne causée par *Gloeosporium* spp., la maladie des cloques causée par *Taphrina tosquinetii*, l'oïdium causé par *Erysiphe penicillata* ou la rouille causée par *Melampsorium alni*. Ces maladies ont toutefois peu d'impact sur le développement de l'arbre.

À l'instar de l'aulne, le frêne commun n'a jamais vraiment souffert d'un problème phytosanitaire majeur. La découverte de la chalarose, maladie causée par le champignon *Hymenoscyphus pseudoalbibus* identifié en 2006 en Pologne (Kowalski, 2006), a changé la situation à telle enseigne qu'aujourd'hui la sylviculture du frêne en Europe est clairement menacée. D'autres champignons pathogènes peuvent être observés sur frêne, parmi lesquels *Nectria galligena*, l'agent du chancre européen et *Phyllactinia guttata*, responsable de l'oïdium du frêne. Divers insectes sont susceptibles d'occasionner des dégâts foliaires tels le charançon du frêne (*Stereonychus fraxini*), le psylle du frêne (*Psyllopsis fraxini*) ou la cécidomyie des feuilles de frêne (*Dasineura fraxini*). Les dégâts occasionnés par ces insectes restent toutefois mineurs.

Les deux maladies majeures et émergentes à la fin du xx^e siècle sur l'aulne et le frêne causées par *Phytophthora alni* et *Hymenoscyphus pseudoalbibus*, respectivement, seront détaillées au paragraphe 2.3.

Contrairement aux deux autres essences que sont l'aulne et le frêne, les saules n'ont fort heureusement pas encore été touchés par un problème phytosanitaire majeur. L'antracnose du saule, causée par le champignon *Drepanopeziza sphaeroides*, est une

maladie assez répandue mais peu dangereuse pour l'arbre. Elle cause des chancres sur les rameaux et des déformations foliaires. Trois autres maladies cryptogamiques occasionnent des dégâts foliaires : la tavelure due à *Pollaccia saliciperda*, la rouille due à *Melampsora* spp. et l'oïdium dû à *Erysiphe adunca*. Ces maladies sont elles aussi sans gravité pour l'arbre infecté. La maladie de la goutte est une maladie plus dangereuse. Elle est causée par la bactérie *Brenneria salicis* qui induit une occlusion des vaisseaux du bois, ce qui provoque le flétrissement du feuillage et des descentes de cime. Les sujets très atteints finissent par dépérir.

2.2 Risques d'introduction de maladies liés aux interventions humaines dans les ripisylves

Parmi les principales causes d'émergence de maladies infectieuses chez les plantes figurent le changement climatique et les pratiques sylvicoles et agricoles dans 25 % et 9 % des cas, respectivement (Anderson et al., 2004). À propos des ripisylves, elles sont peu ou pas concernées par la sylviculture car l'exploitation du bois des strates arborées n'est pas très développée. Mais la cause majeure d'émergence est l'introduction de nouveaux agents pathogènes dans une zone géographique auparavant saine qui représente plus de 50 % des cas.

Le milieu ripicole est particulièrement concerné par ces risques d'introduction car c'est un écosystème fréquemment perturbé par l'activité des professionnels (gestionnaires de cours d'eau) et des non-professionnels. Les espaces à proximité des berges de rivières sont très anthropisés pour diverses raisons : terres agricoles (élevage, culture), aires de loisirs (promenade, pêche), reconstitution de la végétation par plantation. Ces interventions humaines sont autant de possibilités d'introduction d'agents pathogènes via le transport de sol, l'utilisation d'outils ou de plants contaminés. En effet, de tels exemples d'introduction ont déjà été largement décrits dans la littérature. Tjosvold et al. (2002) ont ainsi détecté *Phytophthora ramorum*, agent pathogène responsable de la mort subite du chêne aux États-Unis, dans du sol prélevé sur des chaussures de randonneurs provenant d'une zone contaminée.

Par ailleurs, l'utilisation d'outils de taille ou d'élagage crée une porte d'entrée pour le parasite dans la plante hôte. Ainsi, en Amérique centrale, le dépérissement du cacaoyer dû à *Ceratocystis fimbriata* est appelé aussi le « mal des machettes » (Semal et al., 1989).

Enfin, le risque d'introduction de maladies via le transport de plants contaminés a été clairement décrit dans le cas de l'aulne glutineux (Jung et al., 2004). En effet, les auteurs ont montré que l'infection des aulnaies ripicoles par *Phytophthora alni* en Bavière avait souvent pour origine une plantation en amont des rivières de jeunes

aulnes infectés lors de leur production en pépinière. En raison de la densité de plants, des systèmes d'irrigation et d'échanges, les pépinières sont des lieux propices à l'infection de végétaux par divers agents pathogènes où les symptômes peuvent par ailleurs être masqués, soit par des traitements phytosanitaires soit par la durée de latence de certaines maladies. Par la suite, les échanges entre pépinières au niveau national ou international, le commerce puis la plantation sont à l'origine de l'introduction des agents et parfois de leur établissement et propagation. Un autre exemple typique est encore une fois celui de *P. ramorum* aux États-Unis où il a été montré que les infections sur rhododendrons observées sur la côte Est étaient dues aux transports de plants en provenance de la côte Ouest où la maladie a été initialement détectée (Goss et al., 2009). *P. ramorum* a aussi été introduit au Canada en provenance d'Europe (Goss et al., 2011). Enfin, plus récemment, *Hymenoscyphus pseudoalbibus*, agent pathogène létal et invasif en Europe continentale, a été découvert sur frêne dans une pépinière dans le Sud de l'Angleterre en février 2012 sur des plants importés des Pays-Bas en novembre 2011 (EPPO, 2012). Dans le courant de l'année 2012, le champignon a ensuite été détecté dans divers sites de plantations d'arbres au Royaume-Uni (<http://www.forestry.gov.uk/chalara>) puis s'est propagé dans les peuplements sauvages.

Par ailleurs, les berges de cours d'eau constituent des écosystèmes particulièrement fragiles. En effet, une fois introduits, les agents pathogènes peuvent se disséminer aisément grâce aux cours d'eau qui constituent de bons vecteurs de maladie. Lutter contre un tel scénario épidémique pour un retour à un équilibre hôte/parasite devient ainsi délicat.

Dans le cas du chancre coloré du platane, Grosclaude et al. (1991) ont montré que l'inoculum produit par des arbres malades peut être véhiculé par la rivière jusqu'à une distance de plus de 100 m en une semaine, provoquant ainsi l'infection des arbres sains situés en aval. Les auteurs concluent que le transport des propagules infectieuses est vraisemblablement le fait du courant d'eau, ou alors de la faune ripicole et aquatique (rongeurs, poissons, batraciens). Aujourd'hui, l'Union Européenne a mis en place des réglementations draconiennes pour limiter cette maladie.

Un autre exemple remarquable décrit par Jules et al. (2002) est la dissémination de *Phytophthora lateralis*, agent pathogène de *Chamaecyparis lawsoniana*, dans les ripisylves en Oregon (États-Unis). Les auteurs ont retracé et cartographié l'historique de l'infection des arbres localisés au bord des cours d'eau sur une période de 15 ans par dendrochronologie des arbres morts. Dans 72 % des cas, les événements infectieux avaient pour origine géographique les jonctions entre les routes ou chemins et les ruisseaux. Les véhicules, et notamment les engins utilisés pour l'exploitation forestière, ont transporté l'inoculum qui, déposé au niveau de ces jonctions, s'est disséminé ensuite dans l'eau de rivière contaminant ainsi les arbres situés en aval.

Les auteurs ont montré que le déplacement de sol contaminé par l'homme ou par les animaux participait aussi au dépôt d'inoculum de *P. lateralis*.

Ainsi, la ripisylve constitue un écosystème particulièrement fragile, car sous la menace élevée à la fois d'introduction d'agents pathogènes et de leur dissémination facilitée par les voies naturelles et humaines. Les programmes de renaturation des cours d'eau s'avérant indispensables pour l'écologie, la qualité de l'eau et la biodiversité de la flore et de la faune, la vigilance est cruciale pour éviter toute catastrophe épidémique. Concernant les plantations, cela passe par une surveillance sans faille de la qualité des plants par l'ensemble de la filière professionnelle, de la production des plants à leur installation, et par des contrôles accrus à une échelle internationale lors de leur transport.

2.3 Deux exemples de maladies émergentes et invasives en ripisylve sur aulne et frêne

2.3.1 La charlarose du frêne

Au cours des années 1990, des dépérissements de frêne commun (*Fraxinus excelsior*) ont été observés en Pologne. Le champignon pathogène responsable de cette maladie émergente en Europe a été isolé en 2006 puis nommé *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (anamorphe *Chalara fraxinea*) (Kowalski, 2006 ; Husson et al., 2011 ; Queloz et al., 2011). Il affecte le frêne commun (*F. excelsior*) et le frêne à petites feuilles (*F. angustifolia*), aussi bien les semis que les arbres adultes. Il se développe en milieu forestier, mais aussi sur les frênes rivulaires et d'alignement en milieu urbain ou le long des routes. À l'exception de quelques arbres qui semblent résistants à la maladie et qui représentent moins de 5 % selon une étude menée au Danemark (Mac Kinney et al., 2011), les arbres infectés finissent par dépérir. Des études de génétique des populations de *H. pseudoalbidus* et de sa pathogénicité montrent clairement qu'il s'agit d'un parasite introduit et invasif en Europe dont l'origine est probablement asiatique (Husson et al., 2011 ; Gross et al., 2012a ; Zhao et al., 2013).

Le champignon se disperse à courte distance par le vent entre juin et octobre via les ascospores, spores libérées de pézizes (fructification sexuée) présentes sur les rachis de feuilles dans la litière et qui constituent l'essentiel de l'inoculum (Timmermann et al., 2011 ; Gross et al., 2012b). Sur les jeunes rameaux (semis, rejets de souche, extrémités de branches), le champignon induit des nécroses sur les folioles et les pétioles. En été, ceux-ci flétrissent puis noircissent mais restent attachés aux rameaux (**Figure 2.1**). Le champignon provoque aussi des nécroses corticales de teinte brune ou orangée, souvent de forme anguleuse, facilement

observables après la chute des feuilles en automne et en hiver (**Figure 2.2A**). En section transversale, le bois des jeunes branches prend une teinte brune (**Figure 2.2B**). Sur les arbres adultes, en début d'infection, des rameaux morts sont visibles à l'extrémité du houppier (**Figure 2.3A**). Par la suite, des mortalités de branches plus importantes sont observées et de nombreux gourmands sont produits, donnant à la couronne une forme colonnaire caractéristique (**Figure 2.3B**). Enfin, sur les arbres très infectés, des chancres et nécroses souvent cachés par la mousse apparaissent à la base de l'arbre (**Figure 2.4**) (Husson et al., 2012).

La maladie a été observée en France dès 2008 (Ioos et al., 2009). Une surveillance menée en Belgique depuis 2009 a permis de l'identifier pour la première fois en 2010 (Chandelier et al., 2011). Depuis, la maladie s'est largement répandue en Belgique. En France, elle est présente dans tout le quart Nord-Est.

Actuellement, il n'existe pas de moyen de lutte efficace contre ce champignon. En site infecté, il est conseillé de n'abattre que les arbres présentant un déficit foliaire de plus de 50 % ou ceux avec des nécroses au collet. Les arbres peu infectés resteront sur pied pour éviter de déstabiliser les peuplements ou de détruire les individus potentiellement résistants. En effet, McKinney et al. (2011) ont estimé à environ 5 % le pourcentage d'arbres sans symptômes dans les zones infectées. Bien que ce taux soit très faible, il pourrait être suffisant pour un maintien de l'espèce par sélection naturelle ou artificielle. À titre préventif, il est nécessaire de limiter les risques d'introduction du champignon dans des zones encore indemnes. À cet égard, le transport de grumes et de plants de zones contaminées vers des zones saines (dispersion à longue distance) sont à éviter. D'une façon générale, la plantation de frêne est aujourd'hui déconseillée. D'un point de vue sylvicole, il est vivement recommandé d'éviter les frênaies pures et de privilégier, au contraire, les mélanges d'essences.

2.3.2 Le dépérissement de l'aulne causé par *Phytophthora alni*

Au début des années 1990, un dépérissement massif d'aulnes glutineux a été observé le long des cours d'eau en Angleterre. Par la suite, il a été détecté dans de nombreux pays européens. L'agent pathogène primaire responsable de cette maladie létale a été isolé à partir de racines, de bois et de sol et nommé en 2004 *Phytophthora alni* (Brasier et al., 2004).

Ce parasite tellurique attaque le système racinaire des arbres qui conduit à un dépérissement du houppier (**Figure 2.5**). Les feuilles sont plus petites, jaunissantes, et le feuillage est clairsemé (**Figure 2.6**). L'agent affecte aussi la base des troncs où apparaissent des nécroses de couleur noire à brun-rouille d'où suintent parfois des exsudats goudronneux (**Figures 2.7A, 2.7B et 2.7C**) (Streito, 2003).



Figure 2.1. Symptôme foliaire de la chararose sur frêne.

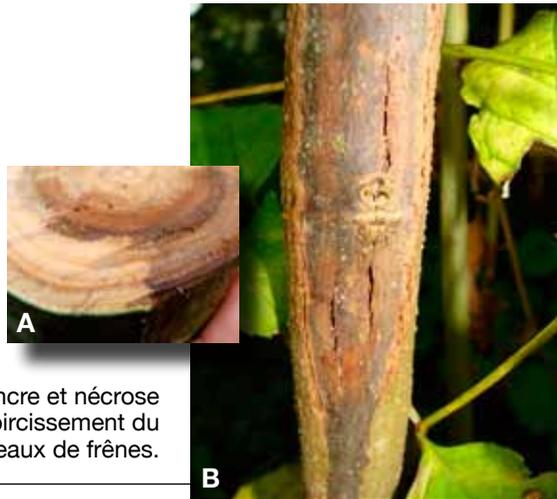


Figure 2.2. Chancre et nécrose corticale (A) et noircissement du bois (B) sur rameaux de frênes.



Figure 2.3. Mortalité des extrémités de rameaux dans le houppier de frêne adulte (A) et production de gourmands sur le tronc (B).



Figure 2.4. Chancre et nécrose au collet de frêne adulte.



Figure 2.5. Dépérissement du houppier d'aulnes (à droite) en ripisylve.



Figure 2.6. Éclaircissement et jaunissement du feuillage d'aulnes.



Figure 2.7. Nécroses corticales de couleur rouille à noirâtre au collet d'un aulne adulte (A), d'un aulne jeune (B) et lésions sous-corticales en forme de flamme (C).

Figures 2.1 à 2.4 : photographies CRA-W, Belgique et Figures 2.5 à 2.7 : photographies INRA Nancy, France.

Ces symptômes ne sont pas typiques et seul un isolement mycologique ou une détection moléculaire permettent de confirmer sa présence. Toutefois, une fois détecté, il est généralement acquis que le dépérissement des arbres voisins en bordure du même cours d'eau et présentant les symptômes ci-dessus sont dus à *P. alni*.

La maladie est très présente en Lorraine et en Wallonie où 17% et 28%, respectivement, des aulnes sont estimés dépérissants au début des années 2000 (Debruxelles et al., 2003; Thoirain et al., 2007).

Cet agent pathogène est spécifique du genre *Alnus*. En Europe, *P. alni* est pathogène sur les quatre espèces endémiques, *A. glutinosa* (aulne commun ou glutineux), *A. cordata* (aulne de Corse ou d'Italie), *A. incana* (aulne blanc), *A. viridis* (aulne vert) mais les dépérissements sont particulièrement sévères sur l'aulne glutineux en raison de sa forte sensibilité et de son écologie (Santini et al., 2003). En effet, la maladie est très inféodée aux berges de cours d'eau de plaines ou moyenne montagne où cette espèce est très omniprésente. Il a été montré que la prévalence de la maladie est plus faible dans les peuplements d'aulnes éloignés des berges (Gibbs et al., 1999).

La présence d'eau permet au parasite, d'une part la formation de spores appelées zoospores et, d'autre part, la dissémination de celles-ci grâce au courant et à leur flagelle qui les rendent motiles. Ainsi la maladie se propage vers l'aval. *P. alni* est aussi présent dans le sol à proximité des arbres malades. Par conséquent, le sol contaminé transporté par les animaux ou l'homme (véhicules, chaussures) est un vecteur potentiel.

Le genre *Alnus* est sensible à un complexe de 3 taxons de *P. alni* : *P. alni* subsp. *uniformis* (Pau), *P. alni* subsp. *multiformis* (Pam) et *P. alni* subsp. *alni* (Paa) qui est un hybride entre Pau et Pam (Brasier et al. 2004; loos et al., 2006). Les deux espèces parentales ont été isolées à partir de nécroses d'aulnes. Pour autant, elles ne sont pas associées aux dépérissements : en effet, elles sont très rares et leur plus faible pathogénicité a été confirmée par des tests d'inoculation en conditions contrôlées (Brasier et al., 2001). Les analyses de diversité et de structure génétique de Pau ont montré que cette espèce est exotique en Europe. La date de son introduction n'est pas connue, ni son origine géographique, mais il est fort possible qu'elle soit originaire de la côte Ouest de l'Amérique du Nord où elle a été isolée sur *A. rubra* et *A. incana* et où, d'après la structure génétique de ses populations, elle serait indigène (Aguayo et al., 2013). La caractérisation génétique de Pam amène à conclure qu'il s'agit aussi d'une espèce hybride mais son origine reste inconnue. L'émergence du dépérissement des aulnes serait donc en partie due à l'introduction de Pau, qui en s'hybridant avec Pam, a formé une nouvelle espèce très agressive sur l'aulne glutineux, Paa, qui s'est rapidement disséminée en Europe (Aguayo et al., 2013).

Grâce à la mise au point d'une méthode de quantification de *P. alni* dans le sol (Elegbede et al., 2010), il a été possible de suivre la dynamique saisonnière de l'inoculum. Globalement, la quantité du pathogène est élevée en juin puis chute en été et en automne et est à son niveau le plus faible en hiver. En effet, *P. alni* ne présente pas de propagules de survie (oogones peu viables et absence de chlamydozoospores) (Delcan et al., 2001). Lorsque les conditions sont défavorables (température basse), le pathogène survit mal et la quantité d'inoculum chute fortement.

Par ailleurs, des suivis épidémiologiques pluriannuels de parcelles d'aulnes infectées en Alsace-Lorraine et en Charente (France) montrent que la température moyenne hivernale a un impact fort sur l'incidence de la maladie (Aguayo, 2012). Ainsi, lorsque les hivers sont doux, la survie de *P. alni* est maintenue et on observe une recrudescence d'arbres malades au cours de la saison de végétation. Au contraire, les hivers froids font chuter l'inoculum et engendrent chez l'aulne des taux de guérison élevés. Par ailleurs, on constate que des températures estivales élevées augmentent le taux de guérison (Aguayo, 2012). Cette corrélation est plus difficile à expliquer. Les températures moyennes de l'été pourraient avoir un impact sur l'état physiologique des arbres ou sur le type de communautés microbiologiques présentes qui interagissent avec *P. alni* dans les sols et l'eau de rivière. Bien que la température hivernale moyenne ait augmenté ces dernières années, il n'est pas possible d'expliquer l'émergence de la maladie dans le Nord-Est de la France par le réchauffement climatique que la région a subi depuis le début des années 1990. L'introduction d'une des espèces parentales puis la récurrence des hybridations qui ont formé l'espèce *P. alni* semblent les principales causes de l'émergence de la maladie (Aguayo et al., 2013). D'autres facteurs environnementaux semblent favorables à l'apparition de nécroses au collet des arbres : il s'agit du pH du sol, avec un optimum vers 6-7, et de la vitesse du courant. Les rivières avec un courant lent présentent une incidence plus élevée de chancre sur tronc, probablement en raison d'un dépôt de zoospores facilité au collet des arbres (Aguayo, 2012).

Les études d'impact de la maladie sur la démographie sont suivies en Lorraine depuis 10 ans. Les aulnes de tous âges sont sensibles à l'agent pathogène, cependant, les analyses de survie montrent que le développement de la maladie dépend de la taille des arbres. Concernant les jeunes semis, le temps médian entre l'apparition de symptômes et sa mort est de 4 ans. Chez les arbres adultes, ce temps est de plus de 10 ans. Par ailleurs, sur un site le long de la Sarre en Lorraine, on observe que les mortalités ne sont pas compensées par le recrutement de jeunes semis d'aulne, espèce pourtant capable de se régénérer aisément. Ainsi, bien que la surface terrière augmente sur ce site, le nombre total d'arbres diminue depuis 2006 et l'avenir de l'aulne pourrait à long terme être remis en cause.

À ce jour, il n'y a pas de méthode de lutte curative mise au point. Il a été montré que le recépage d'arbres infectés pouvait induire des rejets de souches vigoureux

et sains (Webber et al., 2004). Pour autant, ceux-ci ne sont pas à l'abri de nouvelles contaminations. Par ailleurs, l'impact du recépage sur la quantité d'inoculum dans le sol n'est pas connu. Il est peu probable que l'agent pathogène soit éliminé du système racinaire des arbres recépés. Par ailleurs, Elegbede et al. (2010) a montré qu'il existe de nombreux arbres asymptomatiques qui sont de grands producteurs de propagules infectieuses et que plus les arbres sont dépérissants, moins ils produisent de l'inoculum. Ainsi, il paraît peu probable de faire chuter la population de *P. alni* par la pratique du recépage. Toutefois, des expérimentations de recépages sont en cours en Wallonie pour voir si à l'échelle d'un peuplement le taux de maladie peut diminuer à moyen ou long terme. Pour limiter le dépérissement à l'échelle d'un bassin versant et contenir l'épidémie, seule la lutte préventive est aujourd'hui préconisée. Cela passe par des actions qui enrichissent la diversité des espèces ripicoles tout en réduisant les risques d'introduction dans les zones saines via des contrôles sanitaires des flux de végétaux et sols vers les berges de rivières.

2.4 Recherches de résistance chez l'aulne glutineux vis-à-vis de *Phytophthora alni*

Hormis l'apport de nouvelles connaissances sur l'épidémiologie et la dynamique spatio-temporelle de la maladie, des expérimentations ont été mises en place, d'une part, pour mettre au point des méthodes d'inoculation pour évaluer de façon fiable la sensibilité des aulnes et, d'autre part, pour savoir s'il existe de la résistance envers *P. alni* parmi les populations naturelles. L'évaluation de cette résistance constitue un élément clé pour prédire l'avenir des aulnes en milieu naturel.

2.4.1 Mise au point de méthodes d'évaluation de la sensibilité d'aulnes glutineux à *P. alni*

□ Choix de la méthode

En vue de développer une méthode d'évaluation de la sensibilité d'aulnes glutineux envers *P. alni*, plusieurs paramètres ont été testés parmi lesquels la période la plus propice à l'infection, le tissu inoculé en association avec la méthode d'inoculation et le critère mesuré pour estimer la sensibilité. La période de juin à septembre s'est avérée être la plus efficace, les aulnes glutineux développant peu, voire pas, de symptômes en dehors de cette période. La mesure de la longueur de nécrose sur rameaux détachés ou sur tiges de jeunes plants après inoculation corticale (mise en contact de l'agent pathogène avec le cambium) n'ont pas donné de résultats fiables (voir ci-dessous).

Par contre, des tests d'inoculation simulant les conditions naturelles d'infection par voie racinaire (immersion dans de l'eau de rivière infectée de boutures enracinées ou de semis de moins de 2 ans en racines nues) ont permis de montrer que le taux de survie était un paramètre donnant des résultats reproductibles dans le temps (données sur 2 ans pour 23 géotypes d'aulnes glutineux). La méthode développée a permis de montrer qu'il existait des différences de comportement de l'aulne glutineux à l'égard de *P. alni*. En outre, des aulnes très sensibles à la maladie et des aulnes tolérants ont été identifiés. Ces arbres ont été clonés et pourront servir d'arbres de référence lors de tests d'évaluation futurs.

❑ Remise en cause des tests sur rameaux détachés

Les méthodes d'inoculation sur organes détachés, feuilles ou rameaux, sont classiquement utilisées pour tester la sensibilité des arbres envers les espèces de *Phytophthora* (Brasier et al., 2001 ; Denman et al., 2005). Des rameaux de l'année n-1 prélevés sur 79 clones différents ont été inoculés par blessure et apport d'un fragment de mycélium d'isolats de *P. alni* en 2011. Le critère de sensibilité retenu était la longueur de nécroses mesurées 7 à 8 jours après inoculation. Le test de Fisher a montré des effets clones, isolats et diamètres du rameau sur la longueur de nécrose ($P < 0,001$; $0,001$ et $0,004$, respectivement). Toutefois, il n'a pas été possible d'établir de lien entre la longueur de nécrose et le comportement en milieu naturel des clones testés, comportement connu depuis 8 ans et estimé par la note moyenne de dépérissement du houppier les années suivant la date de premiers dépérissements. Des résultats similaires ont été obtenus en 2010 à partir de rameaux de l'année n provenant de 35 clones. Bien que les individus présentaient des longueurs de nécrose variables ($P < 0,004$), il n'y avait aucune corrélation significative entre cette longueur et la probabilité de l'individu à dépérir en milieu naturel.

Par ailleurs, la mesure de la taille de nécroses sur rameaux détachés s'est révélée être un critère de sensibilité peu reproductible. En effet, des expérimentations portant sur une vingtaine de clones inoculés à deux reprises, soit la même année (en début d'été et en fin d'été) soit le même mois sur deux années successives, ont montré une faible corrélation ($r = 0,50$; $P < 0,001$) ou une absence de corrélation ($r = 0,20$; $P > 0,05$), respectivement. Deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats : la méthode d'inoculation sur rameaux n'est pas adaptée à la détermination d'un seuil de sensibilité car pas assez proche des conditions naturelles d'infection ou alors la résistance des aulnes est trop peu variable par rapport aux autres facteurs qui expliquent leur niveau d'infection en milieu naturel.

2.4.2 Recherche d'aulnes tolérants à *P. alni* dans des semis sélectionnés et non sélectionnés

Des tests d'infection en conditions contrôlées proches des conditions naturelles (méthode développée ci-dessus) ont été réalisés sur de jeunes semis d'aulnes (6326 semis âgés de 7-8 mois) correspondant pour plus d'une moitié d'entre eux à la descendance F2 d'arbres sans symptômes situés en zone contaminée, et pour l'autre moitié à des graines d'arbres non sélectionnés pour leur phénotype (graines provenant du Comptoir à Graines de Marche-en-Famenne, Belgique). Les plants ont été soumis à deux inoculations à 1 an d'intervalle. Un premier lot de 1607 plants a été évalué en 2009 et 2010 et un second lot de 4719 plants a été évalué en 2010 et 2011 (**Tableau 2.1**).

Aucune différence significative n'a été constatée entre les deux catégories d'individus (descendance F2 d'arbres sans symptômes en zone contaminée et descendance d'arbres non sélectionnés) en ce qui concerne les proportions d'arbres survivants et d'arbres morts après inoculation (test χ^2 , $P = 0,969$).

Tableau 2.1. Test de sensibilité à *P. alni* par inoculation du système racinaire de semis d'aulnes.

Date de semis	Nombre de plants	Première inoculation		Seconde inoculation		% survie après deux inoculations
		Date	% survie	Date	% survie	
janvier 2009	1 607	été 2009	26,5	été 2010	40	10,6
janvier 2010	4 719	été 2010	22,3	été 2011	30,2	6,7

Les plants ayant survécu aux deux inoculations et ne montrant aucun symptôme de la maladie (moins de 15 % pour chaque sélection) ont été replantés le long des berges de trois cours d'eau en Wallonie (Province de Luxembourg) et dans le Nord-Est de la France en mélange avec des plants non sélectionnés en vue d'évaluer, au cours des cinq prochaines années, leur tolérance à la maladie en conditions naturelles d'infection.

2.5 Conclusion

Le dépérissement des aulnes est maintenant constaté depuis une vingtaine d'années en Europe et de nombreux individus sont morts. Pour mieux appréhender l'avenir des aulnes en ripisylve, il est nécessaire de connaître la pression de sélection exercée par *P. alni* sur l'aulnaie. En effet, s'il existe de la variabilité dans la résistance

envers le pathogène, il est possible que les aulnes les plus sensibles aient été éliminés au cours du temps et que la population survivante soit naturellement plus résistante. Pour y répondre, il serait nécessaire de comparer la sensibilité d'aulnes recrutés à l'état de semis il y a une dizaine d'années et ne présentant depuis aucun symptôme de maladie à celle des aulnes recrutés aléatoirement aujourd'hui à proximité, c'est-à-dire sous l'influence des mêmes conditions naturelles d'infection. Cette perspective passe par un clonage d'individus des deux populations, un élevage de plants et une série d'inoculations probablement par immersion racinaire.

Remerciements

Les recherches présentées dans ce chapitre ont été menées dans le cadre du projet Interreg IV-A Grande Région/ECOLIRIMED soutenu financièrement par le FEDER, le Service Public de Wallonie et la Région Lorraine.

Les auteurs remercient F. Fauche pour son implication technique.

2.6 Bibliographie

- Abras S., Fassotte C., Chandelier A. & Cavelier M., 2008. *Guide des principales maladies et ravageurs des essences ligneuses des milieux rivulaires en Wallonie*. Gembloux, Belgique : CRAW – DGRNE.
- Aguayo J., 2012. *Étude des conditions d'émergence de Phytophthora alni sur l'aulne glutineux*. Thèse de doctorat : Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.
- Aguayo J. et al., 2013. Strong genetic differentiation between North American and European populations of *Phytophthora alni* subsp. *uniformis*. *Phytopathology*, **103**, 190-199.
- Anderson P.K. et al., 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol. Evol.*, **19**, 535-544.
- Brasier C.M. & Kirk S.A., 2001. Comparative aggressiveness of standard and variant hybrid alder *Phytophthora*s, *Phytophthora cambivora* and other *Phytophthora* species on bark of *Alnus*, *Quercus* and other woody hosts. *Plant Pathol.*, **50**, 218-229.
- Brasier C.M. et al., 2004. *Phytophthora alni* sp. nov. and its variants: designation of emerging heteroploid hybrid pathogens spreading on *Alnus* trees. *Mycol. Res.*, **108**, 1172-1184.
- Chandelier A., Delhay N. & Helson M., 2011. First report of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (anamorph *Chalara fraxinea*) on *Fraxinus excelsior* in Belgium. *Plant Dis.*, **95**, 220.
- Claessens H., 2005. *L'aulne glutineux, ses stations et sa sylviculture*. Namur, Belgique : Forêt Wallonne asbl.

- Debruxelles N., De Merlier D. & Dufays E., 2003. *La maladie de l'aulne. Que faire ?* Fiche d'information sur la maladie de l'aulne. Namur, Belgique : DGRNE.
- Delcan J. & Brasier C.M., 2001. Oospore viability and variation in zoospore and hyphal tip derivatives of the hybrid alder *Phytophthora*. *Forest Pathol.*, **31**, 65-83.
- Delhaye N., Abras S., Chandelier A. & Fassotte C., 2010. *Guide visuel des bioagresseurs potentiels des ligneux rivulaires en Wallonie*. Namur, Belgique : DGRNE.
- Denmam S., Kirk S.A., Brasier C.M. & Webber J.F., 2005. *In vitro* leaf inoculation studies as an indication of tree foliage susceptibility to *Phytophthora ramorum* in the UK. *Plant Pathol.*, **54**, 512-521.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 2012. *EPPO Reporting Service*, 4, 2012/080.
- Elegbede C.F. et al., 2010. A statistical model to detect asymptomatic infectious individuals with an application in the *Phytophthora alni*-induced Alder decline. *Phytopathology*, **100**, 1262-1269.
- Gibbs J., 1994. *Phytophthora* root disease of common alder. *Forestry Commission Information Note*, **258**.
- Gibbs J.N., Lipscombe M.A. & Peace A.J., 1999. The impact of *Phytophthora* disease on riparian populations of common alder (*Alnus glutinosa*) in southern Britain. *Eur. J. Forest Pathol.*, **29**, 39-50.
- Goss E.M. et al., 2009. Population genetic analysis infers migration pathways of *Phytophthora ramorum* in US nurseries. *PLoS Pathog.* **5**, e1000583.
- Goss E.M. et al., 2011. *Phytophthora ramorum* in Canada: Evidence for migration within North America and from Europe. *Phytopathology*, **101**, 166-171.
- Grosclaude C., Olivier R., Pizzuto J.C. & Romiti C., 1991. Étude expérimentale du transport de l'inoculum de *Ceratocystis fimbriata* f. *platani* par l'eau d'une rivière. *Eur. J. Forest Pathol.*, **21**, 168-171.
- Gross A., Grünig C.R., Queloz V. & Holdenrieder O., 2012a. A molecular toolkit for population genetic investigations of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Forest Pathol.*, **42**, 252-264.
- Gross A., Zaffarano P.L., Duo A. & Grünig C.R., 2012b. Reproductive mode and life cycle of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Fungal Genet. Biol.*, **49**, 977-986.
- Husson C. et al., 2011. *Chalara fraxinea* is an invasive pathogen in France. *Eur. J. Plant Pathol.*, **130**, 311-324.
- Husson C. et al., 2012. Occurrence of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on infected ash logs. *Plant Pathol.*, **61**, 889-895.
- Ioos R., Kowalski T., Husson C. & Holdenrieder O., 2009. Rapid in planta detection of *Chalara fraxinea* by real time PCR assay using dual-labeled probe. *Eur. J. Plant Pathol.*, **125**, 329-335.

- Ioos R., Andrieux A., Marçais B. & Frey P., 2006. Genetic characterization of the natural hybrid species *Phytophthora alni* as inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses. *Fungal Genet. Biol.*, **43**, 511-529.
- Jules E., Kauffman M., Ritts W. & Carroll A., 2002. Spread of an invasive pathogen over a variable landscape: a nonnative root rot on Port Oxford cedar. *Ecology*, **83**, 3167-3181.
- Jung T. & Blaschke M., 2004. *Phytophthora* root and collar rot of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. *Plant Pathol.*, **53**, 197-208.
- Kowalski T., 2006. *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. *Forest Pathol.*, **36**, 264-270.
- McKinney L.V., Nielsen L.R., Hansen J.K. & Kjær E.D., 2011. Presence of natural genetic resistance in *Fraxinus excelsior* (Oleraceae) to *Chalara fraxinea* (Ascomycota): an emerging infectious disease. *Heredity*, **106**, 788-797.
- Queloz V. et al., 2011. Cryptic speciation in *Hymenoscyphus albidus*. *Forest Pathol.*, **41**, 133-142.
- Santini A., Barzanti G.P. & Capretti P., 2003. Susceptibility of some mesophilic hardwoods to alder *Phytophthora*. *J. Phytopathol.*, **151**, 406-410.
- Semal J. et al., 1989. *Traité de pathologie végétale*. Gembloux, Belgique : Presses agronomiques de Gembloux.
- Streito J.C., 2003. *Phytophthora* disease of alder: Identification and distribution. In: Gibbs J.N., van Dijk C. & Webber J., eds. *Phytophthora disease of Alder in Europe*. London, HMSO: Forestry Commission. Bulletin **126**, 25-38.
- Thoirain B., Husson C. & Marçais B., 2007. Risk factors for the *Phytophthora*-induced decline of Alder in Northeastern France. *Phytopathology*, **97**, 99-105.
- Timmermann V. et al., 2011. Ash dieback: pathogen spread and diurnal patterns of ascospore dispersal, with special emphasis on Norway. *EPPO Bulletin*, **41**, 1-7.
- Tjosvold S.A., Chambers D.L., Davidson J.M. & Rizzo D.M., 2002. Incidence of *Phytophthora ramorum* inoculum found in soil collected from a hiking trail and hikers' shoes in a California park. First Sudden Oak Death Science Symposium, 15-18 September, 2002, Monterey, USA.
- Webber J., Gibbs J. & Hendry S., 2004. *Phytophthora* Disease of Alder. *Forestry Commission Information Note*, **6**.
- Zhao Y. et al., 2013. *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the correct name for *Lambertella albidus* reported from Japan. *Mycotaxon*, **122**, 25-41.

Évaluation par marqueurs moléculaires microsatellites de la diversité d'une collection d'aulnes glutineux provenant de Wallonie (Belgique), de Lorraine (France) et du Grand-Duché du Luxembourg

Mingeot Dominique, Husson Claude,
Mertens Patrick, Druart Philippe

Résumé

Quatorze marqueurs microsatellites ont été utilisés afin de génotyper une collection (149 individus) d'aulnes glutineux (*Alnus glutinosa*) collectés dans la zone transfrontalière couvrant la Wallonie (Belgique), la Lorraine (France) et le Grand-Duché du Luxembourg. Les objectifs poursuivis étaient de disposer d'un outil de gestion et de traçabilité de la collection, de caractériser la diversité présente dans la région et de caractériser la diversité de la collection en regard de la diversité présente dans un peuplement issu de la même région. La probabilité de trouver deux génotypes différents qui ne soient pas discriminés varie de $7,5 \cdot 10^{-1}$ à $6,2 \cdot 10^{-3}$ en fonction du marqueur utilisé avec une probabilité d'identité combinée de $1,4 \cdot 10^{-14}$ pour l'ensemble des 14 marqueurs. Ces marqueurs constituent donc un outil de discrimination performant. Nous montrons par ailleurs que trois de ces marqueurs suffisent à distinguer 99 cépées d'aulnes issues des bords d'un cours d'eau et à mettre en évidence des erreurs d'identification visuelle de ces cépées. Les marqueurs microsatellites utilisés mettent en évidence une grande diversité allélique au sein de la collection avec un total de 176 allèles détectés; le nombre d'allèles par marqueur variant de 2 à 31. Le taux d'hétérozygotes observé dans la collection varie de 0,149 à 0,845 en fonction du marqueur. L'utilisation du même groupe de 14 marqueurs sur un peuplement (25 arbres testés) issu de la même région montre que les allèles les plus fréquents sont identiques et que la fréquence de ces allèles ne diffère pas significativement entre la collection et la population; l'assortiment allélique de la collection est donc représentatif de celui d'un peuplement de la région considérée.

Mots-clés : *Alnus glutinosa*, microsatellite, SSR, diversité génétique.

Assessment by microsatellite markers of the diversity of a black alder collection from Wallonia in Belgium, Lorraine in France and the Grand Duchy of Luxembourg

Fourteen microsatellite markers were used to identify genotypes in a collection of 149 black alders (*Alnus glutinosa*) from an area covering Wallonia in Belgium,

Lorraine in France and the Grand Duchy of Luxembourg. The objectives were to provide a tool for managing the collection and tracing the trees, to characterize black alder diversity in the region and to compare the diversity of the collection with the diversity of a population from the same region. The probability of identity varied from $7.5 \cdot 10^{-1}$ to $6.2 \cdot 10^{-3}$, depending on the marker used, with a combined probability of $1.4 \cdot 10^{-14}$ for the 14 markers used simultaneously. These markers therefore proved to be a powerful tool for distinguishing black alder genotypes. Three of the markers were enough to discriminate 99 coppiced alder stools from a riverbank and highlight visual identification errors within these coppices. The microsatellite markers revealed high allelic diversity, with 176 alleles detected in the collection and the number of alleles per microsatellite locus ranging from 2 to 31. The observed heterozygosity of the collection ranged from 0.149 to 0.845, depending on the marker. An analysis of an alder population (25 trees tested) from the same region using the same microsatellite markers revealed close similarity among the most frequent alleles and no significant difference in frequency between the clonal collection and the population. This result showed that the allelic diversity of the collection was representative of a natural population from the same region.

Keywords: *Alnus glutinosa*, microsatellites, SSR, genetic diversity.

3.1 Introduction

L'aulne glutineux [*Alnus glutinosa* L. Gaertn.] est une espèce ligneuse appartenant à la famille des Betulaceae (sous-famille des Betuloideae). C'est une espèce allogame, à pollinisation anémophile, particulièrement adaptée aux sites humides. L'aulne glutineux fait l'objet d'un intérêt croissant en tant qu'espèce pionnière améliorant le sol ainsi que de par son rôle bénéfique pour l'écosystème rivière et la stabilisation des berges. Toutefois, depuis le début des années 1990, l'aulne glutineux est mis en danger par une maladie causée par l'Oomycète *Phytophthora alni*, responsable de forts taux de dépérissements et de mortalités en Europe (Gibbs et al., 1999; Thoirain et al., 2007; Chandelier et al., 2013).

Dans le cadre de programmes de revégétalisation des cours d'eau mis en place en Wallonie (Belgique) en Lorraine (France) et au Grand-Duché du Luxembourg, une collection d'aulnes glutineux a été constituée (projets Interreg III [ECOLIRI] et IV-A [ECOLIRIMED]) comme source d'approvisionnement en arbres de provenances autochtones et en vue de prévenir la perte de diversité potentielle liée à *Phytophthora alni* (Druart et al., 2013).

L'utilisation de marqueurs constitue un outil précieux de gestion de ce type de collection en permettant, entre autres, l'évaluation de la diversité de la collection et la détection de doublons éventuels ainsi que la traçabilité des arbres clonés et multipliés. L'objectif de ce travail était de mettre au point l'utilisation de marqueurs

moléculaires de type microsatellite sur l'aulne glutineux et de caractériser la collection à l'aide de ces marqueurs.

Les marqueurs morphologiques ont été longtemps les seuls marqueurs utilisés en génétique forestière. Ces marqueurs, outre leur nombre limité, sont souvent dominants et peu polymorphes. De plus, leur observation dépend du stade de développement de l'arbre et de la saison. Les années 1970 ont vu apparaître l'utilisation de marqueurs biochimiques (isozymes) permettant de révéler le polymorphisme des séquences de certaines protéines. Plus polymorphes que les marqueurs morphologiques, les isozymes restent toutefois peu nombreux et dépendants de l'expression de la protéine. Enfin, depuis le début des années 1980, l'essor des techniques de biologie moléculaire a permis le développement de marqueurs permettant de détecter du polymorphisme au niveau de l'ADN. Ces marqueurs moléculaires présentent l'avantage d'exister en nombre potentiellement illimité et d'être utilisables à partir de n'importe quel organe végétal indépendamment de la saison et du stade de développement de l'arbre. Certains de ces marqueurs sont en outre hautement polymorphes.

Il existe différentes techniques de marquage moléculaire correspondant à différents types de polymorphisme de l'ADN (Kumar et al., 2009 pour une synthèse). La plupart de ces techniques reposent sur l'amplification PCR (Polymerase Chain Reaction) d'une séquence d'ADN. La RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) et les microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeats) constituent les techniques les plus utilisées. La RAPD et l'AFLP ne nécessitent pas de connaissance préalable du génome et peuvent donc s'appliquer à n'importe quelle espèce; ces marqueurs présentent toutefois l'inconvénient d'être généralement dominants et la reproductibilité des marqueurs RAPD peut poser problème. Les microsatellites sont, quant à eux, co-dominants, reproductibles et souvent très polymorphes. Leur développement est toutefois laborieux et coûteux : l'amplification d'une séquence microsatellite nécessite la connaissance préalable des séquences d'ADN adjacentes. Toutefois, la possibilité de transférer l'utilisation de microsatellites d'une espèce à une autre, voire d'un genre à un autre a été démontrée à maintes reprises (Kalia et al., 2011 pour une synthèse). La proportion de microsatellites permettant ce transfert varie en fonction de la distance génétique entre les espèces considérées.

Les applications potentielles des marqueurs moléculaires sont multiples, que ce soit dans le cadre de la gestion de collections de ressources génétiques, dans l'estimation de différents paramètres en génétique des populations (diversité génétique, flux de gènes, différenciation entre populations...) ou encore dans le cadre d'études phylogéographiques ou dans l'étude des relations phylogénétiques entre espèces (Agarwal et al., 2008 pour une synthèse).

L'aulne glutineux a fait l'objet d'un faible nombre d'études de diversité génétique. Sur base de l'observation de caractères physiologiques et morphologiques, des différenciations entre populations européennes d'aulnes ont été mises en évidence par différents auteurs. Ainsi, une variation clinale entre populations d'aulnes du Sud et du Nord de l'Angleterre a été mise en évidence par McVean (1953) du point de vue de la taille et de la forme des feuilles et des chatons ainsi que de la date de chute des feuilles à l'automne. De Wald et al. (1986) ont quant à eux mis en évidence des variations au niveau de la date de débournement et de la tolérance au froid de semis d'aulnes effectués aux États-Unis à partir de semences provenant de 48 populations représentatives de l'aire de distribution de l'aulne glutineux en Europe. Une étude portant sur des caractères adaptatifs (croissance juvénile, tolérance au froid...) sur des populations d'aulnes en Lituanie a permis de mettre en évidence une plasticité phénotypique importante mais une différenciation faible entre populations si ce n'est au niveau du débournement (Pliūra, 2004).

Des marqueurs isoenzymatiques ont été utilisés afin d'étudier la différenciation de populations d'aulnes. Ainsi, l'utilisation de 10 marqueurs protéiques sur des arbres issus de trois populations slovaques a montré une différenciation inter-populations très faible bien que des différences significatives de fréquences alléliques soient mises en évidence entre populations (Gömöry et al., 2002). Une forte différenciation entre populations originaires de différentes régions d'Europe a par contre été mise en évidence par Prat et al. (1992) à l'aide de 16 isoenzymes. Ces auteurs montrent que cette différenciation est indépendante de l'origine géographique et suggèrent donc une faible différenciation ancestrale et une forte différenciation régionale ou locale des populations contemporaines.

Une étude phylogéographique couvrant tout l'habitat naturel de l'aulne en Europe a été réalisée par King et al. (1998) à l'aide de marqueurs moléculaires chloroplastiques. L'ADN chloroplastique, à héritage maternel, évolue lentement comparé à l'ADN nucléaire. Ces marqueurs sont donc particulièrement adaptés à la mise en évidence d'une structuration géographique. Treize haplotypes chloroplastiques distincts sont dénombrés en Europe et leur distribution géographique est très structurée. L'Europe centrale et l'Europe du Nord présentent peu de variabilité avec 2 haplotypes majeurs et un haplotype rare présent uniquement dans le centre de la Norvège. Cette étude confirme la localisation dans les Carpates (Hongrie et Roumanie actuelles) d'un refuge principal de l'aulne glutineux durant la dernière période glaciaire. C'est au départ de ce refuge que la majeure partie du nord et du centre de l'Europe aurait été recolonisée.

Jusqu'en 2010, aucun marqueur microsatellite nucléaire spécifique de l'aulne n'avait été décrit. La possibilité d'utilisation croisée d'une certaine proportion (53 %) de marqueurs microsatellites de bouleau (*Betula pendula* Roth.) avait toutefois été démontrée par Zhuk et al. (2008) bien que ces auteurs soulignent que la fréquence

élevée d'allèles nuls représente un problème pour l'utilisation de ces marqueurs sur l'aulne glutineux. Dans le cadre de notre étude, deux marqueurs microsatellites ont été développés à partir de séquences publiées d'aulne glutineux et l'utilisation croisée de 9 marqueurs de noisetier (*Corylus avellana*) a été mise au point (Mingeot et al., 2010). Enfin, profitant des développements récents des techniques de séquençage à grande échelle, Lepais et al. (2011) ont développé 12 marqueurs microsatellites d'aulne au départ de 17855 courtes séquences obtenues par pyroséquençage aléatoire. À notre connaissance, aucune étude de diversité génétique de l'aulne réalisée à l'aide de marqueurs moléculaires nucléaires n'a été publiée à ce jour.

3.2 Étude de diversité de l'aulne glutineux dans la région Wallonie – Lorraine – Grand-Duché du Luxembourg

Des marqueurs microsatellites ont été utilisés afin de génotyper une collection d'aulnes rivulaires collectés dans la zone transfrontalière (Druart et al., 2013). Les objectifs poursuivis étaient les suivants :

- Disposer d'un outil de gestion et de traçabilité de la collection ;
- Caractériser la diversité présente dans la région ;
- Caractériser la diversité de la collection en regard de la diversité présente dans un peuplement issu de la même région.

3.2.1 Utilisation de marqueurs microsatellites comme outil de discrimination et de gestion d'une collection

Cent quarante-neuf arbres, issus de 79 provenances représentatives de la région prospectée, ont été génotypés par 14 marqueurs microsatellites. Ces arbres proviennent des bassins de la Meuse (77), du Rhin (70) et de l'Escaut (2) et sont issus des rives de 61 cours d'eau différents. Différents paramètres statistiques ont été estimés et des analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Genealex version 6.2 (Peakall et al., 2006) (**Tableau 3.1**).

La probabilité d'identité (probabilité que deux génotypes différents ne soient pas discriminés) a été évaluée pour chaque marqueur, pour des individus non apparentés (PI) ou apparentés (PISibs) (**Tableau 3.1**). Cette probabilité varie fortement en fonction du marqueur (de $7,5 \cdot 10^{-1}$ à $6,2 \cdot 10^{-3}$ pour des individus non apparentés). Si l'on combine les 14 marqueurs, la probabilité de trouver deux génotypes différents qui ne soient pas discriminés est de $1,4 \cdot 10^{-14}$.

L'utilisation des marqueurs sur les 149 individus de la collection a permis de mettre en évidence 146 génotypes différents. Cent quarante-quatre arbres sont différenciés, les cinq arbres restants se répartissent en deux groupes (deux génotypes) : deux clones provenant des bords de la Rulles à Habay-la-Neuve et trois clones provenant

des bords de la Kiesel à Thionville. La localisation identique de ces génotypes indique qu'il s'agit vraisemblablement de deux cas de multiplication végétative.

Trois marqueurs (CAC-A105, L3.1* et L2.7) ont ensuite été utilisés comme outil de distinction sur des cépées d'aulnes provenant des bords de la Sarre à Gosselming. Il s'agit de 99 cépées identifiées visuellement comme distinctes et échantillonnées sur un transect de 4 km de long. Deux à trois brins ont été testés par cépée (soit un total de 271 échantillons). Il s'agissait ici de confirmer que des tiges qui ont été définies comme une cépée (donc issues d'un seul individu) sont bien identiques entre elles. Les marqueurs CAC-A105, L3.1* et L2.7 ont été choisis sur base de leur taux de polymorphisme et de leur facilité d'utilisation. La probabilité d'identité en combinant ces trois marqueurs est de $3,7 \cdot 10^{-6}$. Des différences entre brins ont été révélées pour 13 des 99 cépées. D'autre part, nous avons mis en évidence deux cas où des cépées répertoriées comme différentes étaient en fait identiques entre elles. Dans les deux cas, les cépées étaient distantes de moins d'1 m. Dans 17 % des cas, l'identification visuelle des cépées présentait donc des erreurs.

3.2.2 Diversité génétique de la collection et comparaison avec la diversité d'un peuplement

Certains marqueurs utilisés mettent en évidence une grande diversité allélique au sein de la collection (**Tableau 3.1**) avec, par exemple, 31 allèles détectés et un indice d'information de Shanon de 3062 pour le marqueur CAC-A105. Le taux d'hétérozygotes observé dans la collection varie de 0,149 à 0,845 selon le marqueur. L'utilisation du logiciel Micro Checker version 2.2.3 (Oosterhout et al., 2004) révèle la possibilité d'allèles nuls pour cinq marqueurs. Aucune différenciation en fonction de l'appartenance à un bassin hydrographique (Meuse vs Rhin) n'a été mise en évidence ($F_{st} = 0,005$).

La diversité allélique de la collection a été comparée à la diversité présente dans un peuplement. Un échantillonnage de 25 arbres a été effectué sur quelques centaines de mètres, le long de la Masblette à Saint-Hubert (Belgique). Ces 25 arbres ont été génotypés par les 14 marqueurs microsatellites. Tous les allèles identifiés dans le peuplement, quel que soit le marqueur, sont présents dans la collection. Le nombre d'allèles diffère fortement entre le peuplement et la collection pour certains marqueurs (**Tableau 3.2**); ce résultat n'est pas surprenant puisque les effectifs sont très différents (25 vs 149 arbres). Toutefois, le nombre d'allèles effectifs (N_e) diffère peu pour la plupart des marqueurs : les allèles les plus fréquents sont identiques et leurs fréquences ne diffèrent pas significativement entre la collection et la population (**Figure 3.1**).

Tableau 3.1. Origine, référence, température optimale d'hybridation (T° opt.), nombre d'allèles (Na), indice d'information de Shannon (I), hétérozygotie observée (Ho), hétérozygotie attendue (He), probabilité d'identité pour des individus non apparentés (PI) ou apparentés (PI(Sibs)) et présence potentielle d'allèles nuls (testée par le logiciel Micro-Checker) pour 14 microsatellites utilisés sur une collection de 149 aulnes glutineux.

Marqueur	Espèce d'origine	Référence	T° opt (°C)	Tailles allèles (pb)	Na	I	Ho	He	PI par Locus	PI(Sibs) par Locus	allèles nuls
CAC-A105	Noisetier	Bassil et al. (2005)	50 °C	160-252	31	3,062	0,758	0,943	$6,2 \cdot 10^{-3}$	$2,8 \cdot 10^{-1}$	Oui
CAC-B101	Noisetier	Bassil et al. (2005)	60 °C	159-187	12	1,600	0,685	0,720	$1,2 \cdot 10^{-1}$	$4,2 \cdot 10^{-1}$	Non
CAC-B029b	Noisetier	Bassil et al. (2005)	50 °C	127-143	8	1,256	0,550	0,582	$2,1 \cdot 10^{-1}$	$5,1 \cdot 10^{-1}$	Non
CAC-B109	Noisetier	Bassil et al. (2005)	50 °C	134-136	2	0,452	0,255	0,279	$5,6 \cdot 10^{-1}$	$7,5 \cdot 10^{-1}$	Non
CAC-B113	Noisetier	Bassil et al. (2005)	50 °C	194-222	12	1,645	0,845	0,762	$9,2 \cdot 10^{-2}$	$3,9 \cdot 10^{-1}$	Non
CaT-B106	Noisetier	Boccacci et al. (2005)	50 °C	165-168	2	0,265	0,149	0,138	$7,5 \cdot 10^{-1}$	$8,7 \cdot 10^{-1}$	Non
CaT-B507	Noisetier	Boccacci et al. (2005)	55 °C	172-190	5	0,657	0,322	0,307	$5,0 \cdot 10^{-1}$	$7,2 \cdot 10^{-1}$	Non
CAC-C118	Noisetier	Bassil et al. (2005)	55 °C	155-167	5	1,094	0,568	0,567	$2,3 \cdot 10^{-1}$	$5,2 \cdot 10^{-1}$	Non
AgT64I	Auline	Mingeot et al. (2010)	58 °C	138-236	30	2,526	0,638	0,860	$3,0 \cdot 10^{-2}$	$3,3 \cdot 10^{-1}$	Oui
L2.7	Bouleau	Kulju et al. (2004)	58 °C	138-214	30	2,968	0,839	0,932	$8,4 \cdot 10^{-3}$	$2,9 \cdot 10^{-1}$	Oui
L3.1	Bouleau	Kulju et al. (2004)	50 °C	224-260	14	1,953	0,557	0,795	$6,4 \cdot 10^{-2}$	$3,7 \cdot 10^{-1}$	Oui
L5.4	Bouleau	Kulju et al. (2004)	57 °C	222-234	5	1,055	0,534	0,596	$2,4 \cdot 10^{-1}$	$5,1 \cdot 10^{-1}$	Non
L5.5	Bouleau	Kulju et al. (2004)	52 °C	112-124	8	1,623	0,383	0,753	$9,9 \cdot 10^{-2}$	$4,0 \cdot 10^{-1}$	Oui
L7.8	Bouleau	Kulju et al. (2004)	57 °C	318-348	12	1,976	0,765	0,811	$5,5 \cdot 10^{-2}$	$3,6 \cdot 10^{-1}$	Non
Moyenne					12,6	1,581	0,560	0,646			

Tableau 3.2. Utilisation de marqueurs microsatellites sur une collection de 149 aulnes glutineux et sur 25 arbres issus d'un peuplement. N : nombre d'individus génotypés, Na : nombre d'allèles différents, Ne : nombre d'allèles effectifs, I : indice d'information de Shannon.

Marqueur	Collection				Peuplement			
	N	Na	Ne	I	N	Na	Ne	I
CAC-A105	149	31	17,495	3,062	25	15	8,503	2,378
CAC-B101	149	12	3,572	1,600	25	7	3,415	1,413
CAC-B029b	149	8	2,394	1,256	25	6	2,046	1,095
CAC-B109	149	2	1,387	0,452	25	2	1,173	0,279
CAC-B113	148	12	4,205	1,645	25	6	3,834	1,488
CaT-B106	148	2	1,160	0,265	25	2	1,317	0,405
CaT-B507	149	5	1,443	0,657	25	4	1,178	0,362
CAC-C118	148	5	2,309	1,094	25	4	1,885	0,876
Ag164I	149	30	7,162	2,526	25	16	9,124	2,464
L2.7	149	30	14,693	2,968	25	17	10,000	2,554
L3.1	149	14	4,868	1,953	25	10	5,924	1,962
L5.4	148	5	2,473	1,055	25	3	2,643	1,028
L5.5	149	8	4,044	1,623	25	6	2,934	1,287
L7.8	149	12	5,301	1,976	25	9	3,709	1,650

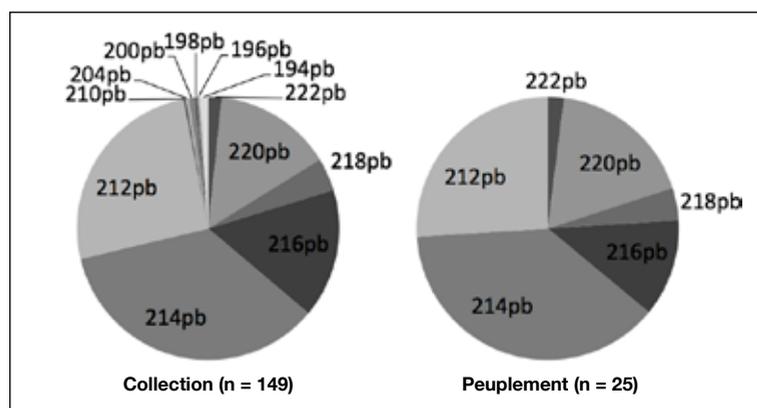


Figure 3.1. Assortiment allélique du marqueur microsatellite CAC-B113 utilisé sur 25 arbres issus d'un peuplement et 149 arbres issus de la collection. Les allèles sont désignés par leurs tailles exprimées en paires de bases (pb).

3.3 Conclusions

Dans le cadre de la caractérisation et de la gestion d'une collection d'aulnes glutineux, 14 marqueurs microsatellites ont été utilisés. La probabilité d'identité de deux arbres varie en fonction du marqueur mais la probabilité d'identité estimée en

combinant les 14 marqueurs est de $1,4 \cdot 10^{-14}$. Nous disposons donc d'un outil fiable permettant de distinguer sans ambiguïté les génotypes d'aulnes glutineux. Cet outil est d'autant plus précieux que l'aulne constitue des cépées par rejet de souche rendant l'identification visuelle d'un individu malaisée.

Les marqueurs utilisés mettent en évidence une grande diversité allélique au sein de la collection. La comparaison de cette diversité avec celle d'un peuplement naturel issu de la même région montre que l'assortiment allélique de la collection est représentatif (en tailles et en fréquences) des allèles d'un peuplement naturel auxquels s'ajoute un assortiment d'allèles rares plus ou moins nombreux selon le marqueur.

La comparaison de différentes populations européennes à l'aide des mêmes marqueurs est en cours afin de déterminer l'existence d'une différenciation potentielle entre populations.

Remerciements

Les recherches présentées dans ce chapitre ont été menées dans le cadre du projet Interreg IV-A Grande Région/ECOLIRIMED soutenu financièrement par le FEDER, le Service Public de Wallonie et la Région Lorraine.

Les auteurs tiennent à remercier Mesdames Roberte Baleux et Martine Leclercq pour leur excellent travail technique.

3.4 Bibliographie

- Agarwal M., Shrivastava N. & Padh H., 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.*, **27**, 617–631.
- Bassil N., Botta R. & Mehlenbacher S., 2005. Microsatellite markers in hazelnut: isolation, characterization, and cross-species amplification. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **130**, 543–549.
- Boccacci P. et al., 2005. Characterization and evaluation of microsatellite loci in European hazelnut (*Corylus avellana*) and their transferability to other *Corylus* species. *Mol. Ecol. Notes*, **5**, 934–937.
- Chandelier A., Mertens P., Marçais B. & Husson C., 2013. Aspects sanitaires de la filière aulne glutineux, frêne commun et saule dans le cadre de la renaturation des cours d'eau. In : Druart Ph., Husson C. & Paul R. (Eds.). *Renaturation des berges de cours d'eau et phytoremédiation*. Gembloux, Belgique : Presses agronomiques de Gembloux.
- DeWald L.E. & Steiner K.C., 1986. Phenology, height increment and cold tolerance of *Alnus glutinosa* populations in a common environment. *Silvae Genet.*, **35**, 5-6.

- Druart Ph. et al., 2013. Construction et développement d'une filière de production d'écotypes ligneux pour l'application des techniques végétales à la renaturation des berges de cours d'eau. *In* : Druart Ph., Husson C. & Paul R. (Eds.). *Renaturation des berges de cours d'eau et phytoremédiation*. Gembloux (Belgique) : Presses agronomiques de Gembloux.
- Gibbs J.N., Lipscombe M.A. & Peace A.J., 1999. The impact of *Phytophthora* disease on riparian populations of common alder (*Alnus glutinosa*) in southern Britain. *Eur. J. For. Path.*, **29**, 39-50.
- Gömöry D. & Paule L., 2002. Spatial and microgeographical genetic differentiation of black alder (*Alnus glutinosa* Gaertn.) populations. *For. Ecol. Manag.*, **160**, 3-9.
- Kalia R. et al., 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, **177**, 309-334.
- King A. & Ferris C., 1998. Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Mol. Ecol.*, **7**, 1151-1161.
- Kulju K., Pekkinen M. & Varviot S., 2004. Twenty-three microsatellite primer pairs for *Betula pendula* (Betulaceae). *Mol. Ecol. Notes*, **4**, 471-473.
- Kumar P. et al., 2009. Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. *Plant Omics J.*, **2**, 141-162.
- Lepais O. & Bacles C., 2011. De novo discovery and multiplexed amplification of microsatellite markers for black alder (*Alnus glutinosa*) and related species using SSR-enriched shotgun pyrosequencing. *J. Hered.*, **102**, 627-632.
- McVean D.N., 1953. Regional variation of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. in Britain. *Watsonia*, **3**, 26-32.
- Mingeot D., Baleux R. & Watillon B., 2010. Characterization of microsatellite markers for black alder (*Alnus glutinosa* [L.] Gaertn.). *Conserv. Genet. Resour.*, **2**, 269-271.
- Peakall R. & Smouse P., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes*, **6**, 288-295.
- Pliūra A., 2004. Possibilities for adaptation of *Alnus glutinosa* L. to changing environment. *Biologija*, **1**, 6-12.
- Prat D., Leger C. & Bojovic S., 1992. Genetic diversity among *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. populations. *Acta Oecol.*, **13**, 469-477.
- Thoirain B., Husson C. & Marçais C., 2007. Risk factors for the *Phytophthora*-induced decline of alder in Northeastern France. *Phytopathology*, **97**, 99-105.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W. & Wills D., 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping error in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes*, **4**, 535-538.
- Zhuk A., Veinberga I., Daugavietis M. & Rungis D., 2008. Cross-species amplification of *Betula pendula* Roth. simple sequence repeat markers in *Alnus* species. *Baltic For.*, **14**, 116-121.

Impact des éléments-traces métalliques sur les plantes et les techniques de phytoremédiation

Evlard Aricia, Campanella Bruno

Résumé

La présence des éléments-traces métalliques (ETM) dans les sols est essentiellement due aux activités humaines. Ils représentent, à ce jour, une importante problématique car ils peuvent contaminer tous les niveaux de la chaîne alimentaire et augmenter les risques pour la santé humaine et le maintien des écosystèmes. C'est pourquoi la tolérance aux ETM et leur transfert vers les plantes sont largement étudiés. Certains ETM, comme le zinc, sont des oligoéléments pour les organismes vivants. Mais, à fortes concentrations, ils deviennent tous toxiques. Chez les plantes, cette toxicité est due à plusieurs raisons. D'une part, il peut y avoir production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) qui vont alors interagir avec les macromolécules de la cellule (stress oxydatif). Cette induction de ROS peut être directement liée à l'action du métal sur les réactions d'oxydo-réduction (réactions Haber-Weiss et Fenton) ou indirectement, en se liant, par exemple, aux enzymes impliquées dans la défense antioxydative. D'autre part, les métaux peuvent entrer en compétition, au niveau des racines, avec les nutriments essentiels. Ces perturbations cellulaires affectent finalement le développement de la plante et peuvent mener à la mort de celle-ci si elle ne développe pas des mécanismes de tolérance. Dans ce chapitre, nous reprenons les différentes voies de toxicité des ETM mais aussi les mécanismes de tolérance développés par les plantes : l'influence de la rhizosphère, le système antioxydatif ainsi que le transport et la séquestration des ETM. Enfin, nous développons le concept de la phytoremédiation, et plus précisément la phytoextraction et la phytostabilisation, en faisant le lien avec ces mécanismes de tolérance.

Mots-clés : métal lourd, plante, tolérance, pollution du sol.

The impact of the metal trace elements on plants and the phytoremediation techniques

The presence of metal trace elements (MTE) in soils is due mainly to human activity. They pose an important risk of contamination of the food chain, for human health as well as for ecosystems. In recent decades, the mechanisms of tolerance to MTE and their transfer to plants have been widely studied. Some MTE are crucial

for the development of plants, animals and humans. They become toxic, however, at high concentrations. In plants, there are several reasons for this toxicity. First, MTE induce the production of reactive oxygen species (ROS) (oxidative stress), which interact with cell macromolecules. The production of ROS can be directly linked to the action of the metal itself on the redox reactions (Haber-Weiss and Fenton reaction) or indirectly, for example, by interacting with the enzymes involved in the oxidative defence. Second, metals can compete with essential ions at root level. These cellular disruptions affect plant development and cause the death of the organism in the absence of tolerance mechanisms. This chapter describes the different ways in which MTE become toxic, as well as the tolerance mechanisms developed by plants (the impact of the rhizosphere, the antioxidative defence, and the transport and sequestration of the MTE). The chapter then summarises the concepts of phytoremediation and, specifically, of phytoextraction and phytostabilisation, and links them to the mechanisms of tolerance.

Keywords: heavy metals, plant tolerance, soil pollution.

4.1 Introduction

La présence des éléments-traces métalliques (ETM) dans les sols est due, d'une part, à des phénomènes naturels et, d'autre part, aux activités humaines (engrais, amendements calcaires, fumiers, lisiers, boues de stations d'épuration, composts urbains, activités industrielles, moteurs d'automobiles) (Baize, 1994). De par leur persistance, leur toxicité et la progression de leurs teneurs dans l'environnement, les métaux représentent une des plus importantes problématiques de pollution environnementale au niveau mondial. L'impact des métaux sur les plantes est donc fortement étudié. Premièrement, pour des raisons sanitaires et, deuxièmement, pour développer des techniques biologiques de lutte contre cette pollution en se basant sur les mécanismes de tolérance développés par les végétaux. Ces techniques biologiques sont regroupées communément sous le terme de phytoremédiation. Ce chapitre résume ce en quoi les éléments-traces métalliques sont un danger pour les organismes vivants ainsi que les mécanismes mis en place par les végétaux face à ces polluants. Enfin, les principes de la phytoremédiation sont également développés.

4.2 Les éléments-traces métalliques dans l'environnement

4.2.1 Définition et origine des éléments-traces métalliques

Depuis plusieurs décennies, le terme « métaux lourds » est abondamment utilisé pour définir un groupe de métaux et métalloïdes liés à la contamination des sols et leur toxicité. Duffus (2002) résume les différents points de vue et définitions du terme.

L'expression « métaux lourds », assez imprécise, se base sur la densité chimique des métaux et est associée aux éléments dont la densité est supérieure à $3,5 \text{ g/cm}^3$ et qui ont un nombre atomique supérieur à 20. Les métaux lourds regroupent classiquement le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le cobalt (Co), le cuivre (Cu), l'étain (Sn), le fer (Fe), le manganèse (Mn), le mercure (Hg), le molybdène (Mo), le nickel (Ni), le plomb (Pb), le zinc (Zn). L'arsenic (As), qui est un métalloïde, et le sélénium (Se), bien que non métallique, sont souvent classés comme métaux lourds à cause de leur toxicité. Parfois, le terme « éléments-traces métalliques » est utilisé. Les « éléments-traces » sont les 80 éléments chimiques qui constituent la croûte terrestre continentale et dont la concentration est inférieure à 0,1 %. Ils ne représentent que 0,6 % du total par rapport aux 12 éléments majeurs qui, eux, représentent 99,4 %. Parmi les éléments majeurs métalliques, se trouvent le fer, l'aluminium et le manganèse, qui sont le plus souvent analysés. Le cadmium, le cuivre, le chrome, le nickel, le plomb et le zinc sont principalement présents sous forme de traces dans l'environnement (Baize, 2009). Ce sont les éléments-traces métalliques ou ETM.

Les termes ETM ou métaux sont préférentiellement utilisés tout au long de cette synthèse bibliographique.

4.2.2 Mobilité et biodisponibilité des éléments-traces métalliques

La teneur totale d'un élément donne une idée du « stock » total de l'élément à un moment donné. Cependant, cela ne donne aucune information sur le réel danger des ETM lié à leur mobilité dans le sol et leur biodisponibilité pour les organismes vivants (Baize, 1994). La mobilité d'un élément est sa capacité à passer d'un compartiment du sol à un autre (formes échangeables, minéraux, oxydes/hydroxydes, molécules organiques). La biodisponibilité est la capacité de ce même élément à passer d'un compartiment du sol vers le vivant (Juste, 1988 ; Vanobberghen, 2011). C'est ainsi qu'une teneur totale d'un élément donné dans le sol peut être excessive mais, si la biodisponibilité est restreinte, le danger lié à l'absorption par la plante de cet élément s'en voit diminué. De nombreux paramètres influencent la mobilité des métaux dans le sol. Les plus notoires sont le pH, le potentiel redox, la quantité et la composition de la matière organique, la capacité d'échange cationique, la température et l'activité microbiologique.

La présence des métaux dans les végétaux est avant tout un problème sanitaire. Certains métaux sont essentiels pour la plante, l'animal et l'Homme. Leur transport et leur concentration sont régulés pour maintenir une teneur constante indépendamment de la teneur à laquelle l'organisme vivant est exposé (homéostasie). Chez l'Homme, le zinc est important dans le développement du squelette et des organes et dans le bon fonctionnement du système immunitaire. Il joue un rôle crucial dans la protection

des composants cellulaires et de l'ADN contre l'oxydation et préviendrait l'apparition de maladies chroniques telles que le cancer (Caulfield et al., 2004; Ho, 2004). Bien qu'essentiels à faibles doses, ces métaux sont toxiques à fortes concentrations. Chez l'Homme et dans le règne animal, une inhalation ou une ingestion de fortes doses peut produire des effets délétères (INERIS, 2005; Vamerali et al., 2010; Sanchez-Pardo et al., 2012). D'autres métaux sont toxiques à très faibles doses (Cd, Pb). On se souvient de la maladie Itai-Itai, caractérisée par l'ostéomalacie et l'ostéoporose, qui est apparue vers les années 1950 au Japon suite à l'irrigation des rizières par de l'eau enrichie en cadmium (De Foresta et al., 1981). D'autres conséquences pathologiques sont l'atrophie testiculaire, le cancer de la prostate et certaines maladies nerveuses. Une fois transportés par le sang, le cadmium ainsi que le plomb se concentrent principalement dans le foie et les reins, mais aussi dans le pancréas, la glande thyroïde, les testicules et les glandes salivaires (De Foresta et al., 1981; INERIS, 2003; 2005).

4.3 Les éléments-traces métalliques chez les végétaux

Le **zinc** est un élément essentiel chez les plantes. Il intervient principalement sous sa forme d'oxydation Zn^{2+} . Sous cette forme, le zinc limite le transfert d'électrons et donc la formation de radicaux libres (Sinclair et al., 2012). Il peut avoir un rôle de cofacteur catalytique ou structurel (du domaine en «doigts de zinc») dans une majorité d'enzymes et de protéines. Le **cuivre** intervient comme cofacteur au sein d'enzymes ayant un rôle dans la photosynthèse et dans la respiration. Il est, entre autres, impliqué dans la distribution des sucres, la réduction de l'azote et dans la fixation de l'oxygène. Le **nickel** est essentiel pour les plantes mais sa concentration dans la plupart des espèces végétales est très faible (0,05–10 mg/kg M.S.). C'est un composé d'enzymes telles que les glyoxalases et uréases ainsi que quelques superoxydes dismutases et hydrogénases. Le nickel est également important dans certains processus métaboliques (uréolyse, métabolisme de l'hydrogène, biogénèse du méthane et acétogénèse) (Vamerali et al., 2010; Sanchez-Pardo et al., 2012). Le **cobalt** n'est pas classé comme essentiel, mais il est bénéfique dans certains cas. Il est surtout nécessaire pour le bon fonctionnement des enzymes impliquées dans la fixation de l'azote chez les légumineuses, ainsi que chez *Alnus glutinosa* et *Casuarina cunninghamiana*, qui possèdent la vitamine B12 (dont le cobalt est un composant) et les coenzymes cobamides. Une carence en cobalt affecte le développement et le fonctionnement des nodules (Palit et al., 1994; Marschner, 1995). Cependant, en quantité trop importante, tous les ETM deviennent toxiques.

4.3.1 L'interaction entre les métaux

Plusieurs métaux se retrouvent en même temps dans des sols pollués. Cette coexistence peut jouer un rôle dans l'intensité de leur phytotoxicité. En effet, le danger des métaux réside non seulement dans les dommages cellulaires qu'ils peuvent occasionner, mais également dans les déséquilibres nutritionnels qu'ils peuvent provoquer en entrant en compétition avec d'autres éléments essentiels (**Figure 4.1**) (Zhao et al., 2012). Le cuivre, le nickel et le cadmium peuvent provoquer des carences en d'autres cations (Ca, Mg, Mn, Fe, Zn) en interagissant avec ces derniers au niveau des racines. Des dégâts physiologiques (retard de la germination, inhibition de la croissance) sont alors occasionnés (Arduini et al., 1998 ; Yusuf et al., 2011). L'ion Ca^{2+} peut réduire la toxicité du Ni^{2+} au niveau racinaire chez *Alyssum bertolonii* Desv. alors que le cuivre l'augmente chez *Pinus sylvestris* (Chen et al., 2009). De fortes teneurs en cobalt peuvent provoquer une déficience en fer mais aussi empêcher la fixation du cadmium par les racines (Palit et al., 1994). Le cadmium et le zinc partagent des propriétés physiques et chimiques et sont souvent associés dans les minerais. Des interactions, tantôt antagonistes tantôt synergiques, sont fréquentes entre ces deux métaux. Plusieurs études, dont Cherif et al. (2011), ont montré, par exemple, que le zinc pouvait diminuer l'absorption du cadmium par la plante.

4.3.2 Les espèces réactives d'oxygène (ROS)

Le danger de la plupart des métaux réside dans leur état d'oxydation et donc dans leur propension à réagir à la place, ou avec d'autres composés chimiques. Les métaux peuvent être divisés en deux groupes : il y a les métaux « redox actifs » (Fe, Cu, Cr, Co) et les « redox inactifs » (Cd, Zn, Ni...). Les premiers sont directement impliqués au niveau des réactions d'oxydo-réduction (réactions Haber-Weiss et Fenton) et sont responsables de la formation d'espèces réactives d'oxygène (ROS) telles que l'anion superoxyde O_2^- , l'oxygène singulet O_2 , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , ou encore l'ozone O_3 (Cherif et al., 2011 ; Sanchez-Pardo et al., 2012). Les métaux redox inactifs créent indirectement des ROS en affectant, par exemple, les enzymes impliquées dans la défense antioxydative, en déviant les électrons de la chaîne de transfert ou en induisant la peroxydation des lipides (Jozefczak et al., 2012). Certaines protéines et enzymes sont plus vulnérables que d'autres, notamment lorsqu'elles possèdent dans leur structure un groupement sulfure (cystéine). En effet, le cadmium présente une grande affinité pour ce groupement et, en se liant à ce dernier, il modifiera la structure protéinique et donc son activité au sein de la cellule. D'autres protéines possèdent un cofacteur métallique (chlorophylle, RuBisCO, superoxydes dismutases et catalases du système de défense antioxydatif) ou organique (FAD, NAD, coenzyme A). Ce cofacteur peut être remplacé par un autre métal, ce qui aura

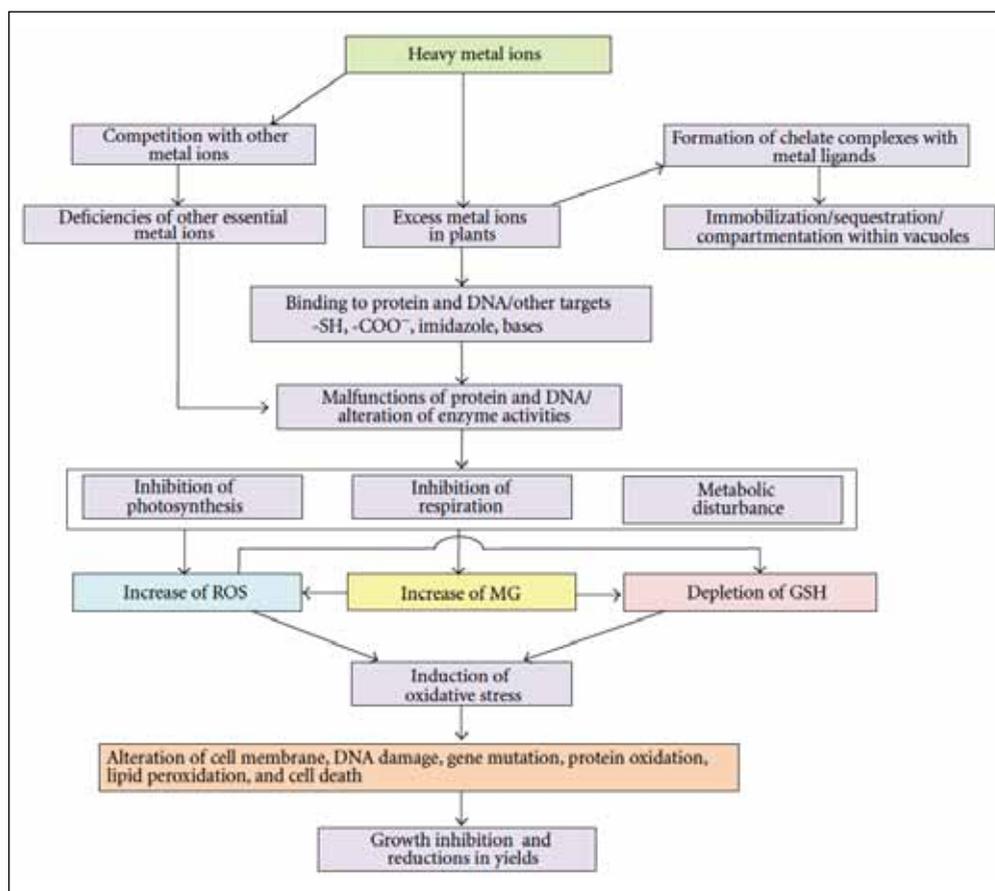


Figure 4.1. Mécanismes biochimiques et moléculaires impliqués dans la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) et le dommage cellulaire chez les plantes suite à la présence des ETM (Hossain et al., 2012).

également comme conséquence l'inactivation de la protéine. La production des ROS est donc intensifiée car le système de défense antioxydatif est inactivé (Singla-Pareek et al., 2006). Les métaux peuvent également endommager les structures chloroplastiques en affectant l'antenne collectrice du photosystème II, la quantité de pigments (xanthophylles et caroténoïdes) ainsi que la chaîne de transport d'électrons (cytochromes b6f et b559) (Palit et al., 1994; Chen et al., 2009; Yusuf et al., 2011; Hossain et al., 2012; Sanchez-Pardo et al., 2012). Les métaux, en interagissant avec les macromolécules de la cellule, provoquent alors des dérèglements au niveau du métabolisme cellulaire (perméabilité de membrane, photosynthèse, respiration, sénescence). Des symptômes tels que la chlorose et la nécrose apparaissent, la croissance et la vitalité de la plante sont réduites ou inhibées et, au final, les métaux provoquent la mort de la plante (**Figure 4.1**).

4.3.3 Systèmes de tolérance des métaux

Chaque espèce végétale a son système de tolérance et une seule et même espèce peut développer plusieurs systèmes de tolérance à la fois. Ce paragraphe reprend les principaux mécanismes de tolérance vis-à-vis des métaux. Ces mécanismes peuvent être constitutifs ou induits par l'excès de métaux.

❑ Effets des racines sur la rhizosphère

L'entrée du métal peut être influencée par les racines. En effet, plusieurs caractéristiques du sol sont modifiées par l'activité des racines. Cette partie du sol influencée par le contact avec les racines est appelée la « rhizosphère ». La plante peut, par exemple, relâcher 10 à 20 % du carbone racinaire, issu de la photosynthèse, sous forme de « rhizodépôts » (Kidd et al., 2009). Ces rhizodépôts regroupent les processus par lesquels le carbone est libéré dans le sol : perte des cellules de la coiffe, mort et lyse des cellules racinaires (cortex, racines fines), le flux de carbone à travers les symbiontes, pertes gazeuses, la perte des solutés des cellules vivantes (les exsudats) et la sécrétion de polymères insolubles (mucilages) (Jones et al., 2009). Différents exsudats racinaires permettent la mobilisation des nutriments dans le sol (P et Fe) et augmentent leur absorption. Ils peuvent également influencer le comportement des ETM en réduisant ou augmentant leur disponibilité (modification du pH, des réactions redox, précipitation et chélation) (Kidd et al., 2009).

La paroi cellulaire et la membrane plasmique peuvent également limiter le passage des métaux vers l'intérieur de la cellule grâce à leur capacité d'échange cationique (CEC).

❑ Les micro-organismes de la rhizosphère

L'activité racinaire, en modifiant les propriétés physico-chimiques du sol, permet également le développement de micro-organismes tels que les bactéries et les champignons. En proliférant dans cet « écosystème » particulier, certains de ces organismes confèrent même des propriétés en faveur de la plante. Ils jouent un rôle important dans les processus de mobilisation ou d'immobilisation des éléments dans le sol. Étant le premier contact avec le sol avant la racine, ils peuvent influencer l'entrée des éléments nutritionnels et autres métaux au sein de la plante. Ainsi, une racine peut installer un milieu favorisant le développement d'associations bénéfiques (symbioses) entre la plante et ces micro-organismes (Bouchet et al., 1999 ; Drénou, 2006 ; Fortin et al., 2008 ; Vangronsveld et al., 2009). Dans le cas d'une association entre une plante et un champignon, la symbiose est appelée « mycorhize ». Pratiquement la totalité des plantes terrestres vivent en symbiose mycorhizienne dont il existe plusieurs formes (endomycorhizes, ectomycorhizes, etc.) (Fortin et al., 2008).

Le mycélium du manteau externe est en permanence en contact avec les particules du sol. Quand le sol est enrichi en métaux, le développement de ces champignons peut être influencé. Le champignon peut, comme la plante, avoir des difficultés à coloniser le sol contaminé en subissant un stress métallique semblable à celui observé chez les végétaux, et les champignons qui développent plus de mycélium ont davantage de chances de survivre dans un sol contaminé. L'absorption et la translocation des métaux dans la plante hôte peuvent également avoir un effet indirect sur la mycorhize car, si la plante en pâtit, elle ne peut fournir le sucre nécessaire au champignon. C'est le cas, par exemple, chez *Suillus luteus* dont la colonisation mycorhizienne peut être réduite significativement par le cadmium (Dixon et al., 1988; Colpaert et al., 1992a; 1992b; 1993).

Une fois installée, cette symbiose peut protéger la plante de la toxicité des métaux en augmentant leur tolérance (Brown et al., 1985; Denny et al., 1987a; 1987b; Jones et al., 1988; Colpaert et al., 1992a). L'effet des mycorhizes sur la tolérance de la plante est toutefois variable, sans doute parce que cela doit être spécifique à la fois au métal et à la plante. En effet, des études indiquent une tendance des ectomycorhizes à limiter l'entrée du métal (Krupa et al., 2003; Prasun et al., 2005; Sell, 2005; Krznaric et al., 2009; 2010). Les champignons issus de milieux contaminés seraient capables de restreindre l'absorption du zinc par exemple (Colpaert et al., 1992a). Cependant, Lasat, (2002) a également montré que des ectomycorhizes adaptées jouent également un rôle important dans l'accumulation de certains métaux. Gamalero et al. (2009) rapportent que les endomycorhizes améliorent la tolérance chez la plante, d'une part en modulant l'expression de certaines enzymes impliquées dans la photosynthèse et la fixation du carbone, d'autre part en favorisant l'action des défenses antioxydatives (composés sulfurés, peroxydases).

□ Transport du métal dans la cellule végétale

Pour entrer dans la racine, le métal peut emprunter soit la *voie* « intracytoplasmique » (symplaste) soit la « voie extracytoplasmique » (apoplaste) via des transports passifs ou actifs, spécifiques ou non. Une fois à l'intérieur de la cellule, le métal peut être rejeté (**stratégie d'exclusion**). Des transporteurs de métaux sont alors impliqués pour transférer les ions métalliques du symplaste vers l'apoplaste. Si le métal reste au sein de la cellule, la plante est capable de minimiser son impact en régulant sa distribution au sein de la cellule et des organes. La plante peut ainsi empêcher le transport des métaux vers les parties aériennes et limiter l'accumulation uniquement au niveau racinaire ou, à l'inverse, optimiser son accumulation au niveau supérieur (**stratégie d'accumulation**) (Clemens, 2001; Kidd et al., 2009; Hossain et al., 2012).

Une série de familles de gènes est impliquée dans la séquestration et la compartimentation des métaux au sein de la cellule (**Figure 4.2**). L'absorption du

Fe^{2+} et du Zn^{2+} serait prise en charge par un groupe de transporteurs appartenant à la famille ZIP [ZRT (*Zinc-Regulated Transporter*), IRT (*Iron-Regulated Transporter*)]. Les transporteurs COPT (*Copper Transporter*) sont impliqués dans le transport du cuivre et les transporteurs Nramp (*Natural Resistance Associated Macrophage Proteins*) dans celui du Fe^{2+} et du Cd^{2+} . Le métal peut également induire des réponses de détoxification comme la formation de chélateurs dans le cytosol. Il s'agit principalement des phytochélatines (PC) et des métallothionéines (MT). Les PC sont synthétisées à partir du glutathion (GSH) et sont des polypeptides riches en cystéine. Leur structure est généralement notée $(\gamma - \text{Glu} - \text{Cys})_n - \text{X}$ où X est soit Gly, γ -Ala, Ser, Gln ou Glu et $n = 2 - 11$. Les MT sont également des polypeptides à faible poids moléculaire riches en cystéine.

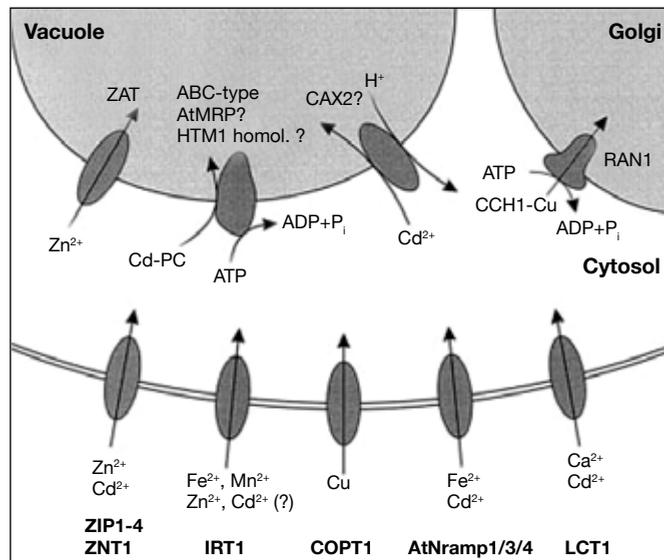


Figure 4.2. Transporteurs impliqués dans la compartimentation des ETM (figure reproduite de Clemens, 2001, avec l'autorisation de Springer).

Ces macromolécules possèdent donc des groupements thiol capables de chélater les métaux. C'est le cas par exemple du nickel, du cadmium et du cuivre, qui peuvent induire la synthèse de ces chélateurs, ainsi que d'autres ligands tels que le citrate, le malate, l'histidine ou la nicotianamine (Hall, 2002; Chen et al., 2009; Collins et al., 2010; Yusuf et al., 2011; Hossain et al., 2012). Une fois dans le cytosol, le métal forme un complexe avec les PC. Ce complexe est alors transporté dans la vacuole, principal lieu de stockage de composés toxiques, grâce aux transporteurs de type ABC (ATP-binding cassette transporter) (**Figure 4.2**). La famille des transporteurs CDF (*Cation Diffusion Facilitator*) serait impliquée dans le transport de Zn^{2+} et Cd^{2+} (ZAT) dans la vacuole. Également au niveau du tonoplaste, la présence probable d'antiports $\text{Cd}^{2+}/$

H⁺ et Ca²⁺/cation (CAX) a été signalée (Sanita di Toppi et al., 1999; Clemens, 2001; Hossain et al., 2012). Le cobalt a une faible mobilité au sein des tissus foliaires et il est principalement retenu au niveau du système vasculaire, par exemple chez le blé et la tomate. Un excès de cobalt n'induirait pas les mécanismes de défense communs au stress métallique. Les phytochélatines ne sont pas produites comme par exemple pour le Cd et le Cu. Il serait complexé dans le xylème (Collins et al., 2010).

Les protéines chaperones ont également leur importance dans l'acheminement des métaux essentiels vers les protéines dont le fonctionnement requiert le métal (Clemens, 2001). Les protéines chaperones *HSP* (*Heat Shock Proteins*) peuvent également avoir une fonction dans les mécanismes de protection et réparation des protéines en réponse aux stress (Hall, 2002). La synthèse d'acide salicylique (SA) sert de signal dans la régulation des processus cellulaires impliqués dans la résistance aux stress. Une augmentation de la teneur en proline, osmolyte organique, a également été constatée en réponse au stress métallique. Elle participe également, en tant qu'antioxydant, à la stabilisation de la membrane et protège les enzymes en chélatant le Cd. Son accumulation ne serait pas liée directement au métal mais à son incidence sur l'équilibre aqueux au sein de la plante (Tripathi et al., 2006; Singh et al., 2010; Martins et al., 2011; Hossain et al., 2012).

❑ Les systèmes antioxydatifs

Les métaux produisent directement ou indirectement des ROS. Ceci a pour conséquence l'induction des systèmes de défense antioxydatifs. Ces systèmes de défense sont composés, d'une part, de molécules antioxydatives non enzymatiques et, d'autre part, de mécanismes enzymatiques.

Les mécanismes non enzymatiques utilisent principalement l'ascorbate (AsA) et le glutathion (GSH). En réponse aux stress, la plante accroît l'activité et les teneurs en GSH. Le glutathion existe sous forme réduite (GSH) et sous forme oxydée (GSSG). Le groupement thiol de la forme GSH peut donner ses électrons aux molécules instables (ROS). Le GSH devient à son tour très réactif mais se lie directement avec une autre molécule de GSH pour former le GSSG. Le GSH est régénéré ensuite à partir de GSSG grâce à l'enzyme glutathion réductase (GR) en utilisant une molécule de NADPH. En présence de trop fortes teneurs en métaux, l'activité de la GR peut ne pas être suffisante et une carence en forme réduite GSH entraîne alors une augmentation des ROS (Jozefczal et al., 2012). Le GSH participe également au cycle Ascorbate-Glutathion, important dans la défense antioxydative en conditions normales. Il s'agit d'une succession d'oxydations et de réductions de AsA et GSH afin que le système enzymatique antioxydatif puisse fonctionner. Le tocophérol, les flavonoïdes, les alcaloïdes et les caroténoïdes ont notamment été déterminés comme agents antioxydatifs non-enzymatiques (Apel et al., 2004).

Les mécanismes enzymatiques regroupent les superoxydes dismutases (SOD), l'ascorbate peroxydase (APX), la glutathion peroxydase (GPX) et les catalases (CAT). Les SOD font partie de la première ligne de défense contre les ROS en transformant l'anion superoxyde O_2^- en H_2O_2 . Les APX, GPX et CAT convertissent ensuite le H_2O_2 en H_2O . L'APX fait partie du cycle non enzymatique Ascorbate-Glutathion et nécessite donc une régénération de ces molécules. Les GPX nécessitent également la régénération de glutathion à partir de GSSG. Les plantes possèdent de multiples gènes codant pour les SOD et les APX. Plusieurs isoformes existent dans les chloroplastes, mitochondries, peroxysomes ainsi que le cytosol et l'apoplaste. Les GPX se situent quant à elles dans le cytosol et les CAT, principalement dans les peroxysomes (Apel et al., 2004).

Les végétaux possèdent donc différents mécanismes physiologiques qui leur permettent de croître en milieu contaminé par les métaux. Grâce à l'étude de ces mécanismes de tolérance, la notion de phytoremédiation a pu être proposée comme technique permettant la gestion des risques liés aux pollutions métalliques.

4.4 La phytoremédiation

Le terme «phytoremédiation» a été introduit en 1983 suite à la découverte de plantes hyperaccumulatrices capables d'extraire une forte quantité de métaux présents dans le sol (Chaney et al., 1997 ; Raskin et al., 1997). La phytoremédiation est une technique biologique qui permet de lutter contre les risques liés aux polluants. Elle est basée sur l'utilisation des mécanismes de tolérance induits chez les végétaux (stratégies d'exclusion ou d'accumulation, voir § 4.3.3). Le terme phytoremédiation regroupe différentes techniques : la phytoextraction, la phytostabilisation, la phytovolatilisation, la rhizofiltration et la phytodégradation (Chaney et al., 1997 ; Pulford et al., 2003 ; Lone et al., 2008).

- Phytostabilisation : la plante réduit la mobilité et la disponibilité des polluants dans le sol. Elle maintient les métaux au niveau de la racine et de la rhizosphère;
- Phytoextraction : la plante extrait les polluants du sol et les concentre dans les parties récoltables;
- Rhizofiltration : les racines absorbent les polluants présents dans les eaux usées;
- Phytovolatilisation : la plante transforme et relâche certains polluants, essentiellement organiques, sous forme volatile;
- Phytodégradation : la plante et la microflore associée dégradent les polluants, essentiellement organiques, sous formes moins toxiques.

Nous nous focaliserons sur les deux premières techniques qui concernent essentiellement les ETM.

4.4.1 La phytostabilisation

Cette technique est basée sur la capacité qu'ont certaines plantes d'empêcher l'entrée des métaux en les immobilisant dans la rhizosphère ou de les séquestrer dans les cellules racinaires tout en limitant le transfert vers les parties supérieures de la plante (voir § 4.3.3). La teneur racinaire est donc supérieure à la teneur foliaire. Le concept de phytostabilisation se base sur le fait que la couverture végétale influence la stabilité des contaminants dans le sol mais, aussi, sur le fait qu'elle contribue à l'enrichissement en éléments nutritifs et à l'activité biologique du sol (Mertens et al., 2007 ; Vamerli et al., 2010).

Cette technique est souvent considérée pour la **revégétalisation** et la **valorisation** de sites rendus inutilisables par les contaminations (Kuzovkina et al., 2005). L'installation d'une couverture végétale réduit les risques pour la santé humaine et l'environnement en limitant la dispersion des contaminants vers les nappes phréatiques, l'atmosphère et les écosystèmes avoisinants. Éventuellement, des amendements réduisant la disponibilité des ETM, peuvent être combinés à la plantation de végétaux (Vangronsveld et al., 2009). Il ne s'agit pas d'une technique standardisée et chaque cas doit être évalué individuellement. L'application d'amendements, par exemple, peut avoir des effets indésirables tels que la destruction de la structure du sol ou l'immobilisation des éléments essentiels. Et lorsqu'il s'agit de sites à risque, il faut considérer la phytostabilisation comme une mesure temporaire, en attendant une remédiation définitive des sites en question (Vangronsveld et al., 2009 ; Vamerli et al., 2010).

4.4.2 La phytoextraction

Cette technique est basée sur la capacité de certaines plantes à capter, transporter et accumuler les métaux dans les tiges et les feuilles, grâce aux mécanismes de compartimentation et de chélation. Certaines espèces sont même capables de mobiliser les métaux afin de faciliter leur accumulation (Raskin et al., 1997). La capacité d'accumuler les métaux dépend de l'espèce végétale ou des écotypes/variétés d'une même espèce. Chaque espèce, ou même individu, possède des mécanismes d'absorption établis sur les caractéristiques génétiques, morphologiques, physiologiques et anatomiques de la plante.

Plusieurs points de vue sur la phytoextraction se sont donc développés. Le premier est axé sur l'étude des plantes « hyperaccumulatrices ». Ce sont des plantes capables d'accumuler jusqu'à 100 fois plus de métaux que les plantes non accumulatrices. Elles sont classées hyperaccumulatrices lorsque la biomasse contient plus de 1 % de Ni, de Zn ou de Mn ou plus de 100 mg Cd/kg. Il s'agit essentiellement d'espèces

appartenant à la famille des Brassicaceae, notamment les espèces des genres *Thlaspi*, *Alyssum* et *Arabidopsis*. Il a été suggéré que cette caractéristique évolutive procure une protection contre les attaques fongiques et d'insectes (Chaney et al., 1997; Pulford et al., 2003; Lone et al., 2008). L'utilisation de ces plantes particulières en phytoremédiation est cependant limitée par leur production assez restreinte de biomasse (Ernst, 1996). La plante idéale pour la phytoextraction devrait combiner une forte biomasse et une forte accumulation de polluants.

Un autre point de vue s'est alors développé sur l'utilisation d'essences ligneuses (saule, peuplier, aulne) qui, grâce à la forte production de biomasse, permettraient d'extraire une grande quantité de polluants présents dans le sol. Cette alternative est couplée également à l'utilisation d'amendements qui permettent de favoriser le captage des métaux (acide éthylène diamine tétra-acétique, EDTA) (Chaney et al., 1997; Pulford et al., 2003; Lone et al., 2008). La phytoextraction par production de biomasse est une technique lente, demandant plusieurs années, voire plusieurs décennies, avant de répondre aux objectifs d'assainissement. Il est donc plus judicieux de considérer la phytoextraction en combinaison avec les techniques physico-chimiques classiques afin de garantir l'assainissement du site dans des temps raisonnables et à moindres coûts (Meers et al., 2005).

4.5 Conclusion

Les ETM interfèrent avec de nombreuses voies physiologiques chez les êtres vivants, ce qui explique leur toxicité. Chez les plantes, certaines voies physiologiques permettent l'expression d'une tolérance aux ETM. Ces mécanismes de tolérance sont soit le blocage des ETM au niveau des racines ou, au contraire, l'absorption des ETM et leur accumulation dans les parties aériennes. Ces mécanismes sont à la base des techniques biologiques utilisées dans la remédiation des sols contaminés : la phytoremédiation. La phytoremédiation n'est pas un concept nouveau et, à l'heure actuelle, il continue d'évoluer alors même que le nombre de friches industrielles à réhabiliter augmente. Bien que cette technique soit étudiée depuis une vingtaine d'années, la phytoremédiation arrive seulement à être considérée comme technique durable potentielle. Cependant, c'est un processus lent, à valoriser sur le long terme et qui donc, nécessite un suivi des teneurs en ETM dans le sol et le végétal. Les projets de faisabilité *in situ* sont dès lors encore peu nombreux en Wallonie et sont donc encore à promouvoir.

4.6 Bibliographie

Apel K. & Hirt H., 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **55**, 373-399.

- Arduini I., Godbold D.L., Onnis A. & Stefani A., 1998. Heavy metals influence mineral nutrition of tree seedlings. *Chemosphere*, **36** (4-5), 739-744.
- Baize D., 1994. Teneurs totales en métaux lourds dans les sols français premiers résultats du programme ASPITET. *Courr. Environ. INRA*, **22**, 37-46.
- Baize D., 2009. Éléments en traces dans les sols : fonds géochimiques ; fonds pédogéochimiques et teneurs agricoles habituelles. Définitions et utilités. *Courr. Environ. INRA*, **57**, 63-72.
- Bouchet P., Guignard J.L. & Villard J., 1999. *Les champignons. Mycologie fondamentale et appliquée*. Paris : Masson.
- Brown M.T. & Wilkins D.A., 1985. Zinc tolerance in *Betula*. *New Phytol.*, **99** (1), 91-100.
- Caulfield L.E. & Black R.E., 2004. Zinc deficiency. In: Ezzati M., Lopez A.D., Rodgers A. & Murray C.J.L., eds. *Comparative Quantification of Health Risks. Global and regional burden of disease attribution to selected major risk factors*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 257-279.
- Chaney R.L. et al., 1997. Phytoremediation of soil metals. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **8** (3), 279-284.
- Chen C., Huang D. & Liu J., 2009. Functions and toxicity of nickel in plants: Recent advances and future prospects. *Clean Soil Air Water*, **37** (4-5), 304-313.
- Cherif J., Mediouni C., Ammar W.B. & Jemal F., 2011. Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in tomato plants (*Solanum lycopersicum*). *J. Environ. Sci.*, **23** (5), 837-844.
- Clemens S., 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, **212** (4), 475-486.
- Collins R.N. et al., 2010. Uptake, localization, and speciation of cobalt in *Triticum aestivum* L. (Wheat) and *Lycopersicon esculentum* M. (Tomato). *Environ. Sci. Technol.*, **44** (8), 2904-2910.
- Colpaert J.V. & Van Assche J.A., 1992a. Zinc toxicity in ectomycorrhizal *Pinus sylvestris*. *Plant Soil*, **143** (2), 201-211.
- Colpaert J.V. & Van Assche J.A., 1992b. The effects of cadmium and the cadmium-zinc interaction on the axenic growth of ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil*, **145** (2), 237-243.
- Colpaert J.V. & Van Assche J.A., 1993. The effects of cadmium on ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* L. *New Phytol.*, **123** (2), 325-333.
- De Foresta E. & Paul R., 1981. Phytotoxicité du cadmium. *Ann. Gembloux*, **87** (4), 201-210.
- Denny H.J. & Wilkins D.A., 1987a. Zinc tolerance in *Betula* spp. III. Variation in response to zinc among ectomycorrhizal associates. *New Phytol.*, **106** (3), 535-544.

- Denny H.J. & Wilkins D.A., 1987b. Zinc tolerance in *Betula* spp. IV. The mechanism of ectomycorrhizal amelioration of zinc toxicity. *New Phytol.*, **106** (3), 545-553.
- Dixon R.K. & Buschena C.A., 1988. Response of ectomycorrhizal *Pinus banksiana* and *Picea glauca* to heavy metals in soil. *Plant Soil*, **105** (2), 265-271.
- Drénou C., 2006. *Les Racines. Face cachée des arbres*. Paris : IDF.
- Duffus J.H., 2002. «Heavy metals» – A meaningless term? (IUPAC technical report). *Pure Appl. Chem.*, **74** (5), 793-807.
- Ernst W.H.O., 1996. Bioavailability of heavy metals and decontamination of soils by plants. *Appl. Geochem.*, **11** (1-2), 163-167.
- Fortin A.J., Plenchette C. & Piche Y., 2008. *Les Mycorhizes, la nouvelle révolution verte*. Quebec : MultiMondes et Paris : Quæ.
- Gamalero E., Lingua G., Berta G. & Glick B.R., 2009. Beneficial role of plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to heavy metal stress. *Can. J. Microbiol.*, **55** (5), 501-514.
- Hall J.L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.*, **53** (366), 1-11.
- Ho E., 2004. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. *J. Nutr. Biochem.*, **15** (10), 572-578.
- Hossain M.A., Piyatida P., da Silva J.A.T. & Fujita M., 2012. Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. *J. Bot.*, **2012**, 37 p.
- INERIS, 2003. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. <http://www.ineris.fr/substances/fr/page/21>
- INERIS, 2005. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. <http://www.ineris.fr/substances/fr/page/21>
- Jones M.D. & Hutchinson T.C., 1988. Nickel toxicity in mycorrhizal birch seedlings infected with *Lactarius rufus* or *Scleroderma flavidum*. I. Effects on growth, photosynthesis, respiration and transpiration. *New Phytol.*, **108** (4), 451-459.
- Jones D.L., Nguyen C. & Finlay R.D., 2009. Carbon flow in the rhizosphere: Carbon trading at the soil-root interface. *Plant Soil*, **321** (1-2), 5-33.
- Jozefczak M., Remans T., Vangronsveld J. & Cuypers A., 2012. Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *Int. J. Mol. Sci.*, **13** (3), 3145-3175.
- Juste C., 1988. Appréciation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments en trace du sol. *Sci. Sol*, **26** (2), 103-112.
- Kidd P. et al., 2009. Trace element behaviour at the root-soil interface: Implications in phytoremediation. *Environ. Exp. Bot.*, **67** (1), 243-259.

- Krupa P. & Piotrowska-Seget Z., 2003. Positive aspects of interaction between plants and mycorrhizal fungi originating from soils polluted with cadmium. *Polish J. Environ. Studies*, **12** (6), 723-726.
- Krznaric E. et al., 2009. Cd-tolerant *Suillus luteus*: a fungal insurance for pines exposed to Cd. *Environ. Poll.*, **157** (5), 1581-1588.
- Krznaric E. et al., 2010. Zn pollution counteracts Cd toxicity in metal-tolerant ectomycorrhizal fungi and their host plant, *Pinus sylvestris*. *Environ. Microbiol.*, **12** (8), 2133-2141.
- Kuzovkina Y.A. & Quigley M.F., 2005. Willows beyond wetlands: Uses of *Salix* L. species for environmental projects. *Water Air Soil Poll.*, **162** (1-4), 183-204.
- Lasat M.M., 2002. Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. *J. Environ. Qual.*, **31** (1), 109-120.
- Lone M.I., He Z.L., Stoffella P.J. & Yang X.E., 2008. Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: Progresses and perspectives. *J. Zhejiang Univ- Sc B*, **9** (3), 210-220.
- Marschner H., 1995. Beneficial Mineral Elements. In: Marschner H. (Ed.). *Mineral Nutrition of Higher Plants* (2^d Edition). London: Academic Press, 405-435.
- Martins L.L. et al., 2011. Oxidative stress induced by cadmium in *Nicotiana tabacum* L.: Effects on growth parameters, oxidative damage and antioxidant responses in different plant parts. *Acta Physiol. Plant.*, **33** (4), 1375-1383.
- Meers E. et al., 2005. Availability of heavy metals for uptake by *Salix viminalis* on a moderately contaminated dredged sediment disposal site. *Environ. Pollut.*, **137** (2), 354-364.
- Mertens J. et al., 2007. Tree species effect on the redistribution of soil metals. *Environ. Pollut.*, **149**, 173-181.
- Palit S., Sharma A. & Talukder G., 1994. The effects of cobalt on plants. *Bot.Rev.*, **60** (2), 149-181.
- Prasun R., Richa T., Reddy U. & Alok A., 2005. Detecting the heavy metal tolerance level in ectomycorrhizal fungi *in vitro*. *World J. Microbiol. Biotechn.*, **21** (3), 309-315.
- Pulford I.D. & Watson C., 2003. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees – a review. *Environ. Int.*, **29** (4), 529-540.
- Raskin I., Smith R.D. & Salt D.E., 1997. Phytoremediation of metals: Using plants to remove pollutants from the environment. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **8** (2), 221-226.
- Sánchez-Pardo B., Fernández-Pascual M. & Zornoza P., 2012. Copper microlocalisation, ultrastructural alterations and antioxidant responses in the nodules of white lupin and soybean plants grown under conditions of copper excess. *Environ. Exp. Bot.*, **84** (Dec.), 52-60.
- Sanità di Toppi L. & Gabbrielli R., 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.*, **41** (2), 105-130.

- Sell J., Kayser A., Schulin R. & Brunner I., 2005. Contribution of ectomycorrhizal fungi to cadmium uptake of poplars and willows from a heavily polluted soil. *Plant Soil*, **277** (1/2), 245-253.
- Sinclair S.A. & Krämer U., 2012. The zinc homeostasis network of land plants. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Mol. Cell Res.*, **1823** (9), 1553-1567.
- Singh V. et al., 2010. Proline improves copper tolerance in chickpea (*Cicer arietinum*). *Protoplasma*, **245** (1), 173-181.
- Singla-Pareek S.L. et al., 2006. Transgenic tobacco overexpressing glyoxalase pathway enzymes grow and set viable seeds in zinc-spiked soils. *Plant Physiol.*, **140** (2), 613-623.
- Tripathi B.N., Mehta S.K., Amar A. & Gaur J.P., 2006. Oxidative stress in *Scenedesmus* sp. during short- and long-term exposure to Cu²⁺ and Zn²⁺. *Chemosphere*, **62** (4), 538-544.
- Vamerali T., Bandiera M. & Mosca G., 2010. Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review. *Environ. Chem. Lett.*, **8** (1), 1-17.
- Vangronsveld J. et al., 2009. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **16** (7), 765-794.
- Vanobberghen F., 2011. *La phytoremédiation en Wallonie*. Waterloo, Belgique : Kluwer, 110 p.
- Yusuf M., Fariduddin Q., Hayat S. & Ahmad A., 2011. Nickel: An overview of uptake, essentiality and toxicity in plants. *Bull. Environ. Contam. Tox.*, **86** (1), 1-17.
- Zhao H. et al., 2012. The effects of copper, manganese and zinc on plant growth and elemental accumulation in the manganese-hyperaccumulator *Phytolacca americana*. *J. Plant Physiol.*, **169** (13), 1243-1252.



Étude du saule et de l'aulne pour la phytoremédiation des berges de cours d'eau non navigables

Evlard Aricia, Printz Bruno, Campanella Bruno,
Hausman Jean-Francois, Paul Roger

Résumé

Les éléments-traces métalliques (ETM) sont à l'origine d'une contamination chronique susceptible d'affecter la ripisylve, et ce d'autant plus si les individus présents ne développent pas de tolérance aux polluants. Les objectifs de cette étude étaient d'évaluer la tolérance de clones ligneux (saule et aulne) aux ETM, ainsi que d'étudier leur potentiel en termes d'extraction des ETM (phytoextraction). Deux dispositifs expérimentaux ont été mis en œuvre : l'un en milieu hydroponique, l'autre en substrat terreux. Le choix du saule et de l'aulne comme modèles d'étude a été dicté par leur forte productivité de biomasse mais également par leur bonne capacité à s'établir sur des sols contaminés par les ETM. Après une phase de croissance en milieu contaminé, le suivi de paramètres physiologiques (production de biomasse, fluorescence chlorophyllienne) et métaboliques (teneurs en ETM dans les différents organes, étude des sucres et des protéines solubles foliaires et/ou racinaires) indique que le saule et l'aulne peuvent présenter, selon le clone considéré, un intérêt variable en phytoremédiation. En effet, au regard des concentrations en ETM mesurées dans les tiges, certains clones de saule montrent une meilleure capacité à l'extraction que d'autres. Concernant l'aulne, nos résultats suggèrent qu'il serait plus performant pour une autre alternative de la phytoremédiation : la phytostabilisation. Enfin, une mycothèque de 91 souches fongiques associées aux racines de ces essences a été constituée au cours de ce projet. La tolérance de ces souches aux ETM a également été testée *in vitro*.

Mots-clés : *Salix*, *Alnus*, tolérance, bioremédiation, stabilisation du sol, élément-trace métallique, berges.

Potential of *Salix* and *Alnus* spp. for the phytoremediation of riverbanks

The presence of metal trace elements (MTE) leads to chronic contamination that can affect riparian trees, particularly because they do not develop tolerance mechanisms against these pollutants. This study sought to evaluate the tolerance of woody clones (willow, alder) used in the landscaping of riverbanks and to study their potential for extracting MTE (phytoextraction). Two experiments were

designed, one based on a hydroponic approach and the other using sediments drained from a riverbed. Willows (*Salix* spp.) and alders (*Alnus* spp.) were selected because of their ability to produce a high amount of biomass and to grow on MTE-contaminated soils. After a period of growth on contaminated substrates, various physiological characteristics (biomass production, chlorophyll fluorescence) and metabolic parameters (MTE content in different plant parts, leaf and/or root soluble carbohydrates and soluble proteins) were analysed. Our results suggested that, depending on the clone, members of the *Salix* and *Alnus* genera might be good candidates for phytoremediation. Depending on the MTE concentration measured in twigs, however, some willow clones were better at extracting the metals than others. These clones should therefore be preferentially selected for phytoextraction purposes. Our results with alders showed that, although they perform poorly in phytoextraction, they could be used in phytostabilization, another form of phytoremediation. Finally, a collection of 91 fungal strains associated with alder and willow roots was created and their tolerance to MTE was studied *in vitro*.

Keywords: *Salix*, *Alnus*, tolerance, bioremediation, soil stabilization, metallic elements, riverbanks.

5.1 Introduction

Les éléments-traces métalliques (ETM) peuvent être véhiculés par les rivières et accumulés dans les sédiments. Suite au curage ou au dépôt naturel des sédiments, les ETM tendent à s'accumuler au niveau des berges. La prise de conscience de cette problématique est nécessaire afin de procéder à une renaturation raisonnée des berges. L'amélioration de l'état de nos connaissances sur les capacités de tolérance aux polluants de type ETM d'essences ligneuses présentes naturellement dans la ripisylve est donc importante pour respecter, au moins partiellement, la biodiversité sur les berges. Aussi, pour se conformer aux normes de qualité des eaux de surface, il est indispensable de diversifier les outils permettant une gestion durable des écosystèmes que représentent les berges de cours d'eau non navigables. En ce sens, la phytoremédiation présente des avantages non négligeables dans ce contexte, notamment lorsque l'on peut envisager de faire appel à des clones locaux d'aulne et de saule, essences de choix de la ripisylve dans nos régions. La phytoremédiation (phytostabilisation et phytoextraction) est une technique biologique de lutte contre les polluants et est basée sur l'utilisation des mécanismes de tolérance induits chez les végétaux. En «phytostabilisation», les plantes limitant l'entrée du métal dans leurs tissus seront favorisées. À l'inverse, en «phytoextraction», seront sélectionnées celles ayant développé les mécanismes d'accumulation tissulaire (Evlard et al., 2013). Ce chapitre résume les résultats des expérimentations mises en place pour évaluer

la tolérance des clones ligneux de saule et d'aulne aux ETM dans la perspective de leur utilisation pour la phytoremédiation des berges de cours d'eau non navigables.

5.2 Le potentiel des ligneux

5.2.1 Le saule

Le genre *Salix* appartient à la famille des Salicaceae et comprendrait entre 330 et 500 espèces dans le monde. La distribution géographique du genre *Salix* s'étend sur tous les continents sauf l'Antarctique et l'Australie. Cette large distribution géographique est en partie due au comportement d'essence pionnière d'une majorité des espèces du genre. En Wallonie, deux groupes d'espèces sont bien représentés : le sous-genre *Salix* (*S. triandra*, *S. alba*, *S. fragilis* et *S. pentandra*) et le sous-genre *Vetrix* (*S. caprea*, *S. aurita*, *S. cinerea*, *S. atrocinerea*, *S. viminalis* et *S. purpurea*) (Mertens et al., 2011).

S'agissant d'espèces à croissance rapide, elles ont une grande efficacité dans la capture de carbone qui s'avère utile face au changement climatique. Le saule est un candidat de plus en plus étudié dans la restauration environnementale, la lutte contre l'érosion du sol et les inondations et, enfin, dans la production de biomasse. Parmi ses atouts, il constitue également un habitat et une source de nourriture pour divers organismes (insectes, herbivores, oiseaux) (Baudouin, 1993; Kuzovkina et al., 2005; FAO, 2008; Lambot, 2011).

En ce qui concerne la phytoremédiation, il est un candidat intéressant parce qu'il montre une bonne capacité à croître sur des sols contaminés par les ETM. L'accumulation des ETM varie entre les espèces du genre *Salix* (variabilité inter-spécifique) mais également au sein d'une même espèce (variabilité intra-spécifique). L'accumulation peut soit être limitée au niveau des racines soit concerner les tiges et les feuilles (Greger et al., 1999; Pulford et al., 2001; Hammer et al., 2003; Vervaeke et al., 2003; Cosio et al., 2006; King et al., 2006; Zacchini et al., 2009). Lorsqu'une espèce est sélectionnée pour être implantée dans un milieu donné, le choix des clones au sein de cette espèce peut alors être déterminé en fonction du rôle phytoremédiateur voulu (extraction ou stabilisation). Les individus des espèces adaptées à l'environnement choisi développant principalement des mécanismes d'exclusion sont à préconiser pour un rôle de stabilisateur de pollution (phytostabilisation). Leur biomasse est utilisable car peu de métaux s'accumulent dans la partie aérienne exploitable. En revanche, les individus accumulant davantage au niveau aérien peuvent être utilisés comme phytoextracteurs mais nécessitent des précautions dans la valorisation de la biomasse (Delcarte et al., 2013).

5.2.2 L'aulne

Le genre *Alnus* (Betulaceae) comprend environ 35 espèces en Europe, Asie, Afrique du Nord, Amérique du Sud et septentrionale. La croissance et le développement rapide, propres aux espèces de ce genre, ont conduit à la généralisation de leur utilisation en sylviculture, dans la fixation des talus (autoroutes) et des berges ou encore dans le domaine récréatif (parcs, jardins, haies libres) (Baudouin, 1993; Herzog, 2000; Lambinon et al., 2004).

Ces espèces sont souvent considérées comme pionnières, c'est-à-dire capables de coloniser des habitats offrant des conditions nutritives peu favorables au développement de la plupart des autres espèces. Cette faculté s'explique notamment par la capacité de ces essences à établir une association symbiotique avec des bactéries actinomycètes du genre *Frankia* (Heuvel, 2011) capables de réduire le diazote atmosphérique en ammoniac, molécule azotée directement assimilable par la plante-hôte (Franche et al., 2009). En contrepartie, les bactéries bénéficient des sucres solubles synthétisés au niveau des feuilles de cette plante-hôte et transportés dans le phloème vers les racines. Cette symbiose favorise en outre l'assimilation des minéraux par les racines du végétal en influant sur leur disponibilité dans le sol (Hamel, 2004; Lee et al., 2009).

Contrairement au saule, les propriétés de l'aulne en phytoremédiation ont été moins étudiées au cours de ces dernières années. Pourtant depuis une quinzaine d'années, les travaux menés par Dickinson (2000) en laboratoire et sur site contaminé avaient pu mettre en évidence une importante variabilité dans l'accumulation des métaux entre différentes espèces et notamment entre celles appartenant au genre *Alnus* (*A. cordata*, *A. incana*, *A. glutinosa*). En 2009, Lee et al. se sont intéressés plus précisément au potentiel phytoremédiateur de deux espèces d'aulne (*A. firma* et *A. hirsuta*). Si, après quatre années d'essais, l'étude a mis en évidence la bonne faculté de l'aulne à se développer sur des surfaces contaminées, elle a également montré qu'une forte production de biomasse et un système racinaire bien développé ne suffisent pas pour une dépollution efficace des sols. Même si ces conditions s'avèrent profitables à des fins de phytoremédiation, les plantes doivent de plus être adaptées aux conditions agro-climatiques de la zone à traiter. Dans ce cas, la sélection de clones tolérants aux conditions locales (contaminant(s) et conditions pédoclimatiques) apparaît être un élément-clé de la réussite des techniques de dépollution des sols par l'aulne. Cela passe par la création d'une filière de clones ligneux d'origine certifiée (Druart et al., 2013).

Enfin, et à l'image de la plupart des essences ligneuses, les études menées sur l'aulne ont montré que ce genre n'est pas un candidat efficace à des fins de phytoextraction mais qu'il pourrait s'avérer intéressant pour une réhabilitation des sols par phytostabilisation (Rosselli et al., 2003; Mertens et al., 2004).

5.3 Les expériences mises en place pour l'étude de tolérance des ligneux aux éléments-traces métalliques

La tolérance d'aulnes et de saules aux ETM a été étudiée en vue d'utiliser ces ligneux pour la phytoremédiation des berges de cours d'eau non navigables. Pour ce faire, deux dispositifs expérimentaux ont été mis en œuvre, un premier privilégiant une approche très contrôlée en milieu hydroponique, et un second, plus proche des conditions naturelles, basé sur une approche en substrat terreux. L'influence du cadmium et du zinc, éléments choisis pour leur occurrence très fréquente en tant que polluant, sur la microflore associée aux ligneux a également été étudiée.

5.3.1 Expériences en hydroponie sur l'aulne

Le dispositif hydroponique est généralement préféré à une étude en sol dans le but de contrôler de manière précise les concentrations en ions disponibles pour les plantes. Il permet en outre de s'affranchir des interactions liées à la présence de complexes susceptibles de réduire la biodisponibilité des cations à l'étude (January et al., 2008). Ce mode de culture assure donc une plus grande homogénéité entre les traitements.

Trois clones (deux clones de *A. glutinosa* et un clone de *A. incana*) âgés de 3 ans ont été sélectionnés et cultivés pendant une durée de 2 mois en milieu hydroponique, contaminé ou non par un mélange de cadmium (10 μM), de nickel (20 μM) et de zinc (200 μM). Le choix de cette contrainte a été dicté par la présence récurrente de ces trois ETM au niveau des anciens sites industriels de la Grande Région (Lorraine, Luxembourg, Wallonie). Les analyses physiologiques (contenu en métaux des différents tissus, production de biomasse, croissance hebdomadaire) et moléculaires (étude des protéomes foliaire et racinaire ainsi que des sucres du métabolisme primaire) ont montré une réponse distincte de chacun de ces trois clones vis-à-vis de la même contrainte polymétallique. Une conclusion majeure de cette étude est que les variations en termes de production de biomasse observées en milieu sain et en milieu contaminé ne suffisent pas à prédire la tolérance des clones aux ETM. Les analyses moléculaires suggèrent, au contraire, qu'une diminution de productivité puisse être notamment liée à un bouleversement général du métabolisme ou, à l'inverse, être la conséquence d'une réponse active du végétal pour faire face à la contrainte imposée. Ces résultats indiquent que la sélection appropriée des clones, notamment par suivi de marqueurs moléculaires de stress, constituerait un facteur important pour la réhabilitation durable des zones contaminées.

5.3.2 Expériences en substrat terreux sur le saule et l'aulne

Un produit de dragage a été utilisé comme substrat au cours des expériences afin de se placer à la fois dans un contexte réaliste d'une contamination historique, mais aussi de disposer d'un équilibre physico-chimique installé depuis au moins 10 ans dans le sédiment. La biodisponibilité des ETM est donc plus réaliste que celle apportée par un substrat contaminé artificiellement. De plus, la texture de cette boue, en partie formée par les dépôts alluvionnaires des cours d'eau, est proche de celle retrouvée dans les sols des berges, au moins dans leur partie inférieure. Plusieurs études confirment que la phytoremédiation sur les boues de dragage est potentiellement intéressante (Rosselli et al., 2003 ; Dickinson et al., 2005). L'hypothèse de départ était que les résultats obtenus puissent être transposés dans le contexte « berges ». Une série d'aulnes (37 dont 7 d'origine luxembourgeoise et 4 d'origine française) et de saules (26) a donc été plantée, à partir de boutures enracinées, dans des conditions similaires de culture, à raison de trois réplicats par clone. Les tiges, nouvellement produites après 8 mois de croissance, ont été séchées et pesées. Les clones ont ensuite été classés selon les résultats obtenus en termes de productivité annuelle de biomasse. Leur contenu en ETM a également été dosé.

□ Le saule

La production de biomasse annuelle des 26 clones de saule variait entre $66,3 \pm 12,7$ mg de matière sèche pour le plus faible producteur et 760 ± 121 mg de matière sèche pour le plus fort producteur. La concentration en ETM dans les tiges annuelles variait également d'un individu à l'autre. Suite à ces premières observations, un groupe de quatre faibles producteurs de biomasse (< 150 mg de matière sèche) et un groupe de quatre forts producteurs de biomasse (> 500 mg de matière sèche) ont été choisis sur base d'un test de sélection statistique afin de comparer leurs réponses physiologiques (fluorescence chlorophyllienne, contenu en métaux dans les tiges annuelles) et moléculaires (protéome foliaire, métabolites du métabolisme primaire). La conclusion principale découlant de ces expérimentations est que la sélection des clones ne doit pas se baser uniquement sur la forte production de biomasse. Et ceci pour trois raisons :

- Un clone, bien qu'il puisse produire une grande quantité de biomasse en présence d'ETM, ne concentre ($\mu\text{g/g}$) pas plus les métaux dans ses tiges pour autant. Malgré tout, la forte production de biomasse peut augmenter la quantité de métaux extraite du sol (μg) (Ekvall et al., 2003) ;
- Un clone présentant une biomasse réduite par rapport à un autre, alors qu'ils sont exposés à la même contrainte métallique, montre en fait des mécanismes de tolérance (Evlard et al., 2013) ;

- Enfin, un clone à plus faible production de biomasse peut montrer de plus fortes teneurs en métaux dans les tiges ($\mu\text{g/g}$) et même une plus forte extraction (μg) de ces éléments, comme dans le cas du plomb, par exemple.

Les clones produisant le plus de biomasse concentrent le moins les ETM dans la partie récoltable. Ceci constitue dès lors un critère intéressant en vue de la valorisation de la biomasse issue de sites contaminés (Delcarte et al., 2013).

□ L'aulne

Les résultats observés chez l'aulne sont différents :

- La plupart des clones (28) ne présentaient pas de différence statistiquement significative au niveau de leur production de biomasse en présence d'ETM ($673,1 \pm 49,2$ mg de matière sèche). Une ségrégation des clones suivant leur biomasse n'était donc pas possible ;
- Les différences de concentrations en ETM dans les tiges étaient également moins contrastées entre les clones d'aulne. Alors que quelques clones de saule étaient mis en évidence grâce aux fortes teneurs en métal observées dans leurs tiges, cela n'était pas le cas de l'aulne ;
- De plus, les teneurs en métaux retrouvées dans les tiges sont moins importantes par rapport à celles retrouvées chez le saule. La teneur en cadmium, par exemple, ne dépasse pas $0,16 \mu\text{g Cd/g}$ de matière sèche, alors que chez le saule, la teneur atteignait déjà $0,72 \mu\text{g Cd/g}$ de matière sèche pour la plus faible des valeurs. Les mêmes tendances ont été observées pour le zinc et le plomb ;
- Cependant, certains clones d'aulne indiquent des teneurs en cuivre supérieures à celles retrouvées chez le saule. En effet, la teneur maximale observée chez le saule était de $88,6 \mu\text{g Cu/g}$ de matière sèche alors que chez l'aulne elle atteignait $240,05 \mu\text{g Cu/g}$ de matière sèche.

La conclusion principale est que les clones locaux d'aulne choisis au cours de l'expérience sont capables de croître en présence d'ETM. Nos résultats corroborent également ceux obtenus en hydroponie et dans d'autres études, appuyant le rôle potentiel de l'aulne en phytoremédiation en tant que phytostabilisateur du cadmium et du zinc.

Lorsqu'ils sont transférés vers les parties aériennes, les ETM peuvent se concentrer au niveau du feuillage. Ces feuilles, en tombant et en se décomposant, recyclent les métaux au niveau du sol, ce qui peut également influencer l'absorption des éléments essentiels (Berg et al., 2001 ; Meers et al., 2005 ; Vandecasteele et al., 2007 ; Evlard et al., 2013).

❑ Transfert des ETM vers les feuilles

Une seconde expérience a donc été menée suivant la même méthodologie que la précédente avec les clones ayant produit le plus de biomasse afin de quantifier le transfert des ETM dans leurs feuilles. La teneur en métaux a été dosée, dans un premier temps, au niveau des tiges annuelles, et, dans un deuxième temps, au niveau des feuilles. Notre étude indique, chez le **saule**, une mobilisation du plomb et du zinc vers les feuilles. Les teneurs peuvent doubler dans le cas du plomb et quadrupler dans le cas du zinc. Les tiges et les feuilles présentent les mêmes teneurs en cadmium dans leurs matières sèches. À l'inverse, la teneur en cuivre est plus importante dans les tiges que dans les feuilles. Les teneurs en cadmium dans les tiges de l'**aulne** restent très faibles comparées au saule. La mobilité du cadmium est restreinte et les teneurs foliaires restent très faibles pour les deux essences. Le plomb se retrouve, comme chez le saule, jusqu'à deux fois plus concentré dans les feuilles. Le zinc est présent, pour certains clones, dans les mêmes proportions entre les feuilles ou les tiges. Pour d'autres, il reste davantage concentré au niveau des tiges. Enfin, les tiges et les feuilles présentent les mêmes teneurs en cuivre. Une mobilisation des métaux vers les feuilles a également été mise en évidence dans d'autres études sur le saule (Meers et al., 2005 ; 2007) et, dans ce sens, des stratégies de gestion de la biomasse doivent être proposées.

5.3.3 Évaluation de la tolérance aux ETM chez les souches fongiques associées aux racines d'aulnes et de saules

La contamination du sol par les ETM peut entraîner l'apparition de conditions stressantes pour la plante comme pour les micro-organismes de la rhizosphère (voir § 3.3). Cependant, en milieu contaminé, des études ont montré que des champignons symbiotiques peuvent influencer favorablement la tolérance des plantes aux métaux (Fitz et Wenzel, 2002 ; Baum et al., 2006). En 2009, une campagne de prélèvement fut réalisée pour récolter des souches fongiques associées aux racines des saules et des aulnes. Les lieux d'échantillonnage ont été définis en fonction des analyses des sédiments de cours d'eau et de la provenance des pieds des clones disponibles au CRA-W (Druart et al., 2013). Chaque échantillon a été caractérisé par sa position GPS et l'espèce ligneuse associée. La profondeur de sondage était de maximum 20 cm. Nous avons, à ce jour, 91 souches fongiques, conservées *in vitro*. La tolérance aux métaux lourds de ces souches fongiques a été évaluée en mesurant leur capacité de croissance en milieu de culture liquide contaminé par différentes concentrations en cadmium dans un premier temps et en zinc dans un second temps (Evlard et al., 2011 ; Evlard et al., 2013). Le cadmium a été choisi, d'une part, pour le risque qu'il représente pour la contamination de la chaîne alimentaire et, d'autre part, pour sa présence dans les sols associés à la ripisylve. La détermination *in vitro* de la tolérance des souches

fongiques aux métaux ne prédit pas nécessairement la tolérance au métal une fois le champignon associé aux ligneux (Colpaert et al., 1992). Cependant, procéder au criblage d'un ensemble de souches fongiques afin de déterminer la présence des souches tolérantes est un bon début dans l'intégration des associations dans le processus de phytoremédiation. Ensuite, il est nécessaire de vérifier leur rôle dans la tolérance de la plante-hôte. Suite à nos travaux, des souches fongiques ont pu être mises en évidence par rapport à leur capacité à croître en présence de cadmium. Vingt souches ont pu être sélectionnées parmi ces souches « non sensibles » au cadmium et ont été identifiées comme des endophytes appartenant principalement aux genres *Cylindrocarpon*, *Leptodontidium* et *Cryptosporiopsis*. L'ensemble des résultats sont présentés dans Evlard et al., 2011 et Evlard, 2013.

5.4 Conclusions et perspectives pour la phytoremédiation des berges

Le saule, par sa forte production de biomasse et par son aptitude à croître en présence d'ETM, est très souvent conseillé en phytoremédiation. Nos résultats indiquent une croissance et une accumulation des ETM variables entre clones. Ils corroborent ceux obtenus dans la littérature. Chaque clone, étudié dans le cadre de nos expérimentations, peut donc être utilisé en phytoremédiation en fonction des objectifs.

Dans un but d'extraction des ETM du sol, les clones de saule sont plus intéressants par rapport aux aulnes et doivent être sélectionnés en fonction de leur capacité d'extraction, et non pas uniquement sur leur capacité à produire de la biomasse. Le choix des clones peut également être affiné en fonction du métal visé. Dans le cas du plomb, par exemple, certains clones sont plus conseillés que d'autres. La capacité du saule à extraire le métal du sol est d'autant plus efficace que sa teneur dans le sol est modérée (Pulford et al., 2003). Cependant, plusieurs essais sur sites contaminés ont pu montrer la possibilité d'assainissement des sols par phytoextraction là où les teneurs en cadmium dépassaient la valeur d'intervention du Décret Sol et ce, grâce aux taillis à courte rotation de saules (Vervaeke et al., 2003; Rosselli et al., 2003; Dickinson et al., 2005; French et al., 2006). La phytoremédiation peut donc répondre à des objectifs d'assainissement via la phytoextraction en utilisant des clones ayant la capacité d'accumuler les polluants. Mais, il s'agit là d'une technique d'assainissement lente, à faire valoir sur le très long terme (centaines d'années) et nécessitant un suivi régulier de l'évolution des teneurs en ETM. La phytoextraction par le saule est donc remise en question. Evlard (2013) propose dès lors d'autres alternatives dans l'utilisation du saule dont la phytostabilisation. Enfin, cette technique exige un calendrier de récoltes des parties ligneuses et foliaires

contenant les ETM. En fonction des teneurs présentes dans le bois, plusieurs voies de valorisation peuvent être envisagées. Celles-ci ont été étudiées spécifiquement pour les clones choisis dans nos expérimentations en utilisant les teneurs présentes dans leur tige. Elles sont développées par J. Delcarte et al. (2013). Néanmoins, il ressort de cette analyse de faisabilité, que la biomasse ne contient pas suffisamment de métaux pour être classée comme « déchets » et qu'elle peut, par conséquent, être utilisée dans une valorisation énergétique.

Au regard de la variabilité génétique existant au sein du genre *Alnus*, de sa bonne implantation sur les sols pollués, de sa présence naturelle sur les sites contaminés de la Grande Région et de la faible exportation d'ETM vers ses parties aériennes, nos études suggèrent que l'aulne soit maintenu dans les programmes de gestion naturelle des sites contaminés et plus particulièrement dans le cadre de projets de phytostabilisation. Il en est de même pour les saules qui présentent des caractéristiques d'adaptation similaires et ayant montré de plus faibles teneurs en métaux dans leur biomasse. Cette technique viserait surtout à empêcher le lessivage des polluants vers les zones aquifères environnantes ou leur dispersion aérienne. Cette technique semble particulièrement adaptée à la réhabilitation des sites industriels, désaffectés ou en passe de le devenir, que l'on trouve au niveau de la Région Wallonne, du Nord de la France et du Grand-Duché de Luxembourg.

Ces sites, principalement d'origine sidérurgique, ont en effet marqué le paysage avec la présence de crassiers renfermant d'importantes quantités d'ETM et donnant naissance à des pollutions résiduelles, faibles mais chroniques, au niveau des territoires concernés. Ces milieux, défavorables au développement des principales espèces locales, ont cependant permis le développement d'une faune et d'une flore rares que les agences environnementales incitent aujourd'hui à préserver (<http://www.terril-mine.eu>). Parmi ces sites, plusieurs pourraient ainsi prétendre au statut de réserve naturelle pour favoriser la conservation de cette diversité florale et animale tout en limitant le transfert et la dispersion des ETM. La phytostabilisation peut donc être envisagée afin de fixer les polluants tout en valorisant ces sites contaminés d'un point de vue biologique, esthétique et/ou récréatif.

Les berges de cours d'eau non navigables représentent des sites originaux pouvant être gérés par phytoremédiation. De plus, intégrer cette technique biologique, en choisissant les clones appropriés, dans la revégétalisation des berges de cours d'eau rencontre les objectifs de la Directive Européenne de l'eau (Directive Cadre sur l'Eau 2000/60/CE) qui impose aux États membres d'améliorer la qualité des eaux de surface selon un calendrier strict. Cependant, il est important de considérer les contraintes spécifiques liées aux berges (espace disponible, type de plantation, accessibilité, possibilité de récolte, teneurs en ETM, etc.). La plantation visant la stabilisation physique des berges est déjà une façon d'appliquer la phytoremédiation

par phytostabilisation, surtout là où le taillis à très courte rotation ne peut être envisagé. De plus, la valorisation paysagère, ainsi que l'aspect économique induit par les plantations de ligneux, constituent des arguments favorables pour l'utilisation de ce type particulier de phytoremédiation.

Remerciements

Les recherches présentées ci-dessus ont été menées dans le cadre du projet Interreg IV-A Grande Région et financées par le FEDER. Jean-Francois Hausman et Bruno Printz remercient également le Fonds National de la Recherche, Luxembourg, pour le financement partiel de leurs activités dans le cadre du projet de recherche ENERREM-CORE call 2008. Aricia Evlard et Bruno Campanella remercient Paul-Henry Fally et Yves Libert (Direction des recherches hydrauliques [DGO2], Service Publique de Wallonie) pour l'accès aux produits de dragage, l'Unité de Génie biologique du Centre wallon de Recherches agronomiques pour l'approvisionnement en boutures, l'Unité de Statistique, Informatique et Mathématique appliquées (GxABT, ULg) et le BEAGx (GxABT, ULg) pour les analyses de sol. Les auteurs remercient sincèrement les personnes suivantes : Cédric Guignard, Johanna Ziebel pour les analyses en métaux, Laurent Solinhac, Kjell Sergeant et Sébastien Planchon pour leur aide technique.

5.5 Bibliographie

- Baudouin J.C., 1993. *Les plantes ligneuses. Vol II, Les arbres feuillus et quelques arbustes*. Namur, Belgique : Ministère de la Région Wallonne, DNF.
- Baum C., Hrynkiewicz K., Leinweber P. & Meissner R., 2006. Heavy-metal mobilization and uptake by mycorrhizal and nonmycorrhizal willows (*Salix dasyclados*). *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, **169** (4), 516-522.
- Berg B. & Greger M., 2001. Investigations on the relation between biomass production and uptake of Cd, Cu and Zn. *In*: Greger M., Landberg T. & Berg B., eds. *Salix clones with different properties to accumulate heavy metals for production of biomass*. Edsbruk, Stockholm: Akademityrck AB, p. 38-42.
- Colpaert J.V. & Van Assche J.A., 1992. Zinc toxicity in ectomycorrhizal *Pinus sylvestris*. *Plant Soil*, **143** (2), 201-211.
- Cosio C., Vollenweider P. & Keller C., 2006. Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.). I. Macrolocalization and phytotoxic effects of cadmium. *Environ. Exp. Bot.*, **58** (1-3), 64-74.
- Delcarte J., Gossiaux L. & Evlard A., 2013. Valorisation énergétique du bois produit à des fins de phytoremédiation. *In* : Druart Ph., Husson C. & Paul R. (Eds.). *Renaturation des berges de cours d'eau et phytoremédiation*. Gembloux, Belgique : Presses agronomiques de Gembloux.
- Dickinson N.M., 2000. Strategies for sustainable woodland on contaminated soils. *Chemosphere*, **41** (1-2), 259-263.
- Dickinson N.M. & Pulford I.D., 2005. Cadmium phytoextraction using short-rotation coppice *Salix*: The evidence trail. *Environ. Int.*, **31** (4), 609-613.

- Druart Ph. et al., 2013. Construction et développement d'une filière de production d'écotypes ligneux pour l'application des techniques végétales à la renaturation des berges de cours d'eau. *In* : Druart Ph., Husson C. & Paul R. (Eds.). *Renaturation des berges de cours d'eau et phytoremédiation*. Gembloux (Belgique) : Presses agronomiques de Gembloux.
- Ekvall L. & Greger M., 2003. Effects of environmental biomass-producing factors on Cd uptake in two Swedish clones of *Pinus sylvestris*. *Environ. Pollut.*, **121** (3), 401-411.
- Evlard A., 2013. *Le potentiel du saule pour la phytostabilisation des sols pollués par les éléments-traces métalliques*. Thèse de doctorat : Université de Liège (Belgique).
- Evlard A., Campanella B. & Paul R., 2011. Effects of Cd on ectomycorrhizal fungal growth. Efficacy of *in vitro* screening experiment. *Agrochimica*, **55** (2), 85-93.
- Evalrd A. & Campanella B., 2013. Les dangers des éléments-traces métalliques et les techniques de phytoremédiation. *In* : Druart Ph., Husson C. & Paul R. (Eds.). *Renaturation des berges de cours d'eau et phytoremédiation*. Gembloux, Belgique : Presses agronomiques de Gembloux.
- FAO, 2008. *Synthèse des rapports d'activité nationaux, préparée pour la 23^{ème} Session de la Commission internationale du peuplier, organisée conjointement par la FAO, et par la Beijing Forestry University, la State Forest Administration of China et la Chinese Academy of Forestry; Beijing, Chine, 27-30 octobre 2008*. Commission internationale du peuplier, Document de travail IPC/6, Division de la gestion des forêts. Rome : FAO (non publié).
- Fitz W.J. & Wenzel W.W., 2002. Arsenic transformations in the soil-rhizosphere-plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. *J. Biotechnol.*, **99** (3), 259-278.
- Franche C., Lindstrom K. & Elmerich C., 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil*, **321**, 35-59.
- French C.J., Dickinson N.M. & Putwain P.D., 2006. Woody biomass phytoremediation of contaminated brownfield land. *Environ. Pollut.*, **141** (3), 387-395.
- Greger M. & Landberg T., 1999. Use of willow in phytoextraction. *Int. J. Phytorem.*, **1** (2), 115-123.
- Hamel C., 2004. Impact of arbuscular mycorrhizal fungi on N and P cycling in the root zone. *Can J. Soil Sci.*, **84**, 383-395.
- Hammer D., Kayser A. & Keller C., 2003. Phytoextraction of Cd and Zn with *Salix viminalis* in field trials. *Soil Use Manage.*, **19** (3), 187-192.
- Herzog F., 2000. L'importance des arbres pérennes pour l'équilibre des paysages agricoles d'Europe du Nord. *Unasylva*, **200** (51), 42-48.
- Heuvel B.D.V., 2011. *Alnus*. *In*: Kole C., (Ed.). *Wild crop relatives: genomic and breeding resources*. Berlin – Heidelberg: Springer, 1-14.

- January M.C., Cutright T.J., Keulen H.V. & Wei R., 2008. Hydroponic phytoremediation of Cd, Cr, Ni, As, and Fe: Can *Helianthus annuus* hyperaccumulate multiple heavy metals? *Chemosphere*, **70** (3), 531-537.
- King R.F., Royle A., Putwain P.D. & Dickinson N.M., 2006. Changing contaminant mobility in a dredged canal sediment during a three-year phytoremediation trial. *Environ. Pollut.*, **143** (2), 318-326.
- Kuzovkina Y.A. & Quigley M.F., 2005. Willows beyond wetlands: Uses of *Salix* L. species for environmental projects. *Water Air Soil Pollut.*, **162** (1-4), 183-204.
- Lambinon J., Delvosalle L. & Duvigneaud J., 2004. *Nouvelle flore de la Belgique, du Grand-Duché de Luxembourg, du Nord de la France et des régions voisines*. Meise, Belgique : Jardin botanique national de Belgique.
- Lambot F., 2011. Le saule dans le génie végétal : maintien des berges et talus. *For. Wallonne*, **112**, 29-35.
- Lee D.B. et al., 2009. Phytoremediation of heavy-metal-contaminated soil in a reclaimed dredging area using alnus species. *J. Ecol. Field Biol.*, **32**, 267-275.
- Meers E. et al., 2005. Availability of heavy metals for uptake by *Salix viminalis* on a moderately contaminated dredged sediment disposal site. *Environ. Pollut.*, **137** (2), 354-364.
- Meers E. et al., 2007. Potential of five willow species (*Salix* spp.) for phytoextraction of heavy metals. *Environ. Exp. Bot.*, **60** (1), 57-68.
- Mertens J., Vervaeke P., Schrijver A.D. & Luysaert S., 2004. Metal uptake by young trees from dredged brackish sediment: limitations and possibilities for phytoextraction and phytostabilisation. *Sci. Total Environ.*, **326**, 209-215.
- Mertens P., Elsocht P., Ramelot F. & Stordeur G., 2011. Diversité et détermination des saules en Wallonie. *For. Wallonne*, **112**, 7-19.
- Pulford I.D., Watson C. & McGregor S.D., 2001. Uptake of chromium by trees: Prospects for phytoremediation. *Environ. Geochem. Health*, **23** (3), 307-311.
- Pulford I.D. & Watson C., 2003. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees – a review. *Environ. Int.*, **29** (4), 529-540.
- Rosselli W., Keller C. & Boschi K., 2003. Phytoextraction capacity of trees growing on a metal contaminated soil. *Plant Soil*, **256** (2), 265-272.
- Vandecasteele B., Quataert P. & Tack F.M.G., 2007. Uptake of Cd, Zn and Mn by willow increases during terrestrialisation of initially ponded polluted sediments. *Sci. Total Environ.*, **380** (1-3), 133-143.
- Vervaeke P. et al., 2003. Phytoremediation prospects of willow stands on contaminated sediment: A field trial. *Environ. Pollut.*, **126** (2), 275-282.
- Zacchini M. et al., 2009. Metal tolerance, accumulation and translocation in poplar and willow clones treated with cadmium in hydroponics. *Water Air Soil Pollut.*, **197** (1-4), 23-34.



Apports de la culture *in vitro* à l'amélioration de la phytoremédiation : cas de l'aulne glutineux le long des berges de cours d'eau

Bajji Mohammed, Druart Philippe

Résumé

Un des objectifs du projet ECOLIRIMED (Interreg IV-A Grande Région : Écotypes ligneux de rivières et phytoremédiation) est l'amélioration *in vitro* de la phytoextraction des métaux lourds par des écotypes ligneux dont l'aulne glutineux (*Alnus glutinosa*). Après avoir constitué une collection de clones et optimisé les conditions de culture *in vitro* (prolifération et régénération par bourgeonnement adventif), deux démarches furent poursuivies pour la sélection de plants d'aulne glutineux pourvus à la fois d'un niveau de tolérance aux métaux lourds permettant leur développement en milieu pollué et de bonnes capacités d'extraction et d'accumulation de ces polluants dans le bois. La première démarche a consisté à comparer le comportement *in vitro* de 15 clones d'aulne glutineux en présence de 150 µM de cadmium (Cd) afin d'identifier les clones les plus appropriés pour la phytoextraction des métaux lourds. La seconde démarche a consisté à obtenir, par sélection *in vitro* en présence du Cd comme agent de sélection, des régénérants d'aulne glutineux résistants. Pour confirmer la faisabilité d'un assainissement des berges de cours d'eau par l'aulne glutineux, le comportement des clones et des régénérants les plus prometteurs doit être évalué sur sols pollués.

Mots-clés. *Alnus glutinosa*, phytoremédiation, phytoextraction, métal lourd, cadmium, variation somaclonale, culture *in vitro*, pollution du sol, berge.

Contributions of *in vitro* culture to the improvement of phytoremediation: the case of black alder (*Alnus glutinosa* [L.] Gaertn.) along watercourse banks

One of the objectives of the ECOLIRIMED project (Interreg IV-A Greater Region: River woody ecotypes and phytoremediation) is the *in vitro* improvement of heavy metal phytoextraction by woody ecotypes, including black alder. Once an *in vitro* collection of clones had been built up and the right culture conditions prevailed (proliferation and regeneration by adventitious budding), two approaches were used to select black alder plants with a level of tolerance to heavy metals that would allow their development in polluted environment and with a good ability to extract and accumulate these pollutants in the wood. The first approach involved comparing the

in vitro behavior of 15 black alder clones in the presence of 150 μM cadmium (Cd) in order to identify those most suitable for the phytoextraction of heavy metals. The second approach involved obtaining, by *in vitro* selection in the presence of Cd as a selection agent, resistant regenerants of black alder. In order to confirm the feasibility of black alders remediating watercourse banks, the behavior of the most promising clones and regenerants need to be evaluated on polluted soils.

Keywords: *Alnus glutinosa*, phytoremediation, phytoextraction, heavy metals, cadmium, somaclonal variation, *in vitro* culture, soil pollution, riverbanks.

6.1 Introduction

De nombreuses régions d'Europe héritent d'un long passé industriel au cours duquel les métaux lourds se sont accumulés dans les sols, sont véhiculés par les cours d'eau et risquent d'atteindre les eaux souterraines à des degrés divers. Pour restaurer ces milieux pollués, des techniques physico-chimiques peuvent être envisagées (Roudier, 2004 ; ADEME, 2011) mais restent très coûteuses et complexes à mettre en place. En plus, elles peuvent être très agressives pour la faune et la flore ainsi que pour les constituants organiques du sol au point de compromettre ses fonctions. C'est ainsi que l'on s'oriente de plus en plus vers la phytoremédiation, basée sur l'utilisation des plantes pour éliminer ou rendre moins toxiques des polluants présents dans les sols (Salt et al., 1995 ; Lasat, 2002 ; Alkorta et al., 2004 ; Vassilev et al., 2004 ; Mench et al., 2006). Cette méthode constitue une alternative moins onéreuse et plus respectueuse de l'environnement. Elle peut être envisagée à titre pérenne ou à titre provisoire en attente d'un traitement classique. Dans le cas des métaux lourds, la phytoremédiation se décline en trois catégories principales : la phytoextraction (absorption des polluants au niveau racinaire suivi du transfert et de la concentration dans les parties récoltables de la plante), la phytostabilisation (immobilisation des polluants par la plante pour limiter leur dispersion dans le milieu environnant) et la rhizofiltration (même concept que la phytoextraction mais spécifique à la dépollution des eaux de surface ou souterraines).

Bien que l'essor de la phytoremédiation soit particulièrement bien marqué outre-Atlantique (Suresh et al., 2004), son développement en Europe est appelé à se développer pour des raisons évidentes de respect de l'environnement et d'acceptabilité économique. C'est dans cet esprit que le projet ECOLIRIMED (Interreg IV-A Grande Région) a vu le jour. Un de ses principaux objectifs est de prévenir les dégâts liés aux métaux lourds s'accumulant dans l'eau, les lits de rivières et sur les berges de Wallonie, du Grand-Duché du Luxembourg et de Lorraine. Le moyen visé est la phytoextraction par des écotypes ligneux. Ce travail fait le point sur les recherches réalisées dans le cadre de ce projet dans une optique d'amélioration de la phytoextraction par l'aune glutineux en utilisant la culture *in vitro* comme système d'étude.

6.2 L'aulne glutineux comme écotype ligneux de choix

6.2.1 Rôle stabilisateur et « phytoremédiateur » de l'aulne glutineux

L'aulne glutineux est l'une des essences ligneuses locales, retenue dans le cadre du projet ECOLIRIMED. Ses caractéristiques et leurs implications pour les pratiques sylvicoles ont été récemment rapportées (Claessens et al., 2010). Son enracinement profond et sa bonne tolérance à l'engorgement en font une espèce stabilisatrice des berges par excellence. Par ailleurs, elle se révèle également fort intéressante pour la phytoremédiation. En effet, sa croissance est très précoce et sa biomasse est donc importante. De plus, son système racinaire très développé lui permettrait d'extraire des polluants à des profondeurs assez importantes. Par ailleurs, les espèces d'aulnes forment des symbioses avec des champignons mycorhiziens et les actinomycètes fixateurs *Frankia* sp. (Roy et al., 2007), ce qui représente un intérêt potentiel non négligeable pour la réhabilitation des écosystèmes perturbés. À ce propos, l'aulne glutineux a déjà fait l'objet de nombreux essais sur sites pollués (Mertens et al., 2004 ; Soudek et al., 2007 ; Migeon et al., 2009 ; Kuznetsova et al., 2010).

6.2.2 Culture *in vitro* de l'aulne glutineux

Si les conditions favorables à sa propagation naturelle semblent rarement réunies (Claessens et al., 2010), l'aulne glutineux peut, cependant, être facilement multiplié végétativement par bouturage (Martin et al., 1982 ; Ayan et al., 2006) ou par culture *in vitro* (Tremblay et al., 1984 ; Lall et al., 2005). Les conditions de propagation *in vitro* par bourgeonnement axillaire existant au laboratoire ont été optimisées, d'une part en utilisant le milieu de base WPM (Lloyd et al., 1980) enrichi en chélate de fer et contenant du glucose comme source de carbone, et d'autre part en favorisant les échanges gazeux avec l'environnement extérieur (Bajji et al., 2012). Les **figures 6.1A et 6.1B** montrent, respectivement, deux exemples représentatifs de pousses en prolifération et après enracinement.

Des clones d'aulne glutineux d'origines wallonne, lorraine et luxembourgeoise ont été introduits *in vitro*. L'initiation de la culture a été réalisée soit à partir de segments nodaux prélevés sur rameaux préalablement forcés à l'étouffée ou en serre, soit à partir d'apex méristématiques prélevés sur bourgeons dormants conservés au froid (R. Gruselle, communication personnelle). D'autres clones d'origine allemande nous ont été fournis par le vTI-Institute of Forest Genetics (Waldsieversdorf). Le **tableau 6.1** reprend l'ensemble des clones d'aulne glutineux faisant partie de notre collection *in vitro*.



Figure 6.1. L'aulne glutineux en culture *in vitro* : exemples représentatifs de pousses en prolifération (A), d'une pousse après enracinement (B), de la formation de bourgeons adventifs en utilisant des graines comme explants (C), de la formation de pousses adventives sur un nœud cotylédonaire (D) et de pousses adventives allongées (E).

Tableau 6.1. Code et origine des clones d'aulne glutineux établis *in vitro* dans le cadre du projet ECOLIRIMED.

Code	Pays d'origine
LIRIA-W156	Belgique
LIRIA-W167	Belgique
LIRIA-W172	Belgique*
LIRIA-W256	Belgique*
Liroux 1	Belgique*
Phy 9	Belgique*
Phy 10	Belgique
LIRIA-F121	France*
LIRIA-F194	France
LIRIA-F354	France*
LIRIA-L 28	Luxembourg*
LIRIA-L 35	Luxembourg*
LIRIA-L 82	Luxembourg*
4/12	Allemagne*
4/27	Allemagne*
4/64	Allemagne*
8/10	Allemagne*
8/22	Allemagne*
8/25	Allemagne*

* Clones criblés en présence de 150 μM de cadmium.

6.3 La culture *in vitro* comme outil de recherche en phytoremédiation

La culture *in vitro* de tissus végétaux (cals, suspensions cellulaires, racines isolées, etc.) est fréquemment appliquée dans la recherche sur les effets des polluants sur les plantes et en phytoremédiation (Doran, 2009 ; Capuana, 2011 ; Couselo et al., 2012). Bien que différents systèmes de culture de végétaux (hydroponie, lysimètres, etc.) puissent être envisagés pour l'étude de la phytoremédiation, la culture *in vitro* offre une série d'avantages expérimentaux précieux, surtout lorsqu'il s'agit d'évaluer les capacités intrinsèques des plantes à tolérer et à accumuler des contaminants (Doran, 2009). La culture *in vitro* évite la présence des microorganismes de la rhizosphère qui peuvent considérablement influencer le comportement des plantes vis-à-vis des polluants (Sell et al., 2005 ; Weyens et al., 2009). Par ailleurs, les résultats générés *in vitro* peuvent être exploités pour faire un tri parmi les clones testés, mieux concevoir les essais sur sites pollués et tenter de prédire les réponses des plantes dans de telles conditions. D'autres avantages peuvent également être cités :

- milieu de culture synthétique, donc de composition connue et stable d'un essai à un autre ;
- possibilité d'étudier les métaux lourds individuellement (pollution monométallique) ou mélangés (pollution polymétallique) ;
- les métaux lourds sont plus disponibles pour les plantes, ce qui permet d'exprimer rapidement les seuils de toxicité ;
- possibilité de réaliser des essais en quelques jours, maximum quelques semaines ;
- les conditions de culture (température, éclairage, etc.) sont sous contrôle permanent ;
- possibilité d'étudier les effets des métaux à différents niveaux d'organisation de la plante : cellule, organe et plante entière. La prise en compte de ces niveaux d'organisation est parfois nécessaire pour une meilleure compréhension de la complexité des mécanismes permettant à la plante de faire face au stress métallique ;
- faible coût, disponibilité et homogénéité du matériel végétal cloné.

6.4 La culture *in vitro* comme outil d'amélioration de la phytoremédiation

Dans le cadre du projet ECOLIRIMED, les clones d'aune glutineux qui seront réimplantés sur les berges devront être dotés, non seulement d'un niveau de tolérance aux métaux assurant leur développement en milieu pollué, mais aussi de bonnes capacités d'extraction et d'accumulation de ces éléments dans le bois. Notre but est d'améliorer l'efficacité de la phytoextraction des métaux lourds, d'une part, en exploitant la diversité génétique naturelle d'une collection de clones d'aune glutineux existante (Druart et al., 2013) et, d'autre part, en induisant de la variabilité génétique nouvelle (production et criblage de nouveaux régénérants).

Parmi les métaux lourds, nous nous sommes particulièrement intéressés au cadmium (Cd). Cet élément métallique non essentiel pour les plantes est caractérisé par une grande mobilité et disponibilité. Présent dans la majorité des sites contaminés, cet élément peut servir d'indicateur du comportement (biodisponibilité, transport...) des différents métaux lourds. C'est, de ce fait, un des métaux les plus dangereux et les plus étudiés (Das et al., 1997 ; Vassilev et al., 2002 ; Verbruggen et al., 2009).

6.4.1 Criblage *in vitro* de clones d'aulne glutineux en présence du cadmium

Le succès de la phytoextraction comme méthode de dépollution est tributaire, du moins en partie, de la disponibilité en matériel végétal correctement sélectionné. La culture *in vitro* constitue une méthode privilégiée pour une sélection rapide et efficace des clones les plus prometteurs pour les essais sur sols pollués (Malá et al., 2007 ; Smykalova et al., 2010 ; Di Lonardo et al., 2011).

Dans le cas de l'aulne glutineux, il a fallu d'abord développer un protocole *in vitro* de caractérisation des clones vis-à-vis de concentrations croissantes en Cd (0-200 μM) (Bajji et al., 2012). Une concentration 'seuil' inhibitrice de la croissance a ainsi été déterminée (150 μM). Ensuite, nous avons comparé le comportement *in vitro* de 15 clones d'aulne glutineux (**Tableau 6.1**) en présence de 150 μM de Cd afin d'identifier les clones les plus appropriés pour la phytoextraction des métaux lourds (Bajji et al., communication personnelle). Le système racinaire est souvent la partie de la plante en contact direct avec le polluant. Il joue ainsi un rôle clé dans l'interaction entre celui-ci et les autres parties de la plante. Si le Cd semble avoir peu d'effet sur le nombre de racines d'aulne glutineux *in vitro*, il affecte par contre, de manière significative, le développement du système racinaire. Parmi les différentes parties de la plante, les réductions de poids sec les plus importantes en présence de 150 μM de Cd ont été notées pour les feuilles (59 %), suivies par les racines (52 %) et par les tiges (33 %). L'indice de tolérance au Cd, correspondant au rapport entre la valeur obtenue en présence du Cd et celle enregistrée en son absence, a été calculé pour caractériser le système racinaire et la biomasse produite. Sur base de cet indice, les clones ont été classés selon leurs performances (**Tableau 6.2**). Le clone 8/25 s'est révélé le plus performant ; les clones LIRIA-L35, 4/12, 4/27, Phy 9, LIRIA-F354, 4/64 et 8/22 ne diffèrent pas significativement du clone 8/25 et formeront par conséquent le groupe des clones 'résistants' au Cd. La comparaison des concentrations en Cd et de sa distribution dans les différentes parties de la plante a révélé que les clones testés diffèrent largement les uns des autres et qu'une proportion assez élevée du Cd s'est retrouvée au niveau racinaire (Bajji et al., communication personnelle). Le facteur de bioconcentration au niveau des tiges (concentration en Cd dans la tige/ concentration en Cd dans le milieu de culture) traduit la capacité de nos clones à

transférer du Cd vers la tige. Cette capacité a été très variable et relativement assez faible; l'accumulation du Cd à ce niveau reste néanmoins acceptable et atteste de la possibilité de phytoextraction efficace du Cd par l'aulne glutineux (**Tableau 6.2, Figure 6.2**).

Tableau 6.2. Indice de tolérance au cadmium (Cd) et facteur de bioconcentration des clones d'aulne glutineux criblés en présence de 150 µM de Cd.

Classement des clones	Indice de tolérance au Cd*	Facteur de bioconcentration**
8/25	13,75 ± 1,25	2,283
LIRIA-L 35	12,00 ± 1,73	1,695
4/12	12,00 ± 0,91	2,029
4/27	11,75 ± 1,03	1,698
Phy 9	10,75 ± 1,60	1,920
LIRIA-F354	10,50 ± 1,55	1,920
4/64	9,50 ± 1,19	2,329
8/22	9,00 ± 0,71	0,711
8/10	6,75 ± 1,18	2,035
LIRIA-F121	6,75 ± 1,89	1,888
LIRIA-W172	5,00 ± 1,58	4,144
LIRIA-W256	4,25 ± 1,25	2,195
LIRIA-L 28	3,75 ± 0,63	2,433
LIRIA-L 82	2,25 ± 0,48	3,816
Liroux 1	2,00 ± 0,71	1,703

* Sur base de la croissance du système racinaire et de la production de biomasse et correspond au rapport entre la valeur obtenue en présence du Cd et celle enregistrée en son absence (moyenne ± erreur standard).

** Concentration en cadmium dans la tige / Concentration en cadmium dans le milieu de culture.

Parmi les clones étudiés (Bajji et al., communication personnelle), certains présentent des profils qui méritent d'être décrits. Le clone 8/25 est le clone le plus 'résistant' et qui détient la teneur la plus élevée de Cd par plante (30,94 µg). C'est aussi le clone qui possède la plus forte proportion de Cd dans les feuilles. LIRIA-L35 est également l'un des clones les plus 'résistants' caractérisé par la proportion de Cd la plus élevée au niveau racinaire et la plus faible au niveau foliaire. Le clone 8/22, faisant aussi partie des clones 'résistants', est celui qui présente le moins de Cd au niveau de sa tige bien qu'il détienne un des meilleurs facteurs de bioconcentration (5,25) au niveau des racines (concentration en Cd au niveau racinaire / concentration en Cd dans le milieu de culture). Enfin, le clone LIRIA-W172 est l'un des clones qualifiés de 'sensibles' mais sa biomasse en présence du Cd reste suffisante, ce qui

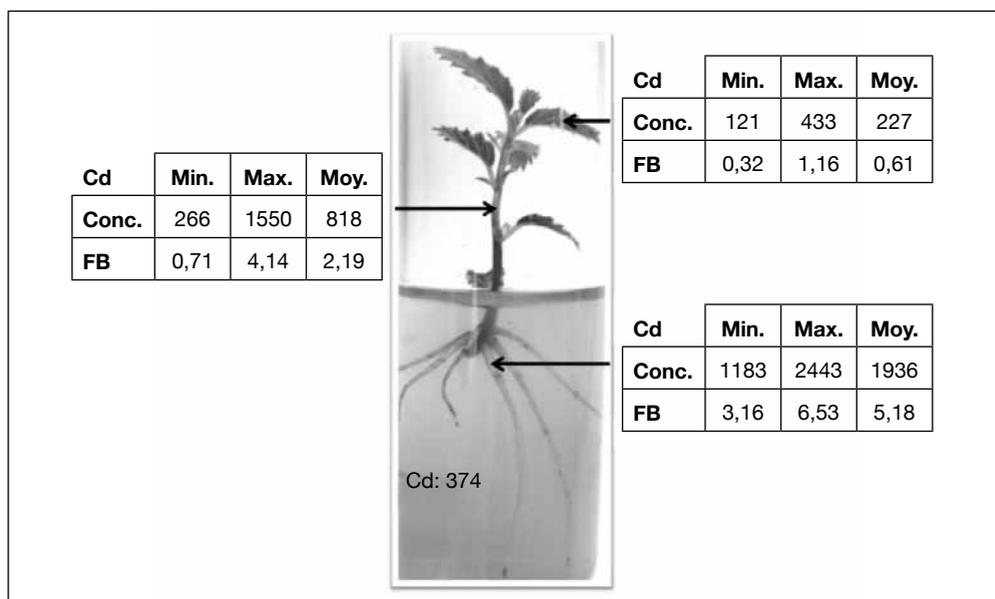


Figure 6.2. Concentration (concentration, mg/kg de matière sèche) en cadmium (Cd) et facteur de bioconcentration (FB) dans les feuilles, tiges et racines de plantules d'aulne glutineux (15 clones) cultivées sur milieu contenant 150 µM de Cd (374 mg/kg de matière sèche). Min. : Minimum ; Max. : Maximum ; Moy. : Moyenne.

lui permet de détenir des teneurs en Cd proches de celles du clone 8/25 (29,03 µg par plante). De plus, c'est le clone qui présente la plus forte proportion de Cd au niveau de la tige.

Une concentration préférentielle des métaux lourds au niveau du système racinaire reste un comportement répandu dans la majorité des espèces ligneuses pour faire face à la toxicité de ces polluants. La plupart des études ayant porté leur attention sur le potentiel d'espèces ligneuses dont l'aulne (y compris l'aulne glutineux) en phytoremédiation soulignent que l'accumulation des métaux lourds a lieu essentiellement au niveau racinaire avec une faible translocation vers la partie aérienne (Mertens et al., 2004 ; Steiner et al., 2006 ; Migeon et al., 2009 ; Zacchini et al., 2009 ; Di Lonardo et al., 2011). C'est probablement un des principaux obstacles à surmonter pour une utilisation plus efficace de ces espèces en phytoextraction des métaux lourds. Ces espèces ont par contre un profil approprié pour être utilisées efficacement en rhizofiltration ou en phytostabilisation plutôt qu'en phytoextraction. Sur base de nos résultats, les facteurs de bioconcentration (**Tableau 6.2**) obtenus dans nos conditions d'expérimentation attestent de la possibilité de phytoextraction efficace du Cd par certains clones d'aulne glutineux, en plus de la phytostabilisation et de la rhizofiltration.

6.4.2 Sélection *in vitro* de régénérants d'aulne glutineux en présence du cadmium

On sait depuis les travaux de Larkin et Scowcroft en 1981 que la culture *in vitro* de tissus végétaux peut engendrer des modifications génétiques (héritables) et épigénétiques (non-héritables mais affectant l'expression du génome) appelées variations somaclonales. La nature et les méthodes de détection de ces variations ont été largement documentées (Evans, 1989; Karp, 1995; Bairu et al., 2011; Neelakandan et al., 2012). Une partie de cette variabilité peut s'avérer utile à l'amélioration des plantes vis-à-vis des stress, qu'ils soient abiotiques ou biotiques. La présence d'un agent sélectif offre, en plus, la possibilité de régénérer des plantes ayant des caractéristiques recherchées en permettant la survie et la croissance préférentielle des phénotypes souhaités (Rai et al., 2010).

Il est donc possible d'augmenter les capacités de l'aulne glutineux à dépolluer les métaux lourds par phytoextraction en exploitant la variation somaclonale associée à l'utilisation du Cd comme agent de sélection. À l'instar d'autres espèces (Nehnevajova et al., 2007; Aoun, 2009; Ben Ghnaya et al., 2011), les régénérants obtenus dans ces conditions seraient potentiellement intéressants pour la phytoremédiation, ce qui constitue une véritable alternative à la production de plantes transgéniques.

Le développement d'une telle approche (non-OGM) nécessite néanmoins un système de régénération *in vitro* efficace. Celui visé dans le cadre du projet ECOLIRIMED, le bourgeonnement adventif (Gahan et al., 2008), n'a jamais été étudié auparavant chez l'aulne glutineux. Un protocole de régénération de pousses adventives à partir d'explants juvéniles *in vitro* (graines matures et nœuds cotylédonaires prélevés sur plantules de 2 mois) a donc été mis au point (**Figure 6.1C, D, E**). Dans le cas des graines, 1 μM de thidiazuron (TDZ) pendant deux semaines à la lumière s'est avéré être le meilleur traitement d'induction, avec 91 % des explants produisant une moyenne de 11 bourgeons/pousses par explant, dont plus de 4 longues (> 1 cm) pousses (Bajji et al., 2013). En utilisant des nœuds cotylédonaires, le traitement d'induction le plus efficace (1-3 μM de 6-benzylaminopurine (BA) pendant deux semaines à l'obscurité) a permis un taux de régénération de 100 % et 12-14 bourgeons/pousses par explant régénéré.

Une fois le protocole de régénération au point, notre démarche a consisté à obtenir, par sélection *in vitro* en présence de différentes concentrations en Cd comme pression de sélection, des régénérants d'aulne glutineux pourvus de capacités accrues en termes de tolérance aux métaux lourds et d'accumulation. Après les phases d'induction et d'expression en présence du Cd suivies d'une phase de prolifération sans Cd, les régénérants obtenus ont été criblés en présence de 150 μM de Cd pendant deux subcultures (**Figure 6.3**). Les régénérants issus de chaque

explant ont été examinés et des scores allant de 0 (dégénérescence de l'apex ayant servi d'explant) à 5 (meilleur développement de l'apex se traduisant par des plantules atteignant le couvercle des bocaux) leur ont été attribués. Lorsque la moyenne des scores est inférieure ou égale à 2, les régénérants sont considérés comme 'sensibles' au Cd; lorsqu'elle est supérieure à 2, les régénérants sont qualifiés de 'résistants'. De cette manière, le nombre et le pourcentage des régénérants 'sensibles' et 'résistants' ont été calculés en fonction de la concentration de Cd ayant servi de pression de sélection. Des régénérants 'résistants' (39 à 43 %) ont pu être obtenus en l'absence de Cd mais l'application d'une forte pression de sélection (150 μM de Cd) lors des phases d'induction et d'expression a permis d'améliorer le pourcentage de ces régénérants de 32 % (nœuds cotylédonaires comme explants) à 47 % (graines comme explants) (**Figure 6.4**), probablement en favorisant la régénération de pousses à partir de cellules modifiées par variation somaclonale. La variabilité génétique du lot de graines utilisées dans le cadre de nos essais a, vraisemblablement, été aussi exploitée et a pu contribuer à l'amélioration de ce pourcentage.

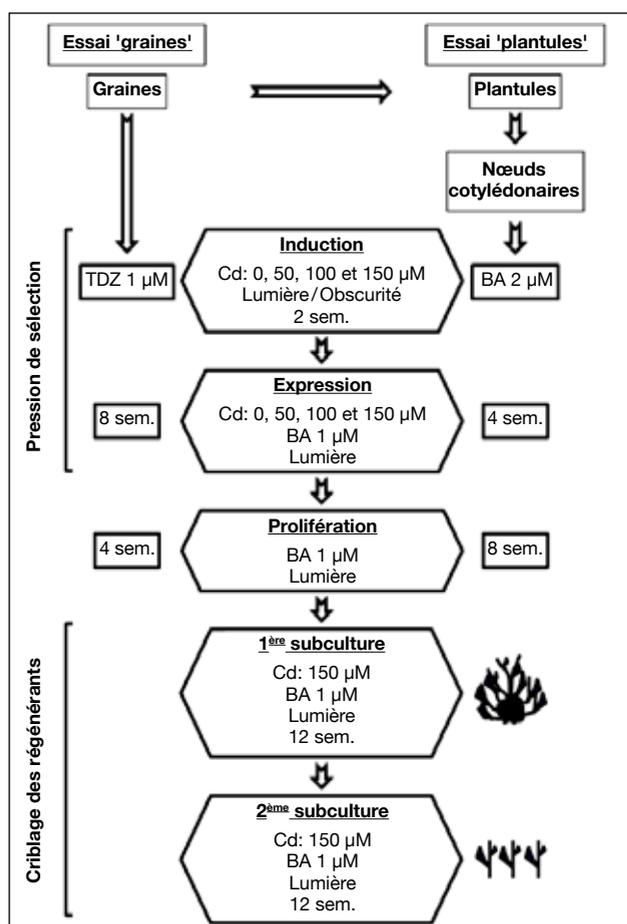


Figure 6.3. Schéma résumant la stratégie de sélection *in vitro* de régénérants d'aulne glutineux en présence de cadmium.

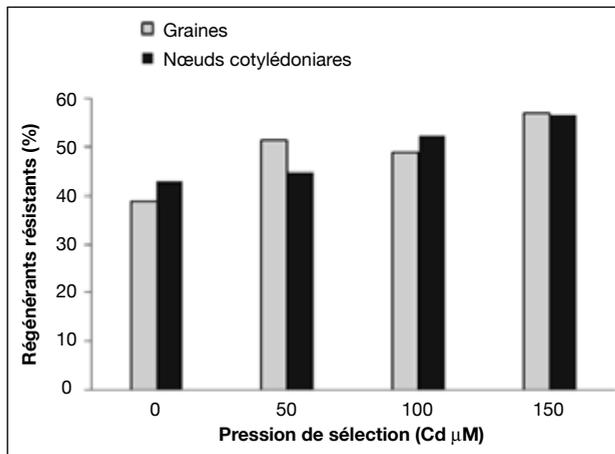


Figure 6.4. Pourcentage de régénérants 'résistants' au terme de la seconde subculture de criblage en présence de 150 µM de cadmium (Cd) en fonction de la concentration en Cd ayant servi de pression de sélection pour les deux types d'explants utilisés : graines et nœuds cotylédonaires.

6.5 Conclusions

Si nous avons pu régénérer des plants d'aulne glutineux 'résistants', leurs mécanismes d'accumulation du Cd restent cependant à élucider. Leur caractérisation est en cours afin d'identifier les variants les plus prometteurs pour la phytoextraction des berges de cours d'eau. L'obtention *in vitro* d'un matériel végétal tolérant ou doté de propriétés d'extraction et d'accumulation des métaux lourds améliorées a déjà été rapporté chez différentes espèces (Jackson et al., 1984; Huang et al., 1987; Guadagnini, 2000; Nehnevajova et al., 2007; Ben Ghnaya et al., 2011). Nous espérons, grâce à la variation somaclonale associée à la présence du Cd comme agent de pression de sélection, améliorer la tolérance aux métaux lourds et leur translocation vers la tige afin de rendre plus efficace la phytoextraction de ces polluants le long des cours d'eau et en zones humides.

Le criblage *in vitro* des clones d'aulne glutineux en présence du Cd a permis d'identifier des profils forts contrastés en termes d'accumulation et de répartition du Cd suggérant, en plus de la phytostabilisation, une certaine efficacité de phytoextraction des métaux lourds pour la plupart de nos clones testés.

Rappelons que ce travail est réalisé en culture *in vitro* avec des milieux enrichis en chélate de fer et en n'utilisant que le Cd comme polluant, il est donc évident que le comportement des clones et des régénérants les plus prometteurs nécessite une évaluation sur sols pollués pour confirmer la faisabilité d'une dépollution des berges de cours d'eau par l'aulne glutineux.

Remerciements

Les recherches présentées dans ce chapitre ont été menées dans le cadre du projet Interreg IV-A Grande Région/ECOLIRIMED soutenu financièrement par le FEDER, le Service Public de Wallonie et la Région Lorraine.

Les auteurs remercient sincèrement les personnes suivantes : MM. Haeghens G., Hecq B. et Comté J. ainsi que Mme Leclercq M. pour leur implication dans la réalisation des essais. Ils tiennent à remercier également Mme Naujoks G. de vTI-Institute of Forest Genetics (Waldsieversdorf) pour la fourniture de six clones d'aune glutineux (4/12, 4/27, 4/64, 8/10, 8/22 et 8/25) déjà établis *in vitro*.

6.6 Bibliographie

- ADEME, 2011. Le savoir-faire français dans le domaine de la dépollution des sols et des eaux souterraines. <http://www2.ademe.fr/servlet/getDoc?cid=96&m=3&id=74694&p1=02&p2=13&ref=17597>
- Alkorta I. et al., 2004. Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead, and arsenic. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, **3**, 71-90.
- Aoun M., 2009. *Action du cadmium sur les plants de moutarde indienne [Brassica juncea (L.) Czern] néoformés à partir de couches cellulaires minces et issus de semis. Analyses physiologiques et rôle des polyamines*. Thèse de doctorat: Université de Bretagne Occidentale (France).
- Ayan S. et al., 2006. The vegetative propagation possibilities of black alder [*Alnus glutinosa* subsp. *barbata* (C. A. Mey.) Yalt.] by softwood cuttings. *Pak. J. Biol. Sci.*, **9**, 238-242.
- Bairu M.W., Aremu A.O. & Van Staden J., 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul.*, **63**, 147-173.
- Bajji M. & Druart Ph., 2012. Protocol development for *in vitro* assessment of cadmium tolerance in black alder and basket willow at the callus and whole plant levels. *Acta Hort.* (ISHS), **961**, 123-131.
- Bajji M., Thunissen C. & Druart Ph., 2013. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* juvenile explants of black alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **17**, 12-19.
- Ben Ghnaya A. et al., 2011. Polyamine levels and pigment contents in rapeseed regenerated *in vitro* in the presence of zinc. *J. Environ. Chem. Ecotoxicol.*, **3**, 206-213.
- Capuana M., 2011. Heavy metals and woody plants – biotechnologies for phytoremediation. *iForest*, **4**, 7-15.
- Claessens H., Oosterbaan A., Savill P. & Rondeux J., 2010. A review of the characteristics of black alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) and their implications for silvicultural practices. *Forestry*, **83**, 163-175.

- Couselo J.L., Corredoira E., Vieitez A.M. & Ballester A., 2012. Plant tissue culture of fast-growing trees for phytoremediation research. *In: Loyola-Vargas V.M. & Ochoa-Alejo N., eds. Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology, 877.* Springer Science+Business Media, LLC, 247-263.
- Das P., Samantaray S. & Rout G.R., 1997. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environ. Pollut.*, **98**, 29-36.
- Di Lonardo S. et al., 2011. Exploring the metal phytoremediation potential of three *Populus alba* L. clones using an *in vitro* screening. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **18**, 82-90.
- Doran P.M., 2009. Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: Incentives and limitations. *Biotechnol. Bioeng.*, **103**, 60-76.
- Druart Ph. et al., 2013. Construction et développement d'une filière de production d'écotypes ligneux pour l'application des techniques végétales à la renaturation des berges de cours d'eau. *In: Druart Ph., Husson C. & Paul R., eds. Renaturation des berges de cours d'eau et phytoremédiation.* Gembloux, Belgique : Presses agronomiques de Gembloux.
- Evans D.A., 1989. Somaclonal variation – genetic basis and breeding applications. *Trends Genet.*, **5**, 46-50.
- Gahan P.B. & George E.F., 2008. Adventitious regeneration. *In: George E.F., Hall M.A. & De Klerk G.J., eds. Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd Edition, Vol 1: The background.* Dordrecht, The Netherlands: Springer, 355-401.
- Guadagnini M., 2000. *In vitro-breeding for metal accumulation in two tobacco (Nicotiana tabacum) cultivars.* Thesis No. 1288, University Freiburg, Switzerland, 99 p.
- Huang B., Hatch E. & Goldsbrought P.B., 1987. Selection and characterization of cadmium tolerant cells in tomato. *Plant Sci.*, **52**, 211-221.
- Jackson P.J., Roth E.J., McClure P.T. & Naranjo C.M., 1984. Selection, isolation and characterization of cadmium resistant *Datura innoxia* suspension cultures. *Plant Physiol.* **75**, 914-918.
- Karp A., 1995. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica*, **85**, 295-302.
- Kuznetsova T. et al., 2010. Survival of black alder (*Alnus glutinosa* L.), silver birch (*Betula pendula* Roth.) and Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings in a reclaimed oil shale mining area. *Ecol. Eng.*, **36**, 495-502.
- Lall S., Mandegaran Z. & Roberts A.V., 2005. Shoot multiplication in cultures of mature *Alnus glutinosa*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, **83**, 347-350.
- Larkin P.J. & Scowcroft W.R., 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* **60**, 197-214.
- Lasat M.M., 2002. Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. *J. Environ. Qual.*, **31**, 109-120.

- Lloyd G.B. & McCown B.H., 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proc. Inter. Plant Prop. Soc.*, **30**, 421-437.
- Malá J., Máchová P., Cvrčková H. & Vaněk T., 2007. Heavy metals uptake by the hybrid aspen and rowan-tree clones. *J. Forest Sci.*, **53**, 491-497.
- Martin B. & Guillot J., 1982. Quelques essais de bouturage de l'aulne. *R.F.F.*, **34**, 381-391.
- Mench M. et al., 2006. Phytostabilisation of metal-contaminated sites. In: Morel J.L., Echevarria G. & Goncharova N., eds. *Phytoremediation of metal-contaminated soils*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 109-190.
- Mertens J., Vervaeke P., De Schrijver A. & Luysaert S., 2004. Metal uptake by young trees from dredged brackish sediment: limitations and possibilities for phytoextraction and phytostabilisation. *Sci. Total Environ.*, **326**, 209-215.
- Migeon A. et al., 2009. Metal accumulation by woody species on contaminated sites in the North of France. *Water Air Soil Pollut.*, **204**, 89-101.
- Neelakandan A.K. & Wang K., 2012. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Rep.*, **31**, 597-620.
- Nehnevajova E., Herzig R., Erismann K.H. & Schwitzguébel J.P., 2007. *In vitro* breeding of *Brassica juncea* L. to enhance metal accumulation and extraction properties. *Plant Cell Rep.*, **26**, 429-437.
- Rai M.K. et al., 2010. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection – An overview of the recent progress. *Environ. Exp. Bot.*, **71**, 89-98.
- Roudier P., 2004. Techniques de réhabilitation des sites et sols pollués : Fiches de synthèse. *Techniques de l'Ingénieur*, **C5**, 1-40.
- Roy S., Khalsa D.P. & Greer C.W., 2007. Combining alders, frankiae, and mycorrhizae for soil remediation and revegetation. *Can. J. Bot.*, **85**, 237-251.
- Salt D.E. et al., 1995. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Nat. Biotechnol.*, **13**, 468-474.
- Sell J., Kayser A., Schulin R. & Brunner I., 2005. Contribution of ectomycorrhizal fungi to cadmium uptake of poplars and willows from a heavily polluted soil. *Plant Soil*, **277**, 245-253.
- Smykalova I. et al., 2010. Large scale screening of heavymetal tolerance in flax/linseed (*Linum usitatissimum* L.) tested *in vitro*. *Ind. Crop. Prod.*, **32**, 527-533.
- Soudek P. et al., 2007. Comparison of ²²⁶Ra nuclide from soil by three woody species *Betula pendula*, *Sambucus nigra* and *Alnus glutinosa* during the vegetation period. *J. Environ. Radioact.*, **97**, 76-82.
- Steiner L. et al., 2006. Reboisement de sites pollués – Enseignements tirés d'une étude de cas avec des métaux lourds. *Schweiz. Z. Forstwes.*, **157**, 157-161.

- Suresh B. & Ravishankar G.A., 2004. Phytoremediation – A novel and promising approach for environmental clean-up. *Critical Rev. Biotechnol.*, **24**, 97-124.
- Tremblay F. & Lalonde M., 1984. Requirements for *in vitro* propagation of seven nitrogen-fixing *Alnus* species. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, **3**, 189-199.
- Vassilev A. et al., 2004. The use of plants for remediation of metal-contaminated soils. *Scientific World J.*, **4**, 9-34.
- Vassilev A., Vangronsveld J. & Yordanov I., 2002. Cadmium phytoextraction: present state, biological backgrounds and research needs. *Bulg. J. Plant Physiol.*, **28**, 68-95.
- Verbruggen N., Hermans C. & Schat H., 2009. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **12**, 364-372.
- Weyens N., van der Lelie D., Safiyh Taghavi S. & Vangronsveld J., 2009. Phytoremediation: plant–endophyte partnerships take the challenge. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **20**, 248-254.
- Zacchini M. et al., 2009. Metal tolerance, accumulation and translocation in poplar and willow clones treated with cadmium in hydroponics. *Water Air Soil Pollut.*, **197**, 23-34.



7

Valorisation énergétique du bois produit à des fins de phytoremédiation

Delcarte Jérôme, Gossiaux Lucas, Evlard Aricia

Résumé

La biomasse produite dans une stratégie de phytoremédiation est susceptible de voir ses concentrations en métaux lourds enrichies. Cette étude démontre que ces teneurs restent trop faibles que pour interdire toute valorisation du bois produit. En comparant les concentrations en divers métaux lourds dans des bois de saule et d'aulne (produit sur sols contaminés) avec les valeurs de normes (ou bien de spécifications techniques) en vigueur dans plusieurs pays européens, les auteurs ont montré qu'une valorisation énergétique en chaudière industrielle est envisageable. Cette biomasse, certes particulière, ne doit pas être considérée comme un déchet.

Mots-clés : biomasse, bioremédiation, déchet de bois, métal lourd, utilisation des déchets, énergie renouvelable.

Energetic utilisation of bioremediation wood

Biomass produced under a phytoremediation strategy is likely to have an enriched heavy metal concentration. This study suggested, however, that these heavy metal levels are too low, jeopardizing biomass utilization. By comparing various concentrations of heavy metals in willow and alder (grown on polluted soils) with European standard values (or technical specifications), the authors showed that energy recovery in industrial boilers is possible. This kind of biomass should therefore not be considered as waste.

Keywords: biomass, bioremediation, wood residues, heavy metals, renewable energy, waste utilization.

7.1 Introduction

On estime qu'il existe en Wallonie plus de 4 300 ha de sites d'activités économiques désaffectés nécessitant une réhabilitation (Dachouffe et al., 2005) ainsi qu'une superficie considérable, mais non chiffrée, de dépôts de boues de dragage. Ces sites présentent des concentrations préoccupantes en divers polluants. La majeure partie de ces sites ne seront pas assainis à court ni à moyen terme, la faisabilité technique faisant parfois défaut et les coûts des procédés d'assainissement étant

considérables. Ce passif environnemental difficilement gérable constitue l'héritage d'une longue histoire industrielle.

Dans le contexte du changement climatique et de manière à améliorer son indépendance énergétique, la Belgique s'est engagée auprès de l'Union Européenne à produire 13% de son énergie à partir de sources renouvelables d'ici à 2020 (Parlement et Conseil Européens, 2009). La contribution de la biomasse sera de taille et les filières de valorisation « matière » du bois s'en trouveront certainement affectées. Il sera par conséquent nécessaire de mobiliser de nouvelles ressources ligneuses au niveau régional d'ici à l'horizon 2020 (COBELPA, 2007).

Dans nos régions, où les ressources forestières sont connues et finies, l'agriculture est souvent pressentie pour fournir de nouvelles ressources énergétiques, notamment par le biais des cultures à croissance rapide (taillis à courte rotation de saule, *Miscanthus*). Toutefois, une production agricole vouée à un usage non alimentaire entre en concurrence avec l'agriculture traditionnelle et pose des questions d'ordres éthique, environnemental et économique (Ruttens et al., 2011).

Dans ce contexte global, la communauté scientifique s'intéresse depuis une dizaine d'années à la végétalisation des sites pollués à l'aide de ligneux, à des fins de bioremédiation des sols, d'une part, et de production de biomasse non alimentaire, d'autre part. Les plantes accumulent naturellement les éléments-traces métalliques (ETM) présents dans les sols et nombreux sont les auteurs ayant étudié le potentiel d'accumulation des métaux dans les ligneux (Dickinson, 2000; Pulford et al., 2003; French et al., 2006; Migeon et al., 2009; Mleczek et al., 2010). Néanmoins, comme le soulignent Abhilash et al. (2011), il n'y a pour l'heure pas de discussions sur les filières de valorisation de cette biomasse, en regard des législations ou normes à objectif sanitaire.

En l'absence de législation, deux attitudes sont possibles. La première est de considérer que le bois produit sur sols pollués ne diffère en rien du bois produit sur un sol forestier. Toutes les voies de valorisation sont dès lors possibles. La seconde, plus prudente, analysera les concentrations en métaux du bois produit sur sols pollués, comparera ces teneurs avec celles rencontrées dans une filière voisine, et orientera ces bois vers les filières les plus adaptées. C'est cette deuxième option que nous avons choisi de suivre. Dans cet article, nous proposons une réflexion sur la valorisation énergétique de bois potentiellement contaminé aux ETM à cause d'une croissance sur sol pollué. Nous avons procédé en deux étapes. La première est la synthèse bibliographique d'un sujet similaire qui va servir de référence à la fois juridique et technique : la valorisation des déchets de bois traités (déchets de construction, de panneaux, bois traités à l'exception des bois créosotés, traités au CCA [Cuivre, Chrome et Arsenic]). La seconde étape est la comparaison des teneurs

en ETM mesurées dans le bois (produit sur boue de dragage) avec les valeurs seuils décrites dans la législation relative aux déchets de bois, notre référence.

7.2 Valorisation énergétique des déchets de bois : le point sur les législations

Les législations relatives à la valorisation énergétique des « déchets de bois » sont complexes car susceptibles de concerner aussi bien le combustible lui-même que les produits de la combustion (émissions atmosphériques et cendres), de même que les installations de combustion. Le transport et le stockage de déchets de bois peuvent également faire l'objet d'une législation. Dans le cadre de cet article, nous nous limiterons à la caractérisation du déchet de bois dans quelques pays d'Europe en vue d'opérer une comparaison avec la matière ligneuse issue de la phytoremédiation.

Bien qu'il existe un cadre européen, les législations nationales concernant les déchets de bois divergent encore beaucoup selon les pays. Un rapport de l'ADEME (2007) est consacré aux différentes réglementations européennes. Parmi les législations les plus abouties, citons l'Allemagne, l'Autriche, la France, l'Italie et la Pologne. En Wallonie, il n'existe pas de classification légale des déchets de bois. Il existe, tout au plus, une classification commerciale de type A, B, C (par analogie au système français). Les cas de la France et de l'Allemagne seront détaillés. Hors Union Européenne, nous envisagerons celui de la Suisse.

En France, les résidus de bois sont classés en deux catégories principales : les « Combustibles » et les « Déchets » (**Tableau 7.1**). La catégorie des « Combustibles » est subdivisée en deux classes que l'on a coutume d'appeler « Classe A » et « Classe B » en référence au suffixe des rubriques ICPE (Installations Classées pour la Protection de l'Environnement) auxquelles elles font référence. La catégorie des « Déchets » est subdivisée en « Non dangereux » et « Dangereux ». Cette dernière catégorie de déchets, qui concerne les bois traités (créosotes, CCA, CCB...), est la « Classe C ». Il règne un certain flou autour de la distinction entre la catégorie des « Déchets non dangereux » et la « Classe B ». La première catégorie autorise la présence de composés organochlorés et de métaux lourds contrairement à la deuxième. Néanmoins, il n'est pas fait mention de teneurs limites en ces composés, tenant compte de leurs concentrations naturelles dans le bois. Il n'est pas non plus fait mention de critères d'analyse, ni de fréquences d'analyse.

Tableau 7.1. Classification des déchets de bois et valorisations associées (Mousseau, 2007).

Catégorie réglementaire	Matière première ligneuse	Valorisation énergétique possible	Rubrique ICPE
Combustibles	Bois forestiers, bocagers et urbains Produits connexes de scierie Produits connexes de la seconde transformation « propre » Palettes, caisses-palettes, caisses (non traitées et non souillées) Emballages légers	Combustion (notamment en chaufferies collectives)	2910A
	Bois comportant des colles, vernis et peintures sans composés organohalogénés ou métaux lourds	Combustion en chaufferies industrielles adaptées (filière bois)	2910B
Déchets non dangereux	Palettes, caisses-palettes, caisses traitées ou souillées Bois comportant des colles, vernis et peintures avec composés organohalogénés ou métaux lourds Bois ignifugés	Incinération	167C 322-B-4
Déchets dangereux	Bois créosotés Bois imprégnés de sels métalliques	Incinération	167C 322-B-4 (si installation autorisée)

En Allemagne, un texte légal intitulé « German Waste Wood Ordinance », GWWO en abrégé, catégorise également les déchets de bois (**Tableau 7.2**).

Tableau 7.2. Catégories allemandes de déchets de bois (German waste wood ordinance, 2002).

A I	Waste wood in its natural state or only mechanically worked which, during use, was at most insignificantly contaminated with substances harmful to wood.
A II	Bonded, painted, coated, lacquered or otherwise treated waste wood with no halogenated organic compounds in the coating and no wood preservatives.
A III	Waste wood with halogenated organic compounds in the coating, with no wood preservatives.
A IV	Waste wood treated with wood preservatives, such as railway sleepers, telephone masts, hop poles, vine poles as well as other waste wood which, due to its contamination, cannot be assigned to waste wood categories A I, A II or A III, with the exception of waste wood containing PCBs.

Ce sont les spécificités techniques des installations (types de chaudière, types d'unité de gazéification...) qui vont déterminer les catégories de bois susceptibles d'être valorisées par l'exploitant. Ces autorisations relèvent du «*Federal Immission Control Act*».

Le GWWO précise que «*les exploitants possédant les accréditations techniques doivent former un examinateur qui sera chargé de catégoriser le bois usagé qui sera livré*». Par des contrôles visuels et de tri, cette personne sera chargée de vérifier la conformité des déchets de bois par rapport aux autorisations dont dispose l'exploitant. Il lui sera demandé d'évaluer le tonnage ou le volume de bois affecté à une catégorie. Les débris ou substances interférentes doivent être enlevées (clous, verre, plastique...). De plus, l'examineur est tenu d'examiner le bois broyé, toutes les 500 tonnes pour s'assurer de la conformité du bois.

En Suisse, la législation semble laisser moins d'ambiguïté. La fiche de l'Office de l'Environnement intitulée «Aide à l'exécution concernant les déchets de bois» renseigne :

«La qualité des déchets de bois destinés à la fabrication de matériaux en bois ou à la valorisation thermique dans une chaudière pour bois usagé doit être contrôlée. Les exploitants d'installations de broyage mandatent un laboratoire pour prélever des échantillons dans leurs stocks de bois usagé et les analyser, afin de garantir le respect des valeurs indicatives figurant dans le tableau de l'annexe B. Les résultats de ces analyses seront transmis aux autorités cantonales dans le cadre des contrôles de qualité qu'elles ordonnent. Celles-ci peuvent décider de restreindre le nombre de paramètres exigés, selon la provenance des déchets de bois. Les échantillonnages et les analyses seront effectués par un laboratoire accrédité selon la norme EN ou ISO, ou selon une norme équivalente.» Les valeurs indicatives de l'annexe B, concernant la distinction du bois dit «à problèmes» des autres déchets de bois, sont données dans le **tableau 7.3**. L'annexe B mentionne : «Les déchets de bois dont la composition dépasse l'une des valeurs indicatives de la colonne 2 (**Tableau 7.3**) doivent être classés parmi le bois à problèmes. Ils ne peuvent pas être incinérés dans une chaudière pour bois usagé. Pour ce genre de déchets, seules les cimenteries et les UIOM (Unités d'incinération des ordures ménagères) entrent en ligne de compte. En cas de dépassement des valeurs indicatives, les imprécisions importantes qui surviennent lors de l'échantillonnage et de l'analyse doivent être prises en compte. Le canton concerné peut réduire le nombre de paramètres déterminants et ne choisir que les plus importants.»

En résumé, seule la Suisse impose des analyses chimiques du bois préalables à la valorisation énergétique en chaudière à bois usagé. Cette catégorie valorisable énergétiquement correspondrait à la somme des classes dites «A» et «B» en France.

Tableau 7.3. Valeurs indicatives en différents polluants pour distinguer le bois à problèmes des autres déchets de bois (mg/kg matière sèche). Au-delà de ces valeurs, le bois ne peut plus être valorisé thermiquement dans une chaudière à bois usagé. (Office fédéral de l'environnement suisse, 2006).

Polluant	Valeurs indicatives pour distinguer le bois à problèmes des autres déchets de bois (mg/kg MS)
Arsenic	5
Plomb	500
Cadmium	5
Chrome	100
Cuivre	100
Mercurure	1
Chlore	5 000
Fluor	200
Zinc	1 000

Il n'existe pas de seuils légaux en ETM dans le bois pour distinguer le bois de première qualité en Europe (Classe A = ICPE 2910A). Cependant, un institut technologique du bois français, l'Institut Technologique Forêt Cellulose Bois-construction Ameublement (FCBA), propose des seuils (**Tableau 7.4**).

Tableau 7.4. Seuils maximaux proposés par le FCBA pour le bois de Classe A (ADEME, 2010) et teneurs observées dans la biomasse naturelle (Biomasse-Normandie, 2007).

Polluant	Seuil maximal proposé par le FCBA pour les déchets de bois de « Classe A » (mg/kg MS)	Teneurs observées dans la biomasse naturelle (mg/kg MS)
Arsenic	10	1,40
Cadmium	10	0,70
Chrome	100	22,60
Cuivre	400	21,90
Étain	10	1,70
Manganèse	1 000	180,60
Plomb	100	29,00
Zinc	200	228,00
Somme ETM	1 000	485,90
Chlore	6 000	1 100,00
Fluor	5 000	40,00
Somme Organo-halogénés	10	4,05
Colles et résines	150 000	0,00

7.3 Comparaison des teneurs en ETM mesurées dans le bois produit sur sols pollués, avec les valeurs seuils décrites dans la législation relative aux déchets de bois

Les teneurs en ETM dans les écotypes de saules et d'aulnes obtenues lors de l'expérience en lysimètres (Evlard et al., 2013) sont comparées avec les seuils légaux suisses, que l'on peut assimiler aux seuils maximaux du bois de «Classe B», ainsi qu'avec les valeurs seuils proposées par le FCBA pour le bois de «Classe A», valeurs indicatives pour le bois considéré comme «non pollué».

7.3.1 Cas du saule

La **figure 7.1** présente les teneurs en ETM observées dans les écotypes de saule. Pour chacun des ETM, les seuils de référence disponibles sont représentés par un cercle ou bien par un carré (selon la référence).

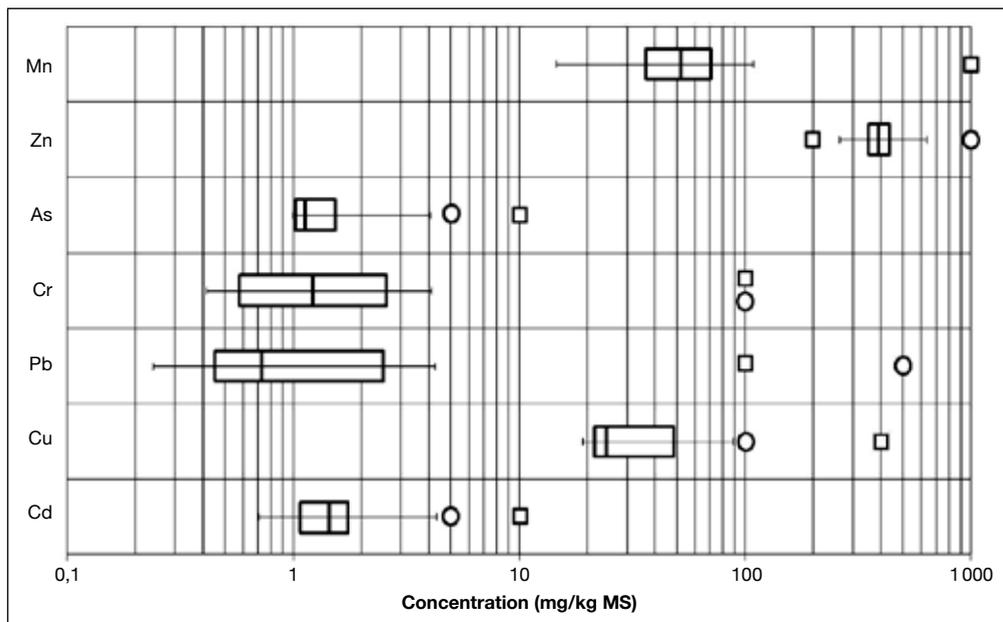


Figure 7.1. Diagramme en Boxplot des concentrations en ETM observées dans les écotypes de *Salix* sp. en comparaison des seuils maximaux proposés par la FCBA pour le bois de classe A (□) et des seuils maximaux suisses pour distinguer les déchets de bois à problèmes (O).

À l'exception du Zn, qui dépasse d'un facteur 2 la valeur seuil maximale admissible selon la FCBA, toutes les valeurs observées sont inférieures aux valeurs cibles proposées par les deux textes de référence.

Signalons, en complément, que la littérature relève également, et à deux reprises, des dépassements (références FCBA et suisses) en zinc dans les végétaux poussant sur sols contaminés (King et al., 2006 ; Koelbener, 2008). En outre, elle fait mention de dépassements de la valeur seuil du cadmium (King et al., 2006 ; Meers et al., 2007 ; Migeon et al., 2009 ; Stals et al., 2010 ; Greger et al., 1999 ; French et al., 2006 ; Zacchini et al., 2009). Une majorité d'articles mentionnent cependant des teneurs inférieures au seuil. Un excès en arsenic (11,8 mg/kg MS contre 5 mg/kg MS pour la norme) est constaté pour des saules situés au droit d'un gisement tungstène-arsenic (Otones et al., 2011). La concentration en As du sol sur ce gisement est cependant exceptionnellement élevée. Dickinson (2000) relève des teneurs de 126 à 208 mg/kg MS de cuivre dans du bois de saule ayant poussé durant une saison sur un sol hautement pollué par une fonderie de cuivre.

Ce tour d'horizon de la littérature nous montre que les teneurs observées par d'autres auteurs seraient, dans la majorité des cas, inférieures aux valeurs seuils au-delà desquelles le bois est considéré comme « à problème » pour une valorisation, valeur au-delà de laquelle le bois deviendrait réellement un « déchet ».

7.3.2 Cas de l'aulne

De manière analogue avec le cas précédent, la **figure 7.2** présente les teneurs en ETM (échelle logarithmique) observées dans les écotypes d'aulne sous la forme de Boxplot.

Le problème de dépassement du zinc semble s'estomper chez l'aulne : seuls les écotypes présentant les valeurs extrêmes (deux clones) dépassent le seuil proposé par le FCBA pour être considéré comme du bois de classe A. Les écotypes présentant des valeurs extrêmes en cuivre (cinq clones) dépassent la valeur indicative de la norme suisse (distinction du bois « à problème »).

La littérature est moins riche en ce qui concerne l'aulne. Dickinson (2000), dont l'étude portait sur une zone hautement polluée en cuivre (1 620-9 100 mg/kg de sol sec), ne mentionne pas d'excès pour le bois d'aulne.

7.4 Discussion

La valorisation énergétique du bois de saule en tant que « Classe A » respectant les valeurs conseillées par le FCBA semblerait compromise. En effet, la valeur seuil

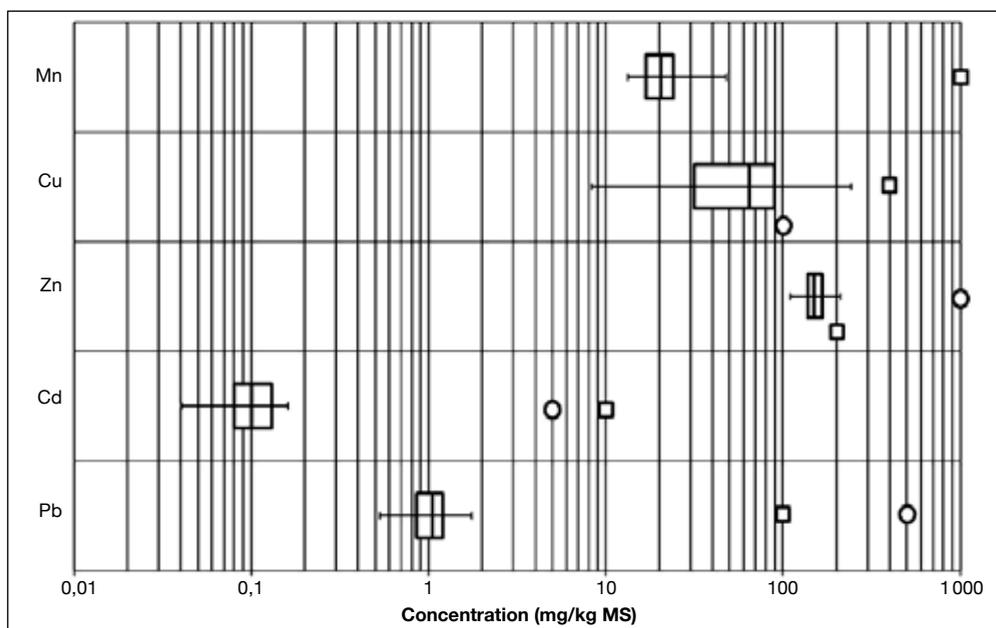


Figure 7.2. Diagramme en Boxplot des concentrations en ETM observées dans les écotypes de *Alnus* sp. en comparaison des seuils maximaux proposés par la FCBA pour le bois de classe A (□) et des seuils maximaux suisses pour distinguer les déchets de bois à problèmes (O).

fixée pour le zinc pose problème : un dépassement généralisé des clones testés est constaté. La littérature est mitigée : elle révèle plusieurs dépassements similaires mais également des teneurs nettement inférieures à la valeur du seuil proposée par le FCBA.

Néanmoins, le propos doit être nuancé en fonction de l'âge des clones analysés : inférieur à 3 ans. Or, les saules cultivés en taillis à courte rotation sont récoltés après 3 à 5 années (Dimitriou et al., 2005) et plusieurs publications (Hytönen et al., 2009 ; Adler et al., 2008) démontrent la décroissance significative des concentrations en ETM avec l'âge des rameaux. On peut dès lors envisager, bien que cela reste à démontrer, que les concentrations en zinc des plants plus âgés passent sous le seuil du FCBA.

Signalons enfin que la valeur seuil en zinc proposée par le FCBA a été remise en question par «Biomasse Normandie» car jugée inférieure aux teneurs naturelles dans la biomasse.

La valorisation à des fins énergétiques d'aulnes ayant poussés sur sol pollué en ETM dans le cadre de notre étude, comme déchet de bois de classe A, en respectant les seuils proposés par le FCBA, semble poser moins de problèmes que pour le saule en ce qui concerne les ETM étudiés. L'argument de la décroissance des teneurs reste pourtant valable.

Lorsque l'on confronte les écotypes d'aulne aux valeurs suisses, c'est le cuivre qui pose problème. S'il s'avère que des études complémentaires confirment ce dépassement, la sélection de clones moins accumulateurs pourraient s'avérer nécessaire pour rencontrer les objectifs suisses.

Enfin, rappelons que les éléments d'interprétation formulés portent sur les jeunes rameaux des plants étudiés ayant poussé en pots, à l'extérieur. Les tendances qui se dégagent de cette analyse ne doivent par conséquent pas être considérées comme des généralités.

7.5 Conclusions et perspectives

Le bois produit dans une optique de phytoremédiation ne fait l'objet d'aucune législation particulière. D'un point de vue strictement légal, il n'y a donc aucune raison de le considérer comme un déchet, mais bien comme du bois à part entière, susceptible d'intégrer n'importe quel circuit de valorisation.

Néanmoins, les concentrations en certains ETM risquent d'être significativement plus élevées dans le bois issu de phytoremédiation. L'objectif de ce travail était de savoir si ces niveaux de contamination plaçaient le bois issu de phytoremédiation dans la catégorie « déchet » (au sens de la législation en vigueur dans le domaine du recyclage) ou bien si il restait en dessous des normes en vigueur dans ce secteur. D'après ce que l'on a pu observer, tant dans nos expérimentations sur saule et sur aulne, que dans la littérature, les augmentations de teneurs en ETM sont généralement trop faibles que pour faire passer le bois de phytoremédiation dans la catégorie de déchet de bois. Cela signifie qu'une valorisation énergétique peut être envisagée, dans une chaudière industrielle équipée de système d'épuration des fumées si l'on veut être tout à fait prudent.

Cette étude a également montré qu'une valorisation matière était parfois possible. Il ne faut pas négliger cette dernière valorisation car elle est plus rentable. Parmi les secteurs envisagés, on peut citer l'industrie du panneau de particules ou l'industrie papetière. Les panneaux de fibrociment pourraient constituer un autre débouché intéressant dans lequel le bois serait complètement inerté. Mais si les teneurs sont prometteuses, il faut garder à l'esprit que les quantités de bois produit par la filière de phytoremédiation risquent d'être infimes par rapport aux besoins réels des secteurs cités ci-dessus. Il est probable que ces acteurs ne prennent pas le risque d'utiliser un approvisionnement qui leur sera fourni en si faibles tonnages, surtout s'ils doivent s'assurer de surcroît de l'équivalence avec leur matière habituelle.

Mais des investigations complémentaires, via des études de faisabilité au cas par cas, devront être envisagées car il faut bien garder à l'esprit qu'il existe une

grande diversité, aussi bien qualitative que quantitative, des sols pollués. Il est utopique de penser tirer des conclusions générales sur base de quelques études qui pourraient ne pas être représentatives. Au mieux, pourra-t-on mettre en perspective les concentrations en ETM des sols avec celles attendues dans le bois ?

La biomasse ayant fait l'objet de ce travail était jeune : moins de 3 ans. Lorsque la biomasse est produite en taillis, elle est plus âgée et il est possible qu'elle atteigne la qualité du bois de classe A, les concentrations en ETM ayant tendance à diminuer avec l'âge de la plante. Une autre option pour atteindre les seuils de la classe A est de mélanger les bois issus de différents lieux de productions qualitativement différentes.

Enfin, le choix du clone sera d'une importance capitale, et c'est sur ce point que vont s'opposer les stratégies de phytoremédiation et de production de biomasse : la première préférera des clones accumulateurs, qui extraient le maximum de métaux lourds des sols pour les accumuler dans le bois, la finalité étant la dépollution des sols. Par contre, en production de biomasse, les clones les plus producteurs en termes de matière sèche à l'hectare seront favorisés. De plus, les taux les plus faibles en ETM dans le bois seront appréciés afin, on l'a vu, de pouvoir intégrer la classe A et pouvoir ainsi intégrer les circuits de valorisation matière.

Remerciements

Les recherches présentées dans ce chapitre ont été menées dans le cadre du projet Interreg IV-A Grande Région/ECOLIRIMED soutenu financièrement par le FEDER, le Service Public de Wallonie et la Région Lorraine.

7.6 Bibliographie

- Abhilash P.C. & Yunus M., 2011. Can we use biomass produced from phytoremediation? *Biomass Bioenergy*, **35**, 1371-1372.
- Adler A. & Dimitriou I., 2008. Wood Fuel Quality of Two *Salix Viminalis* stands fertilized with sludge, ash and sludge-ash mixtures. *Biomass Bioenergy*, **32**, 914-925.
- BIOMASSE NORMANDIE, 2007. Étude de la mobilisation de nouvelles ressources ligneuses pour le développement du bois-énergie en Normandie –Rapport Intermédiaire. 30 p. https://ofme.org/bois-energie/documents/Combustible/20071016_B-NORMANDIE_Rap_partie_BFV.pdf (28/03/2013).
- COBELPA, 2007. *Papier & Environnement*. Rapport. Bruxelles : COBELPA.
- Dachouffe M. & Rasumny C., 2005. *Inventaire des sites d'activité économique désaffectés à la mi-septembre 2004 et premiers enseignements de l'application du décret du 1^{er} avril 2004 relatif à l'assainissement des sols pollués et aux sites d'activités économiques à réhabiliter*. Rapport. Namur, Belgique : Région Wallonne, Division de l'Aménagement et de l'Urbanisme.

- Dickinson N.M., 2000. Strategies for sustainable woodland on contaminated soils. *Chemosphere*, **41**, 259-263.
- Dimitriou I. & Aronsson P., 2005. Des saules pour l'énergie et la phytoremédiation en Suède. *Unasylva*, **221** (56), 47-50.
- Evlard A. et al., 2013. Étude du saule et de l'aulne pour la phytoremédiation des berges de cours d'eau non navigables. In : Druart Ph., Husson C. & Paul R. (Eds.). *Renaturation des berges de cours d'eau et phytoremédiation*. Gembloux, Belgique : Presses agronomiques de Gembloux.
- FCBA, 2010. *Étude pour la qualification des déchets de bois traités et souillés en combustible*. Rapport. Angers, France : ADEME.
- French C.J., Dickinson N.M. & Putwain P.D., 2006. Woody biomass phytoremediation of contaminated brownfield land. *Environ. Pollut.*, **141**, 387-395.
- German waste wood ordinance, 2002. *Ordinance on the Management of Waste Wood*. http://www.bmu.de/fileadmin/bmu-import/files/pdfs/allgemein/application/pdf/wastewood_ordinance.pdf (28 mars 2013).
- Greger M. & Landberg T., 1999. Use of Willow in Phytoextraction. *Int. J. Phytorem.* **1** (2), 115-123.
- Hytönen J. & Saarsalmi A., 2009. Long-term biomass production and nutrient uptake of birch, alder and willow plantations on cut-away peatland. *Biomass Bioenergy*, **33**, 1197-1211.
- King R. et al., 2006. Changing contaminant mobility in a dredged canal sediment during a three-year phytoremediation trial. *Environ. Pollut.*, **143** (2), 318-326.
- Koelbener A. et al., 2008. Competition alters plant species response to nickel and zinc. *Plant Soil*, **303**, 241-251.
- Meers E. et al., 2007. Potential of five willow species (*Salix* spp.) for phytoextraction of heavy metals. *Environ. Exp. Bot.*, **60** (1), 57-68.
- Migeon A. et al., 2009. Metal accumulation by woody species on contaminated sites in the North of France. *Water Air Soil Pollut.*, **204**, 89-101.
- Mleczek M. et al., 2010. Biomass productivity and phytoremediation potential of *Salix alba* and *Salix viminalis*. *Biomass Bioenergy*, **34**, 1410-1418.
- Office fédéral de l'environnement, 2006. *Exploitation des installations de stockage, de broyage, de valorisation et d'incinération des déchets de bois: Aide à l'exécution concernant les déchets de bois*. Rapport. Berne, Suisse : Office fédéral de l'environnement.
- Mousseau S., 2007. *État de l'art de la réglementation Européenne sur la valorisation des déchets de bois*. Angers, France : ADEME, 32 p.
- Otones V. & Alvarez-Ayuso E., 2011. Arsenic distribution in soils and plants of an arsenic impacted former mining area. *Environ. Pollut.*, **159** (10), 2637-2647.

- Parlement et Conseil Européens, 2009. Directive 2009/28/CE du Parlement européen et du Conseil du 4 décembre 2000 relative à la promotion de l'utilisation de l'énergie produite à partir de sources renouvelables. *J. Officiel* L 140/16 du 05/06/2009.
- Pulford I.D. & Watson C., 2003. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees – a review. *Environ. Int.*, **29**, 529-540.
- Ruttens A. et al., 2011. Short rotation coppice culture of willows and poplars as energy crops on metal contaminated agricultural soils. *Int. J. Phytorem.*, **13**, 194-207.
- Stals M. et al., 2010. Flash pyrolysis of heavy metal contaminated biomass from phytoremediation: influence of temperature, entrained flow and wood/leaves blended pyrolysis on the behaviour of heavy metals. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **87**, 1-7.
- Zacchini M. et al., 2009. Metal tolerance, accumulation and translocation in poplar and willow clones treated with cadmium in hydroponics. *Water Air Soil Pollut.* **197** (1-4), 23-34.



Construction et développement d'une filière de production d'écotypes ligneux pour l'application des techniques végétales à la renaturation des berges de cours d'eau

Druart Philippe, Leclercq Martine, Joussemet Marie-Anne., Bender Jerry, Adant Stéphane, Delecourt Bernard, Mertens Patrick, Hussson Claude, Chandelier Anne, Mingeot Dominique, Hausman Jean-François, Evlard Aricia, Bajji Mohammed, Delcarte Jérôme, Lambot Francis

Résumé

Les activités décrites dans cet article ont été menées dans le cadre des projets Interreg successifs intitulés «ECOLIRI» et «ECOLIRIMED». Elles avaient pour but de contribuer à l'application du génie végétal pour résoudre des problèmes purement hydrauliques rencontrés avec les cours d'eau non navigables de la région transfrontalière comportant la Wallonie, la Lorraine française et le Grand-Duché de Luxembourg, en ciblant la stabilisation des berges, la sauvegarde de la biodiversité et le maintien de la qualité des eaux de surface.

Des écotypes d'aulne glutineux, de saules et de frênes ont été rassemblés à partir de prospections menées sur les berges de rivières faisant partie des bassins du Rhin, de la Meuse et, dans une moindre mesure, de l'Escaut, constituant ainsi des variétés multiclonales d'écotypes ligneux. Si le frêne a été rapidement abandonné suite à l'émergence de la chalarose, une filière de production d'aulnes et de saules a été mise en œuvre. Elle repose sur l'existence de parcs à bois, la mise au point de conditions de bouturage, d'élevage et de conservation optimisées des plants ainsi que sur des règles de gestion et de diffusion du matériel végétal; l'objectif étant de permettre un approvisionnement régulier et fiable, en plants destinés aux programmes de renaturation des ripisylves et de stabilisation durable des berges de cours d'eau. La multiplication des écotypes est conduite à partir de parcs à bois gérés par des institutions publiques et entretenus selon les pratiques horticoles qui maintiennent la capacité rhizogène du matériel végétal. Traités lorsque nécessaire en vue d'une bonne reprise, les plants sont délivrés en fonction des conditions d'accessibilité aux sites de végétalisation. Bien que la qualité génétique reste inexplorée, la valeur phénotypique (port, vigueur) est connue. Outre l'origine certifiée de tous les clones, certains aulnes ont été repérés pour leur tolérance au dépérissement causé par *Phytophthora alni* alors que d'autres aulnes et saules étaient notés pour leur tolérance aux éléments-traces métalliques à la suite d'évaluations spécifiques réalisées

en complément. Plusieurs aulnes issus de graines collectées sur des arbres sans symptôme en site infecté par *P. alni* ou produits *in vitro* pour induire des propriétés de phytoremédiation par variation somaclonale, ont été intégrés aux collections représentatives de la diversité naturelle. Dans ces conditions, le matériel végétal proposé doit pouvoir s'adapter naturellement aux risques biologiques prévisibles pour une durabilité satisfaisante des travaux impliquant les techniques végétales non seulement pour la renaturation de berges, mais aussi, la végétalisation de zones humides ou écologiquement équivalentes. Il contribuera à valoriser les paysages et à préserver, voire même à améliorer l'équilibre des écosystèmes de la région. La réimplantation de ces essences complémentaires doit permettre, à moyen terme, de mieux raisonner la gestion des phénomènes d'érosion et d'inondation.

Mots-clés : génie végétal, protection des berges, écotype, zone ripicole, renaturation phytoremédiation, inondation.

Creation and development of a woody ecotype production sector for the revitalisation of river and stream banks using plant engineering techniques

The activities described in this article took place in the context of two successive Interreg projects, namely ECOLIRI and ECOLIRIMED. In both cases the aim was to contribute to the application of plant engineering to solving purely hydraulic problems on non-navigable waterways in the cross-border area spanning Wallonia, Lorraine and the Grand Duchy of Luxembourg. Work focused on stabilising banks, preserving biodiversity and maintaining surface water quality.

Ecotypes of black alder, willow and ash were collected after exploring river banks in the Rhine, Meuse and, to a lesser extent, Escaut basins, thus forming multiclinal varieties of woody ecotypes. Whereas the outbreak of ash dieback led to the species promptly being discarded, a production sector for alder and willow was established. It is based on the existence of timber yards, the development of optimized conditions for cutting on a large scale, for plants growth training and for conservation as well as rules of management and distribution of the plant material, the aim being to allow supply regular and reliable in plants for renaturation programs of riparian areas and sustainable stabilization of river banks. Ecotypes were multiplied from stock orchards run by public institutions and managed in accordance with horticultural practices that maintain the plant material's rhizogenic capability. After treating, if necessary, to promote plants regrowth, the plants were delivered according to the accessibility of the different revegetation sites. Although the genetic quality remains unexplored, the phenotypic value (habit and vigour) is known. Apart from the certified origin of all the clones, some alders were picked out for tolerance to blight caused by *Phytophthora alni*, whereas other alders and willows were found to be tolerant to metal trace elements following specific, additional assessments. Several black alders either

grown from seeds collected from symptomless trees on sites infected by *P. alni* or produced *in vitro* to induce phytoremediation properties by somaclonal variation were introduced into the collections representing natural diversity. In these conditions the plant material supplied must be able to adapt naturally to the foreseeable biological risks for the satisfactory sustainability of the plant engineering-based work, not only for revitalising river banks but also revegetating wet or ecologically equivalent areas. The material will help to enhance the countryside and to maintain or even improve the balance of the region's ecosystems. In the medium term, replanting with these complementary species will result in more effective management of erosion and flooding.

Keywords: Plant engineering, riverbank protection, ecotypes, renaturation, phytoremediation, flooding, riparian zones.

8.1 Introduction

Pendant des siècles, les cours d'eau et leurs ripisylves ont procuré l'énergie hydraulique, le bois de chauffage et finalement l'hydroélectricité aux populations riveraines qui assuraient par la même occasion l'entretien des berges. Au cours des dernières décennies, ces ressources énergétiques ont perdu de leur intérêt et la végétation ligneuse délaissée a progressivement encombré certains lits de cours d'eau, contribuant ainsi aux inondations locales et à l'érosion.

Par ailleurs, les aménagements coûteux réalisés dans le passé en vue d'une meilleure gestion physique des cours d'eau, n'apportent pas toujours les améliorations souhaitées tandis que des études scientifiques démontrent l'intérêt écologique de restaurer les écosystèmes et de préserver la ripisylve (Lambot et al., 2013).

Face à cette situation, les responsables de la gestion des cours d'eau s'accordent à développer des techniques végétales pour réhabiliter et stabiliser les berges, mariant ainsi les contraintes de l'hydraulique à celles de l'écologie (Lachat, 1998 ; Lambot et al., 2013). Le choix des végétaux se porte prioritairement sur des essences ligneuses complémentaires du point de vue de l'architecture du système racinaire (profond et puissant pour le frêne, traçant pour l'aulne glutineux) et tolérantes aux inondations (pour l'aulne et le saule). Le saule et l'aulne fournissent en même temps des abris stables à la faune piscicole.

À l'entame de nos travaux (2004), les pépinières privées délivraient du matériel végétal d'origines étrangères ne présentant aucune fiabilité de traçabilité. Cette pratique d'importation de plants présente des risques écologiques à différents niveaux :

- L'introduction de nouveaux agents pathogènes n'ayant pas cohabités avec les essences indigènes et pouvant provoquer des épidémies (Chandelier et al., 2013) ;
- Une mauvaise adaptation des plants aux conditions climatiques et édaphiques régionales ;
- Une « pollution » génétique du matériel forestier indigène par le pollen d'origine étrangère.

À l'opposé, les écotypes peuplant nos régions de manière dynamique et évolutive présentent une meilleure garantie d'adaptation et donc de durabilité. Toutefois, il n'existe aucun approvisionnement structuré de ces écotypes ni de connaissances suffisantes relatives à leur état d'équilibre par rapport aux conditions environnementales actuelles.

Il était donc nécessaire, dans un premier temps, de construire une filière d'approvisionnement fiable et régulier de ces ligneux d'origine certifiée (Projet Interreg III ECOLIRI). Dans un deuxième temps, la mise en œuvre de cette filière devait être organisée pour assurer une production à plus grande échelle et pour permettre la diffusion des plants dans le respect d'une diversité évolutive des espèces (Projet Interreg IV-A ECOLIRIMED).

8.2 Construction de la filière d'écotypes ligneux

Le lit, les berges et les rives de chaque cours d'eau forment un tout avec les nappes phréatiques pour chaque bassin versant. La stabilisation durable des berges a des répercussions globales tant sur la capacité hydraulique des cours d'eau, et donc sur le contrôle des inondations, que sur la pérennité des habitats aquatiques. Certaines maladies, dispersées par l'eau, demandent une harmonisation des mesures de prévention sur l'ensemble des réseaux susceptibles d'être touchés. Une intégration transfrontalière permet le maillage écologique non seulement entre les sites mais aussi avec les zones limitrophes.

La zone transfrontalière envisagée comporte la Wallonie (la province du Luxembourg étant prioritaire), le Grand-Duché de Luxembourg et la Lorraine française. De par le passé industriel de cette « Grande Région » d'Europe, les éléments-traces métalliques (ETM) qui s'y trouvent disséminés, risquent de contaminer l'environnement au travers des eaux de surfaces et des sédiments. Du fait des coûts prohibitifs des techniques physico-chimiques de remédiation et de leurs impacts délétères sur l'environnement, l'ingénierie végétale devient aujourd'hui la meilleure solution pour préserver les écosystèmes vis-à-vis des ETM.

La tolérance du matériel végétal aux ETM est donc à considérer pour confiner et mieux contrôler ces polluants inaltérables et dangereux, à la fois pour les écosystèmes et la santé publique (Bajji et al., 2013 ; Evlard et al., 2013a ; Evlard et

al., 2013b) avec à la clé la production d'une biomasse potentiellement valorisable (Delcarte et al., 2013). La constitution de parcs à bois pour les projets de replantation comporte la prospection des bassins, suivie de la fixation et de l'établissement des individus repérés. Tandis que la collecte de l'aulne glutineux débute directement dans trois composantes de la « Grande Région », celle des saules et frênes est seulement menée en Wallonie.

8.2.1 La prospection des bassins versants

Dans un premier temps, il était primordial de rassembler un maximum de provenances différentes, en vue d'assurer une représentativité aussi large que possible de la biodiversité existante. Chez l'aulne en particulier, on pouvait s'attendre à ce que cette contrainte permette de découvrir parmi les génotypes collectés, des formes de tolérance ou de résistance à *Phytophthora alni*, l'agent pathogène oomycète responsable du dépérissement des aulnes (Chandelier et al., 2013).

□ L'aulne

Côté lorrain, la prospection des aulnes a été menée à l'échelle des bassins versants Rhin–Meuse couvrant les quatre départements en plus de l'Alsace. Ainsi tenait-elle compte du rôle de l'eau de rivière dans la dissémination des graines. Les sites de récolte ont été sélectionnés sur base d'une enquête épidémiologique relative au dépérissement, initiée dès 2004 (Chandelier et al., 2013). Ils ont été caractérisés par le type de cours d'eau, l'environnement local et la prévalence de la maladie due à *Phytophthora alni*. De leur côté, les gestionnaires de cours d'eau locaux ont contribué au repérage d'autres sources de matériel équivalent. L'aire de répartition des sites de récolte était assez large : 36 sites répartis sur 26 cours d'eau différents (**Tableau 8.1**). Pour les rivières les plus importantes de la région, la distance séparant deux sites était d'au moins 4 km. Pour un site, la distance séparant le premier du dernier arbre prélevé était en général d'1 km au maximum et la distance moyenne entre deux arbres de 70 m.

En Wallonie et au Luxembourg, les critères de sélection visuelle étaient limités au seul moment de prospection : état sanitaire général, port peu érigé, âge des rejets de souches éventuels. Au total, 60 sites ont été visités sur 42 cours d'eau (**Tableau 8.1**). Ils appartiennent en majorité au bassin de la Meuse (34), mais aussi aux bassins du Rhin (4) et de l'Escaut (4). Au Luxembourg, il y a 11 cours d'eau et autant de sites prospectés dans le bassin du Rhin.

Dans les trois régions, le protocole initial prévoyait de récolter 20 à 30 pousses apicales sur 5 à 10 individus par site.

Tableau 8.1. Origines des variétés multiclones d'aulnes « LIRIA ».

a) LIRIA W : 370 clones de 42 cours d'eau de Wallonie.

Bassin	Sous-bassin	Cours d'eau	Nombre	Localité
Escaut	Escaut-Lys, Haine, Senne	Escaut, Anneau, Trouille, Samme	21	Obigies, Pecq, Quiévrain, Givry, Spienne, Seneffe.
Meuse	Amblève, Lesse, Meuse amont et Oise, Meuse aval, Ourthe, Sambre, Semois-Chiers	Lienne, Salm, Almache, L'Homme, Lesse, R. du Brou, Wamme, Eau Noire, Houille, Moline, Samson, Viroin, Hoyoux, Mehaigne, Soile, Aisnes, Chéoux, Ourthe occid., Ourthe orient., Biesme, Eau d'Heure, Hantes, Ligne, Orneau, Ry de Fosses, Ry d'Yves, Thyria, Ture, Mellier, Messancy, Rulles, Ton, Chiers, Meuse, Vire	323	Stoumont, Grand-Halleux, Trois-Ponts, Gembes, Forrières, Daverdisse, Resteigne, Rochefort, Frêne, Harsin, Nismes-Pesche, Vencimont, Maredsous, Gesves, Vierves-sur-Viroin, Havelange, Fallais, Moha, Meeffe, Blier, Bomal, Chéoux, Ferme-au-Pont, Lavacherie, Tenneville, Wyompont, Achouffe, Houffalize, Rensiwez, Aiseau-Présles, Jamioulx, Mont s/Marchienne, Leval-Chaudeville, Merbes-le-Château, Montignies St Christophe, Saint-Martin, Onoz, Fosses-la-Ville, Yves-Gomezée, Solre s/Sambre, Marbehan, Messancy, Habay-la-Neuve, Tintigny, Ethe, Saint-Mard, Latour
Rhin	Moselle	Attert, Our, Sûre, Wiltz	26	Attert, Schoenberg, Grumelange, Martelange, Radelange, Wisembach, Benonchamps
Total	11	42	370	60

b) LIRIA F : 251 clones de 26 cours d'eau de Lorraine française.

Meuse	Semois-Chiers	Chiers, Meuse	14	Charency-Vezin, Vigneul-sous-Montmédy, Inor
Rhin	Moselle	Avière, Bièvre, Bist, Blies, Blette, Boler, Canner, Durbion, Esch, Fave, Kieselback, Madon, Meurthe, Mortagne, Moselle, Neuné, Nied allemande, Nied française, Plaine, Rulles, Sarre, Sarre rouge, Schwalbach, Vologne	237	Frizon, Sarrebourg, Creutzwald, Mignéville, Blies-Guersviller, Gavisse, Budange, Gugnécourt, Vaxoncourt, Thionville, Martincourt, Frapelle, Ambacourt, Thiaville, Fraize, Rehainviller, Autrey, Eloyes, Millery, Pierre la Treiche, Gondreville, Laveline-devant-Bruyère, Guinglange, Pange, Pont à Chaussy, Allarmont, Rugney, GrosBliederstorf, Gosselming, Sarraltroff, Nitting, Volmunste, Granges-sur-Vologne
Total	2	26	251	36

c) LIRIA L : 116 clones de 11 cours d'eau du Grand-Duché de Luxembourg.

Rhin	Sûre Supérieure	Clerve, Irbich, Wiltz, Woltz, Sûre	55	Schuttburgermühle-Clervaux, Munshausen, Merkholtz, Maulusmühle, Bockholtz
	Sûre Inférieure	Blees, Ernz Blanche, Our, Tandelerbaach, Tirelbaach	51	Selz-Keiermillen, Ermsdorf-Reisdorf, Wallendorf, Selz, Gilsdorf
	Alzette	Wark	10	Warken
Total	3	11	116	11

☐ Les saules et les frênes

Les écotypes de saules wallons proviennent de 56 sites répartis sur 54 cours d'eau faisant partie des mêmes bassins cités plus haut à savoir la Meuse (45), le Rhin (3) et l'Escaut (6) (**Tableau 8.2**) tandis que ceux du frêne sont issus de 15 sites et 13 cours d'eau wallons du seul bassin de la Meuse (**Tableau 8.3**).

8.2.2 La fixation

La méthode de fixation a été adaptée à l'espèce végétale. Le bouturage à bois sec a été privilégié pour le saule tandis que le bouturage feuillé a été choisi pour l'aulne et le frêne.

Chez le saule, des plançons ou des rameaux dormants ont été récoltés en hiver sur des individus adultes. Ils ont été stockés en chambre froide (+ 2 °C) jusqu'au printemps, puis placés en couches extérieures (**Figure 8.1**) avec ou sans pré-traitement auxinique.

Chez l'aulne, des fragments apicaux de jeunes pousses feuillées de l'année ont été prélevés entre juin et août (de 2004 à 2009). Ces rameaux sont humidifiés dès leur récolte et gardés au frais jusqu'au traitement auxinique. Celui-ci est pratiqué au CRA-W le jour même pour le matériel collecté en Wallonie et au Grand-Duché de Luxembourg ou le lendemain pour le matériel de Lorraine transmis par colis postal conditionné (boîte isolée et réfrigérée).

La méthode d'enracinement mise au point au CRA-W chez *Prunus* pour la multiplication à grande échelle de sujets porte-greffes nanisants du cerisier a été initialement appliquée (Tréfois, 1988).

Tableau 8.2. Origines de la variété multiclonale d'écotypes de saules «LIRIS».

LIRIS W : 491 clones de 54 cours d'eau de Wallonie.

Bassin	Sous-bassin	Cours d'eau	Nombre	Localité
Escaut	Dyle-Gette	Dyle, Grande Gette, Lasnes, Petite Gette	40	Genappe, Jodoigne souveraine, Lasnes, Orp-le-Grand
	Escaut-Lys	Escaut, Trouille	22	Obigies, Givry
Meuse	Amblève	Barechin	10	Vielsalm
	Lesse	Almache, L'Homme, Biran, R. Bonefosse, R. du Brou, R. d'Ave, R. Rochettes, Wamme	75	Gembes, Bras, Rochefort, Forrières, Opont, Wellin, Arville, Hargimont
	Meuse amont et Oise	Molignée, Bocq, Samson, Strouvia	44	Maredsous, Spontin, Faux-les-Tombes, Stru-Haltinne
	Meuse aval	Hoyoux, Soile	23	Verlée, Meeffe
	Ourthe	Trouille, Marchette, Néblon, Ourthe occid., Ourthe orient., R. Cens, R. Chardeneux, R. Erneuville, R. Floumont, R. Heure, R. Naives, R. Tenneville, Serine Fagne	115	Bertogne, Givry, Marche-en-Famenne, Jenneret, Tenneville, Bougnimont, Gouvy, Cens, Chardeneux, Erneuville, Ortho, Heure, Melreux, Champlon, Vaux-Chavanne
	Sambre	Ligne, Orneau, Thyria, Ture	36	Saint-Martin, Onoz, Corroy-le-Château, Thy-le-Château, Solre s/Sambre
	Semois-Chiers	Attert, Chevratte, Chiers, Mellier, Messancy, Panwé, R. Aleines, Rulles, R. du Plane, R. du Wé, Semois, Vierre, Vire	99	Attert, Bellefontaine, Torgny, Marbehan, Messancy, Tournay, Bertrix, Rulles, Poncel Sivry, Les Bulles, Chiny, Latour
Rhin	Moselle	Our, Sûre, Wiltz	27	Scönberg, Tintange, Benonchamps
Total	10	54	491	56

Tableau 8.3. Origines de la variété multiclonale de Frênes « LIRIF W ».

LIRIF W : 59 clones de 13 cours d'eau de Wallonie.

Bassin	Sous-bassin	Cours d'eau	Nombre	Localité
Meuse	Lesse	Lesse	1	Daverdisse
	Meuse aval	Mehaigne, Soile	8	Moha, Meeffe
	Sambre	Eau d'Heure, Ligne, Orneau, Ruisseau d'Yves, Thyria	20	Berzée, Saint-Martin, Onoz, Yves-Gomzée, Thy-le-Château
	Ourthe	Aisnes, Ourthe occ., Ourthe orient	18	Bomal, Durbuy, Esneux/Tilff, Ferme-au-Pont, Houffalize
	Semois-Chiers	Semois, Étang trapperie	12	Bouillon, Habbay-la-Vieille
Total	5	13	59	15

Comme l'aptitude à l'enracinement des boutures feuillées diminue plus ou moins rapidement avec le vieillissement du pied-mère, il a parfois été nécessaire de recourir à certaines techniques de « rajeunissement » (ou de « juvénalisation ») pour récupérer un état physiologique réactif à la rhizogenèse. Elles consistent à provoquer l'émergence de nouvelles pousses vigoureuses par un recépage, une taille des branches, des incisions au niveau du tronc, voire un abattage radical de l'arbre. En fait, la coupe des pieds-mères au ras du sol est la plus efficace à la réussite du bouturage, les rejets situés très près du système racinaire exprimant alors les capacités d'enracinement les plus marquées. Chez certains ligneux, ces pratiques s'accompagnent aussi, de la restauration de caractères distinctifs de leurs semis telles que les feuilles lobées chez l'eucalyptus ou la restitution de l'orthotropie des pousses chez les conifères.

Le frêne est généralement plus récalcitrant à enracer que l'aulne. Pour cette espèce, un greffage en fente sur des semis d'un an a été le plus souvent privilégié en préparation du bouturage feuillé. Le bois de l'année récolté en hiver et conservé en chambre froide (2 °C), fournissait les greffons en mai, la jonction entre les cambiums du semis et du greffon s'établissant endéans les deux mois qui suivent la manipulation. Dépendant de la réussite du greffage, la méthode présente deux inconvénients majeurs à savoir : la préparation des pieds-mères destinés aux greffages et la nécessité de plusieurs années de culture du fait d'arrêts de croissance récurrents chez le frêne. Répété en cascade, ce greffage produit une amélioration progressive de la réponse à l'enracinement des boutures chez diverses espèces forestières qui ne peuvent être sélectionnées qu'au stade adulte (essais initiés par Franclet dès la fin des années 1970 sur des résineux et étendus ensuite aux feuillus à l'Association Forêt Cellulose, France).

Chaque arbre a été enregistré avec ses coordonnées géographiques (GPS) et étiqueté au sein d'une filière appelée «ECOLIRI» (pour «Écotypes ligneux de rivières») avec :

- L'initiale de l'essence récoltée : «A» pour Aulne, «S» pour Saule, «F» pour Frêne ;
- L'initiale de la région d'origine : «W» pour Wallonie, «F» pour la Lorraine française, «L» pour Grand-Duché de Luxembourg ;
- Un numéro d'accession propre.

Si la réussite de la fixation des plançons ou des boutures de saules a été totale, les taux enregistrés pour les boutures d'aulnes issues de rejets de souches se sont situés entre 85 et 100 % et ont atteint 80 % pour les frênes juvénilisés.

8.2.3 Établissement en parcs à clones

Chaque région a créé un parc à bois qui regroupe les aulnes fixés provenant de son territoire. Les arbres y ont été plantés en haie, à raison de quatre copies par clone distantes de 0,5 m dans la ligne et de 0,9 m dans l'interligne (**Figure 8.2**) qui peut être enherbé. En vue de garder des taux d'enracinement élevés, la quasi-totalité des pousses latérales et apicales formées sont taillées chaque hiver.

L'installation du parc à clones lorrain a été prise en charge par AREXHOR depuis 2007 à Roville-aux-Chênes avec le suivi de l'INRA. Au Luxembourg, le parc à clones d'aulnes est installé à Merkholtz près de Wiltz et géré par les gestionnaires publics des cours d'eau.

En Wallonie, les clones d'aulnes ont été implantés à Gembloux, sur des parcelles appartenant au CRA-W. Celles-ci jouxtent les collections de saules et de frênes conduites selon des modalités sensiblement identiques (**Figure 8.2**). Le parc à bois des saules fut constitué à partir de plançons établis en nombre suffisant pour garder quatre copies de chaque clone en place. L'interligne enherbé de 3,5 m permet l'entretien mécanique. Les frênes ont été gardés greffés pour certains ou sur leurs propres racines pour d'autres.

Au terme de la prospection, la collection transfrontalière d'aulnes glutineux totalisait 717 clones provenant de 79 cours d'eau des bassins du Rhin (379 clones), de la Meuse (337 clones) et de l'Escaut (21 clones) (**Tableau 8.1A**). Elle est constituée de trois variétés multiclones de l'écotype correspondant respectivement aux labels LIRIA W, LIRIA F et LIRIA L à raison de 370, 251 et 116 clones, respectivement. L'écotype fixé provient de 11 sous-bassins couvrant toute la zone transfrontalière.

La collection des écotypes de saules wallons (**Tableau 8.2**) compte 491 clones provenant de 10 sous-bassins dont 9 sont communs aux origines d'aulnes fixées, le sous-bassin de la Dyle-Gette faisant exception.

La collection des frênes fixés (**Tableau 8.3**) se compose de 59 clones wallons provenant des sous-bassins de cinq sous-bassins de la Meuse communs aux écotypes de saules et d'aulnes, nos trois essences ligneuses de ripisylve.

Ces variétés multiclonaux rassemblent le matériel végétal de base pour l'application de l'ingénierie végétale à toute la zone transfrontalière. Elles constituent aussi des conservatoires de diversité génétique pour les zones appauvries et pour l'établissement de vergers à graines éventuels.

8.3 Approvisionnement en matériel végétal d'origine certifiée

Les gestionnaires de cours d'eau comptent sur un approvisionnement régulier, suffisant et fiable en plants de qualité pour répondre aux dispositions communautaires relatives à la gestion de l'hydrologie mais aussi à la qualité de l'eau (Directive Cadre sur l'Eau, 2000/60/CE) et au risque d'inondation (Directive 2007/60 et plan P.L.U.I.E.S en Région wallonne) selon un calendrier serré (Lambot et al., 2013). Ce sont les performances de production et les dispositions de diffusion s'appliquant aux variétés multiclonaux qui détermineront les modalités de fonctionnement de la filière en commençant par la gestion des parcs à bois.

8.3.1 La gestion des parcs à bois

La gestion des parcs à bois se conçoit dans le respect d'une diversité évolutive par rapport à certaines maladies et aux milieux contenant des éléments-traces métalliques qui représentent les risques majeurs pour les écosystèmes. Les variétés multiclonaux ont donc été évaluées à l'aide de marqueurs moléculaires (Mingeot et al., 2013) et d'inoculations ou traitements contrôlés (Chandelier et al., 2013; Evlard et al., 2013; Bajji et al., 2013) respectivement.

□ Des variétés multiclonaux d'aulnes

Les variétés multiclonaux sont constituées de l'espèce *Alnus glutinosa*. Si, à première vue, les graines de peuplements forestiers régionaux ou celles de vergers à graines rassemblant des individus collectés en bord de cours d'eau, semblaient pouvoir satisfaire les besoins en plants de la zone transfrontalière, la spécificité du port non érigé qui était souhaité pour les berges et le temps nécessaire pour disposer de fructifications significatives, ont favorisé l'option du clonage comme seul moyen d'approvisionnement.

En génétique forestière, la diversité génétique d'une espèce s'évalue à l'aide de plusieurs indicateurs (Kremer, 1994) de nature quantitative, c'est-à-dire liés à l'adaptation, à la croissance ou à la qualité de l'arbre, ou bien de nature qualitative qui

se traduit au niveau du polymorphisme allélique pour des propriétés enzymatiques (isozymes) ou des différences de composition ou de longueur de la chaîne d'ADN (marqueurs moléculaires du type RFLP, RAPD ou microsatellites par exemple).

Même si une forte structuration géographique des populations peut déjà se révéler à l'aide de caractères adaptatifs (phénologie, résistance au froid), une diversité intra-population de haut niveau est généralement reconnue aux ligneux, du fait de leur forte hétérozygotie. Il reste enfin à combiner, dans un même paramètre d'évaluation, la mesure de la diversité intraspécifique à celle de la diversité due à l'écosystème.

Dans notre cas, une étude moléculaire réalisée sur des clones provenant de toute la région (**Figure 8.3**), à l'aide de marqueurs microsatellites, démontre que la diversité génétique de la collection d'aulnes wallonne est bien représentative de celle de la région transfrontalière (Mingeot et al., 2013). Elle se distingue pourtant d'autres populations européennes (origines suédoises) soit par la présence d'allèles plus spécifiques, soit par des fréquences alléliques différentes (Mingeot D., communication personnelle).

À partir des études phytosanitaires menées conjointement au CRA-W et à l'INRA-Nancy, il n'a pas été possible de repérer de types totalement résistants à *P. alni* (Chandelier et al., 2013). Parmi les méthodes d'évaluation étudiées, celle qui s'approchait le plus des conditions naturelles de contamination, à savoir l'immersion du système racinaire de plants issus de semis ou de boutures, s'est révélée la plus fiable. En utilisant cette méthode, une large gamme de réponses a été observée, allant de clones très sensibles à des clones peu sensibles à l'infection. Toutefois, ces résultats doivent être confirmés en conditions d'infection naturelle le long des berges de cours d'eau où la maladie est présente. Ces comportements relatifs permettent au moins d'informer avant toute replantation, du risque potentiellement encouru avec certains clones. De plus, des plants de semis issus d'arbres sans symptômes, originaires de sites wallons contaminés, peuvent être proposés pour les nouvelles plantations (Chandelier et al., 2013).

□ Des variétés multiclones d'écotypes chez le saule

Ici, la seule préoccupation est d'identifier les arbres les plus proches possibles des espèces régionales ainsi que le sexe des clones. La morphologie florale des fleurs mâles et femelles du saule conduit à une première identification au niveau de l'espèce ou groupe d'espèces comparables. D'autres caractères tels que le dimensionnement et le port de l'inflorescence, la morphologie du rameau de l'année hivernant et la morphologie foliaire viennent compléter la détermination. Dans la collection, les arbres femelles sont deux fois plus nombreux que les arbres mâles. La collection de saule rassemble la plupart des espèces indigènes de Wallonie. Par

ordre de fréquence décroissante, on trouve *Salix fragilis* (~27 %), *S. caprea* (~20,5 %), *S. purpurea* (~12,5 %), *S. viminalis* (~6 %), *S. aurita* (~4 %), *S. triandra* (~3 %) et *S. alba* (~3 %). Les clones sont morphologiquement contrastés, principalement à cause d'un degré d'hybridation avancé des arbres (Mertens et al., 2011).

Les conditions édaphiques les plus favorables aux espèces de saules (Mertens, 2011) correspondent aux sols assez acides à neutres avec un état hydrique allant de l'humide au non-sec. *S. viminalis*, *S. fragilis* et *S. triandra* correspondent à ces larges facultés d'adaptation. *S. aurita* et *S. atrocinerea* s'adaptent aux sols très acides à assez acides et non-sec. Sur sols secs mais sans trop d'acidité, *S. caprea* et *S. purpurea* sont mieux adaptés. *S. alba* supporte les sols calcaires et humides sans excès. Ce dernier est héliophile strict comme *S. viminalis*, *S. fragilis* et *S. triandra*. *S. caprea* et *S. purpurea* sont deux espèces de fourrés qui supportent une large gamme de sols y compris les sols lourds pouvant aller de l'extrême humidité à la sécheresse.

S. alba, *S. viminalis*, *S. fragilis* et *S. triandra* sont les plus exigeants en lumière. *S. alba* est plus exigeant en humidité du sol que *S. viminalis*. Cette dernière espèce et *S. triandra* ont des développements et adaptabilités édaphiques comparables.

❑ De la variété multiclonale de frênes : émergence de la chalarose!

Au cours de la collecte des clones de *Fraxinus excelsior* L. sur le territoire wallon, une maladie émergente a été signalée (Chandelier et al., 2011). La chalarose du frêne provoquée par le champignon *Chalara fraxinea* est annoncée comme potentiellement très dévastatrice pour l'espèce. Le risque qu'elle représente pour la stabilisation des berges et la durabilité des végétalisations est non négligeable. Dès 2008, l'année de sa détection en France, il a été préconisé de stopper les plantations pour tous usages. Cette recommandation a été étendue, en attendant une évaluation définitive de l'impact de la maladie.

❑ Saules, aulnes et phytoremédiation

Les aulnes et les saules sont connus pour leur bonne capacité à croître même en sites contaminés par les éléments-traces métalliques (ETM) (Evlard et al., 2013). Une production de biomasse élevée et un système racinaire bien développé s'avèrent des critères de capacité de stabilisation de la pollution en deçà des seuils dommageables pour les équilibres écologiques (Delcarte et al., 2013). Des arbres réimplantés, il est attendu une tolérance suffisante vis-à-vis des ETM véhiculés par les eaux de surfaces ou contaminant les berges afin d'atteindre une colonisation durable des sols contaminés par le système racinaire.

Trente-sept clones d'aulnes de l'espèce *A. glutinosa* (dont 26 LIRIA W, 7 LIRIA L et 4 LIRIA F) et vingt-six clones de saules hybrides LIRIS (composés majoritairement

de *S. fragilis* x *S. alba*) ont été évalués du point de vue de leur comportement en lysimètres sur sol contaminé (boues de dragage) par un complexe de métaux lourds (Evlard et al., 2013b). Chez le saule, il a été constaté une mobilisation du plomb et du zinc vers les feuilles. À l'inverse, la teneur en cuivre était plus importante dans les tiges que dans les feuilles. Au regard des concentrations en ETM mesurées dans les tiges, certains clones plus que d'autres montraient toutefois, une meilleure capacité à l'extraction. D'après la littérature, cette variabilité d'extraction serait tout autant d'origine interspécifique qu'intraspécifique (Evlard et al., 2011 ; Evlard et al., 2013). Chez l'aulne, les teneurs en métaux retrouvées dans les tiges étaient moins importantes par rapport à celles retrouvées chez le saule. Les mêmes tendances sont observées pour le cadmium, le zinc et le plomb. Le comportement par rapport au cuivre pourrait être différent. Par ailleurs, des tests réalisés *in vitro* ont confirmé que les aulnes fixeraient le Cd davantage dans leurs racines (Bajji et al., 2013 ; Evlard et al., 2013b). Ici, 7 des 15 clones d'aulnes comparés ont montré une différence de tolérance positive. Ainsi, en fonction des contraintes spécifiques des sites contaminés à renaturer, la phytoextraction et la phytostabilisation peuvent être considérées séparément ou bien en association pour concentrer les ETM et prévenir leur dispersion ainsi que les risques écologiques et de santé publique qui y sont associés.

La biomasse étant limitée sur les ripisylves, des stratégies de gestion doivent être proposées. Si une réduction de croissance intervient en présence d'ETM chez le saule, le niveau de tolérance ne doit pas mettre en péril la survie des plants ni la valorisation du bois (Delcarte et al., 2013), que la pollution provienne des sédiments ou de l'eau (Evlard et al., 2013). Les clones accumulant davantage dans les tiges sont toutefois des éléments-clés comme phytoextracteurs. La valorisation de ce type de matériel nécessitera des précautions particulières (Delcarte et al., 2013).

L'application de la variation somaclonale au cours de bourgeonnements adventifs a conduit à créer de la diversité dans la réponse génétique en ce qui concerne la tolérance *in vitro* au cadmium (Bajji et al., 2013). Bien qu'il reste à la confirmer *in situ*, cette variation induite représente un potentiel d'enrichissement de la collection transfrontalière par rapport à l'adaptation aux pollutions envisageables pour cette région industrielle. D'autre part, des clones d'origine allemande sont venus s'ajouter à la collection dans le cadre d'échanges scientifiques et dans le but de les intégrer à des vergers à graines .

8.3.2 La production du matériel végétal pour la végétalisation

Les clones sont donc reproduits par bouturage feuillé pour l'aulne et à bois sec pour le saule. Afin d'assurer l'équilibre génétique de l'approvisionnement avec des plants de qualité, une maîtrise parfaite de la multiplication végétative est nécessaire.

Figure 8.1. Bouturage à bois sec chez le saule : insertion des boutures en substrat sable/tourbe blonde (A) (1 Volume/ 2 Volumes); croissance après 2 mois (B).



Figure 8.2. Établissements des clones d'aulnes (A, B, C) et de saules (D) en parc à bois : installation de LIRIA L à Merkholtz en 2007 (A); croissance de LIRIA F à Roville-aux-Chênes en 2008 (B); repousses après taille en haie de LIRIA W (C); diversité du port chez LIRIS W en 2011 à Gembloux (D). (L, F, W correspondent aux origines luxembourgeoise, lorraine et wallonne, respectivement).

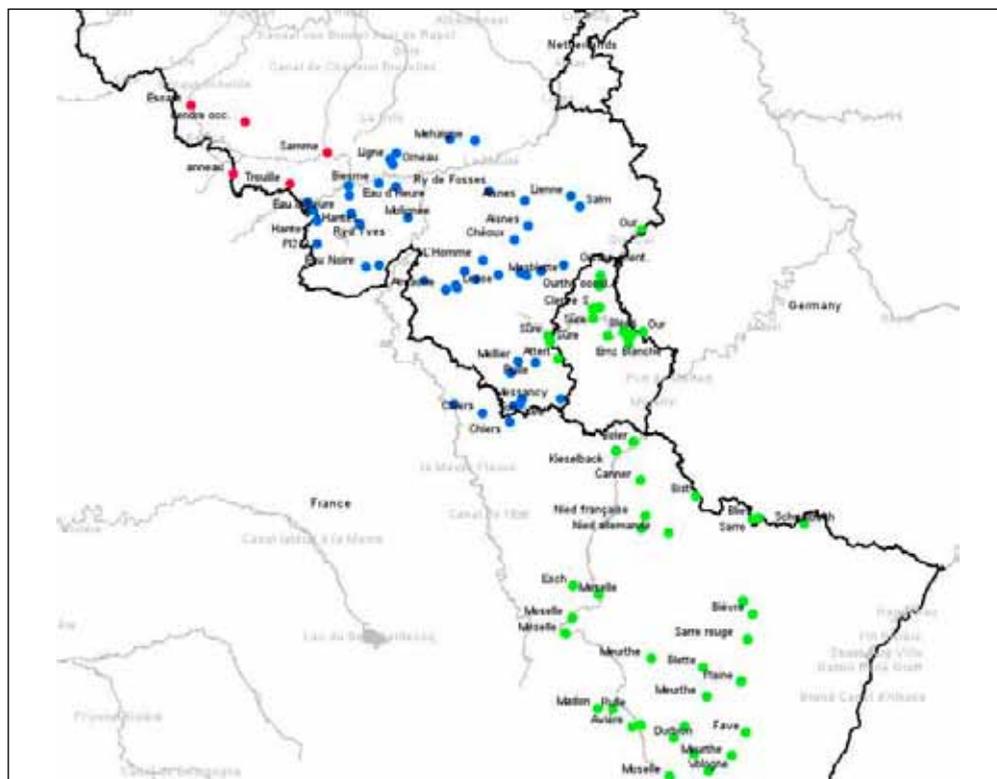


Figure 8.3. Distribution géographique des provenances d'aulnes sur les bassins du Rhin (vert), de la Meuse (bleu) et de l'Escaut (rouge).

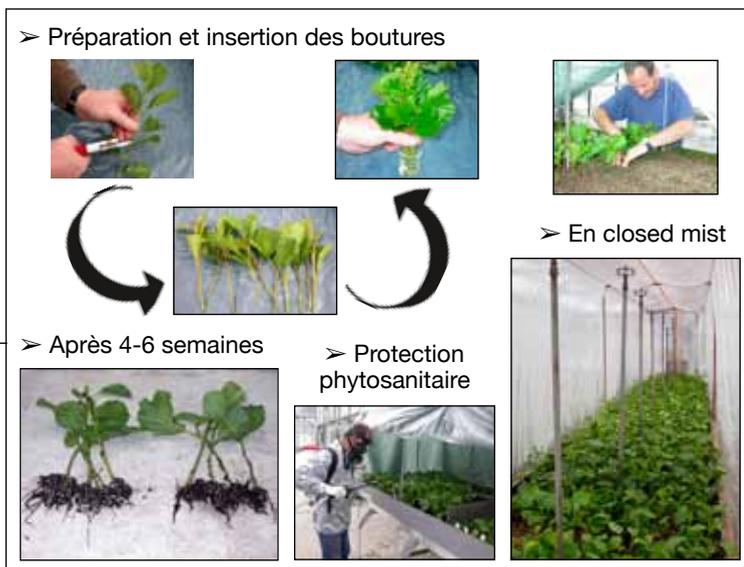


Figure 8.4. Phases de bouturage feuillé de l'aulne en CM.

□ Bouturage feuillé chez l'aulne

Chez l'aulne, le bouturage feuillé a été étudié en vue de définir un protocole performant (80 % d'enracinement) pour le plus grand nombre de clones mais aussi un protocole transférable à d'autres essences ligneuses susceptibles d'être impliquées dans les végétalisations.

a) *Le matériel végétal, son conditionnement et son support*

Les jeunes pousses de l'année (15-25 cm) sont récoltées dans les parcs à bois wallon, français et luxembourgeois pour être confiées au CRA-W qui dispose des installations pour la production. Dès réception, elles sont habillées et trempées dans une solution d'auxine (**Figure 8.4**) indispensable à l'induction du processus rhizogène. Les phases suivantes que sont l'initiation des primordia racinaires et l'allongement des racines ont lieu successivement dans les mêmes conditions de confinement. L'efficacité de l'induction diffère en fonction de la nature chimique du régulateur, sa formulation en solution-mère, sa concentration et la durée du trempage des boutures. L'acide indole-3-butyrique (AIB) et l'acide indole-3-acétique (AIA) dissous dans l'eau, la potasse ou l'alcool ont été employés pour des traitements à 0,5 ; 1 ; 2 et 4 g/l pendant 5 et 10 secondes.

Le développement du système racinaire peut ensuite, être conditionné par la composition du substrat de bouturage, son apport en éléments minéraux et son économie en eau. Un substrat pauvre évitant le manque ou au contraire l'excès d'eau provoquant l'asphyxie radiculaire, convient le plus souvent. Les boutures tolèrent en général, une gamme de pH assez étendue. D'autre part, le meilleur équilibre entre les phases solide, liquide et gazeuse du substrat est recherché à travers différentes associations de composants tels que terreau horticole ou tourbe blonde d'une part et sable de rivière, perlite ou vermiculite d'autre part.

b) *La méthode*

L'atmosphère entourant les boutures doit rester saturée en eau pour maintenir la turgescence des boutures feuillées jusqu'à ce que les nouvelles racines adventives soient fonctionnelles. À cette fin, trois conditionnements ont été comparés (**Figure 8.5**) :

- L'étouffée (E) qui consiste à placer les boutures sous une bâche plastique étanche avec un seul apport d'eau au moment de leur insertion ;
- L'« open mist » (OM) où les boutures non couvertes sont pulvérisées d'eau pendant environ 1 seconde toutes les 3 à 5 minutes ;
- Le « closed mist » (CM) dans lequel les boutures placées sous bâche plastique étanche sont pulvérisées pendant environ 1 seconde toutes les 30 à 45 minutes.

Au terme des essais, le protocole de bouturage est devenu le suivant :

- Trempage de la base des boutures pendant 10 secondes dans une solution contenant 2 g/l d'AIB (sous forme de sel potassique soluble dans l'eau);
- Utilisation du substrat de bouturage composé d'une part de tourbe blonde et de deux parts de vermiculite;
- Utilisation du « closed mist » (**Figures 8.4 et 8.5**) qui donne des résultats d'enracinement plus homogènes et un système racinaire de meilleure qualité;
- Maintien d'une température d'environ 22 °C dans le substrat, au niveau de la base de la bouture jusqu'au développement complet des racines principales (après 4 à 6 semaines).

Un fongicide à large spectre est appliqué de manière préventive et lorsque nécessaire en curatif avec alternance des matières actives à large spectre (telles que le thirame, captane).

c) La période

L'influence de la période de bouturage a été étudiée de 2009 à 2011. Les taux enregistrés ont conduit à faire une distinction entre la mi-juin et une période plus longue couvrant les mois de juillet et août. Les distributions de fréquence obtenues en répartissant les clones selon leur niveau, en cinq classes d'enracinement (**Figure 8.6**) montrent que pour la majorité d'entre eux, juin est la période à privilégier pour obtenir le meilleur taux de réussite. Cela confirme des observations réalisées antérieurement dans les installations du CRA-W avec d'autres espèces horticoles (cerisiers porte-greffe et ornementaux, pommiers, rosiers...) (Tréfois, 1988) et forestières (production d'une variété multiclonale de merisiers).

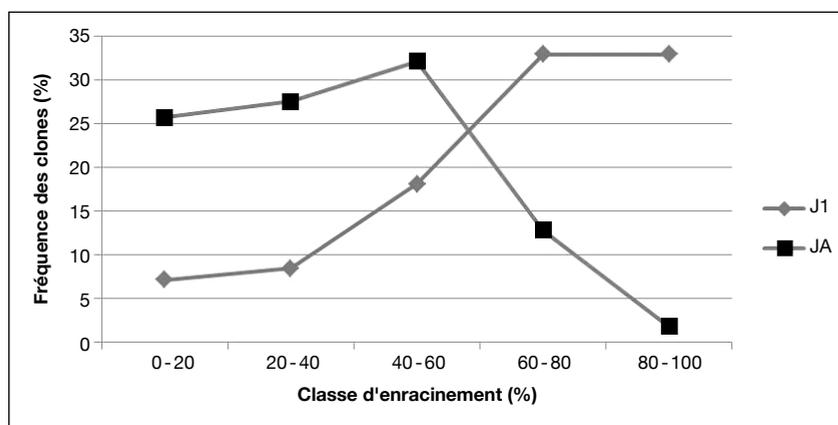


Figure 8.6. Distribution de fréquence des clones d'aulnes LIRIA W (%) en fonction de la classe d'enracinement : comparaison entre la période de mi-juin (J1) et celle de juillet-août (JA). Effectifs totaux : J1 : 155 lots de pousses apicales bouturées en juin des années 2009, 2010 et 2011 provenant de 96 clones. JA : 109 lots de pousses apicales bouturées de juillet à août en 2009 et 2010 provenant de 57 clones.

Calculé sur 30 des clones impliqués dans les bouturages de 2009 et 2010, l'impact de la période de juillet-août par rapport à celle de juin, correspond à une diminution moyenne du taux d'enracinement de 20 %.

Toutefois, la variation annuelle du taux moyen d'enracinement a dépassé 20 % pour le matériel bouturé en juin et a approché 15 % pour le matériel testé en juillet-août. Cela signifie que des conditions générales (état physiologique, luminosité, température extérieure...) extérieures au protocole d'enracinement, peuvent aussi fortement influencer la réussite du bouturage quelle que soit la période de sa réalisation. Il convient donc de rester très attentif à l'homogénéité des boutures, à leurs conditions de conservation et à leur dimensionnement notamment, avant leur insertion.

d) Évaluation de l'aptitude clonale à l'enracinement

Pour programmer des productions équilibrées du point de vue de leur représentativité de la diversité génétique locale, il est important d'évaluer l'aptitude à l'enracinement des clones. La question était donc de savoir si les taux d'enracinement enregistrés à la fixation des clones étaient représentatifs de l'enracinement exprimé en conditions de production.

Nous avons ainsi comparé les modes de fixation OM et CM pour un matériel produit en CM. Selon les résultats obtenus (**Tableau 8.4**), les taux d'enracinement enregistrés à la fixation du matériel ne sont pas représentatifs de l'enracinement obtenu en production quel que soit le mode de fixation appliqué.

Près de 60 % des clones fixés en mode OM proviennent de la classe de fixation «0-20» alors que 65,8 % des clones fixés en mode CM proviennent à l'inverse, de la classe de fixation «80-100». Bien que certains clones semblent montrer des performances d'enracinement reproductibles en multiplication CM (exemple: W109), elles pourraient être très variables pour d'autres (exemple : W110, W32, W112, W114, W256, W261). Les variations extrêmes d'une année à l'autre, telles que celles enregistrées avec LIRIA W112 pour lequel le taux moyen annuel passe de 20 à 100 %, pourraient vraisemblablement être d'origine accidentelle.

La réussite de la fixation, en termes de taux d'enracinement, est plus élevée en mode CM et les réponses enregistrées sont plus proches des taux obtenus en production. Des valeurs supérieures à 70 % d'enracinement en production ont été obtenues avec 60 % des clones considérés (69) pour cette évaluation de performance (**Figure 8.7**).

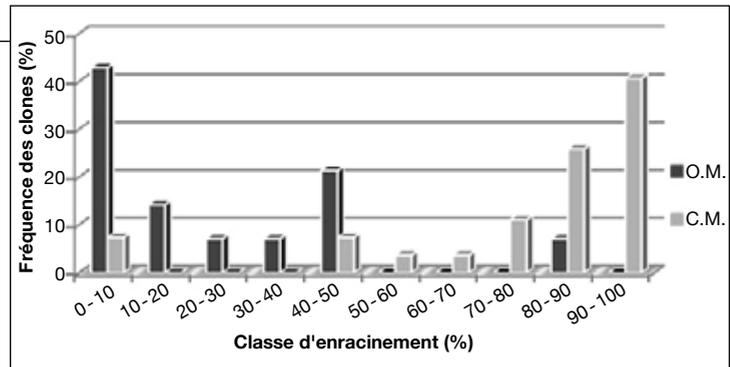
En fait, notre protocole de bouturage feuillé en mode CM s'est avéré performant pour plusieurs centaines de clones d'aulnes mais aussi pour les clones de frênes et pour les saules récalcitrants. Il s'est aussi révélé applicable à différents autres ligneux susceptibles de figurer parmi les essences colonisatrices d'espaces liés à la

ripisylve, aux zones humides, aux zones tampons, etc. tels le merisier (*Prunus avium*), l'érable (*Acer pseudoplatanus*, *A. saccharinum*, *A. monspessulanum* et *A. palmatum*), le noisetier (*Corylus avellana*), le charme (*Carpinus betulus*), le hêtre pourpre (*Fagus sylvatica purpurea*), le fusain (*Euonymus europaeus*) et la viorne (*Viburnum opulus* var. *lantana*).

Tableau 8.4. Distribution de clones d'aulnes LIRIA W par classe d'enracinement en fonction de leurs performances d'enracinement lors de la fixation en modes OM (W) ou CM (**W**) et de production en mode CM.

		Classe d'enracinement en production CM (%)				
Classes		0-20	20-40	40-60	60-80	80-100
Classe d'enracinement en fixation (%)	0-20	W72	W5 W73	W110 W114 W113 W52 W109 W109 W109 W309	W110 W114 W116 W10 W55 W140 W18 W308 W140	W113 W116 W2 W69 W117
	20-40		W32 W112 W15		W32 W112 W115	W112
	40-60				W260 W262 W321	W29 W76 W117 W263 W305
	60-80	W111	W111		W274 W283 W213	W211 W279
	80-100	W23	W247	W31 W256 W217 W216 W261 W313 W289 W215 W318	W256 W212 W217 W208 W312 W323 W301 W284	W31 W31 W212 W216 W261 W209 W287 W294 W210 W315 W251 W271 W214 W252 W299

Figure 8.7. Répartition des clones d'aulnes au taux d'enracinement supérieur à 70 %* en fonction de leur classe de fixation en modes OM et CM.
*53,9% des clones OM (14/26) et 62,8% des clones CM (27/43) répondent à ce critère d'enracinement en production.



Dans le cadre d'une multiplication à grande échelle, divers éléments de la préparation des boutures ainsi que du sevrage, de la survie et de la croissance des jeunes plantules sont à adapter aux conditions de production.

Bouturage à bois sec chez le saule

Pour le saule en général, les «plançons» dormants récoltés durant l'hiver et conditionnés en sachets plastiques non hermétiques avec application d'un fongicide en poudre (matière active telle que le thirame), sont placés en chambre froide à 2 °C jusqu'à l'implantation directe sur les berges au printemps.

Recours à la micropropagation chez l'aulne

Un protocole de micropropagation (**Figure 8.8**) optimisé (Bajji et al., 2013) reste d'application pour des cas particuliers tels que la livraison à court terme de quantités importantes de plants d'une part, la fourniture de matériel issu de sélection *in vitro* d'autre part. Ainsi, les vitroclones allemands tolérants au Cd ont été multipliés selon cette méthode en vue de leur intégration ultérieure à des vergers à graines.

Élevage des plants

Bien que les boutures ou vitroplants d'aulnes puissent être laissés à croître en tablette jusque novembre-décembre, leur survie et surtout leur croissance, sont favorisées par un transfert en substrat frais après 4 à 6 semaines. Les jeunes plants sont transplantés en pépinière au printemps suivant, pour y atteindre un développement suffisant à leur implantation sur site.

Une fois sur site, la reprise de ces plants et leur vigueur sont des facteurs essentiels pour la stabilisation durable des berges. Dans le but de renforcer la qualité de ceux-ci, un pralinage des boutures a été testé avec 14 clones (**Tableau 8.5**).

Celles-ci ont été trempées au moment de leur transfert en pépinière d'élevage, dans un pralin commercialisé sous l'appellation « Pralumus » par la société Ard'Innov.

Tableau 8.5. Influence du pralinage* du système racinaire des boutures sur la reprise et la vigueur** moyennes des plants d'aulnes de clones LIRIA W après une année de pépinière en sol limoneux.

Écotype	Témoin			Pralinage			
	Nbre de plants	Reprise (%)	Diamètre (mm)	Nbre de plants	Reprise (%)	Diamètre (mm)	% témoin
W 271	6	100,0	11,0 ± 1,0	6	100,0	11,1 ± 0,9	100,0
W 274	12	75,0	9,6 ± 1,4	6	100,0	14,0 ± 4,1	146,6
W 279	11	81,8	11,1 ± 1,3	8	100,0	16,6 ± 2,0	145,6
W 283	9	77,8	9,6 ± 1,0	8	87,5	12,1 ± 1,4	126,4
W 284	8	75,0	9,0 ± 1,9	3	100,0	14,0 ± 2,7	155,6
W 287	11	72,7	12,9 ± 2,7	8	100,0	11,1 ± 1,3	86,1
W 289	10	100,0	9,0 ± 0,8	10	100,0	12,4 ± 1,6	137,8
W 294	15	60,0	11,0 ± 1,7	5	100,0	15,0 ± 2,6	136,4
W 299	8	100,0	12,5 ± 2,1	7	100,0	13,6 ± 1,9	108,8
W 301	13	76,9	10,1 ± 1,5	10	100,0	13,2 ± 2,9	130,7
W 305	9	100,0	13,6 ± 1,8	8	100,0	14,1 ± 2,2	103,7
W 308	7	85,7	11,5 ± 2,9	7	85,7	11,3 ± 1,6	98,3
W 312	7	100,0	9,7 ± 2,4	6	100,0	10,0 ± 1,6	103,0
W 315	12	75,0	9,7 ± 2,1	8	100,0	12,8 ± 2,9	131,9
Moyenne ± Écart-type		84,3 ± 13,4	10,7 ± 1,5		98,1 ± 4,9	13,0 ± 1,8	121,5 ± 21,7

*Pralinage avec « Pralumus » d'Ard'Innov.

**La vigueur est estimée par la mesure du diamètre au niveau du collet des plants.

Ce pralin est à base de substances humiques issues du traitement de la léonardite dont les propriétés favorables aux développements racinaire et végétatif avaient été mises en évidence au préalable sur des vitroplants et des plants de semis forestiers de diverses espèces. La reprise, la vigueur du plant (**Tableau 8.5**) et le volume du système racinaire (**Figure 8.9**) ont été évalués en fin de saison. En moyenne, la reprise des boutures d'aulnes traitées augmente de 14 %. Le diamètre du collet, qui est généralement représentatif de la vigueur et en relation étroite avec le développement du système racinaire, croît de près de 22 % suite au pralinage. Le volume de racines apprécié visuellement de manière relative par rapport au témoin



Figure 8.5. Types d'environnement comparés pour le bouturage feuillé à 22°C.

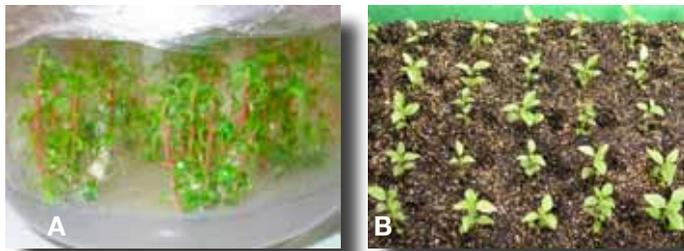


Figure 8.8. Aulnes en fin de bourgeonnement axillaire *in vitro* (A) et au début du sevrage de l'acclimatation (environ 3 semaines) (B).

Figure 8.9. Développement du système racinaire après traitement avec Pralumus (P+) ou pas (T) chez l'aulne glutineux : variabilité clonale du volume global après un an de pépinière.

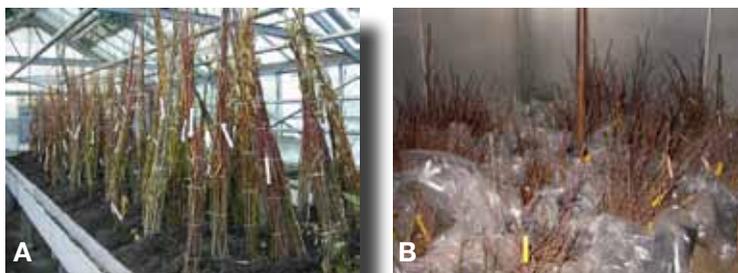


Figure 8.10. Plants de saules en serre (A) et d'aulnes en frigo à + 2°C, prêts pour la livraison (B).

non traité (**Figure 8.9**) indique que 8 clones sur 14 présentent un système racinaire plus développé après pralinage.

Les réactions au traitement paraissent toutefois très différentes d'un clone à l'autre (+ 50 % au niveau du diamètre). La principale explication de ces différences de comportement pourrait être la variabilité de la capacité rhizogène des clones déjà constatée au bouturage (**Tableau 8.4**).

❑ Conservation et conditionnement des plants

Le plus souvent, les berges sont inaccessibles avant que débute la végétation. Dans ces conditions, la plantation d'un matériel ayant entamé sa croissance végétative conduit fréquemment à des taux de mortalités non négligeables requérant un remplacement très onéreux des plants. Il est donc nécessaire de préserver le repos végétatif des plants jusqu'à ce que les berges soient accessibles. À cette fin, chaque année en novembre-décembre, le matériel végétal est récolté, conditionné (en bacs ou sacs) et stocké en chambre froide à 2 °C. Les plançons de saules et les plants enracinés de saules et d'aulnes peuvent être conservés jusqu'au début juillet. À cette date, la reprise est encore excellente sur les berges de cours d'eau. La température de conservation ne semble pas avoir d'influence sur le taux de survie ou sur la croissance ultérieure.

8.4 Conditions de diffusion des variétés multiclones

Les modalités de diffusion des variétés multiclones d'écotypes destinées à l'ingénierie végétale doivent assurer une durabilité du boisement par rapport aux aléas climatiques, phytosanitaires ou hydrologiques et au travers de la régénération naturelle ultérieure. Notre analyse s'appuie sur les méthodes pratiquées par les améliorateurs forestiers.

8.4.1 Précautions à la construction de la filière

La construction de nos variétés multiclones est inspirée de méthodes appliquées par les généticiens forestiers. En France, les premières formes de ressources génétiques forestières conservées *ex situ* trouvent leur origine dans des collections qui ont été constituées au fil du temps de manière pragmatique en fonction de l'émergence des besoins (Collin, 2000 ; Le Bouler et al., 2009). C'est le cas des peupliers noirs et des merisiers mais aussi des noyers et surtout des ormes menacés de disparition par l'épidémie de graphiose. Les objectifs des plantations des peupliers noirs étaient aussi la végétalisation des berges et l'aménagement paysager comme l'était notre objectif premier. Leur utilisation s'est ensuite étendue

à des actions de phytoremédiation, de protection des sols et d'amélioration de la qualité des ressources en eau. Parmi les variétés figuraient toutefois deux sources de pollens étrangers et contaminants pour les populations naturelles de peupliers. L'INRA a alors réagi en mettant sur pied trois variétés multiclonales autochtones constituées pour chacune d'elles de 25 clones représentatifs de la diversité génétique des bassins versants d'origine (Loire, Rhin alsacien, Garonne).

Pour notre filière d'écotypes ligneux de rivières, la diversité naturelle a été collectée avec le phénotype de ripisylve (caractérisé par un port peu érigé et une vigueur modérée) comme critère de sélection souhaité par les gestionnaires de cours d'eau. Les parcs à bois rassemblent dans des espaces publics et privés, les copies des arbres repérés, formant ainsi des conservatoires des ressources génétiques de ripisylves des bassins versants de la zone transfrontalière. Ils représentent la base génétique nécessaire à de futurs vergers à graines.

Cette forme de conservation des génotypes est pratiquée pour le développement de variétés forestières améliorées (Arbez, 1994).

8.4.2 Enjeu de la diffusion des variétés multiclonales d'écotypes

Notre filière diffuse donc une diversité locale au sein de laquelle des tests d'évaluation ont été réalisés pour relever d'une part, des niveaux de tolérance relative à la maladie du dépérissement de l'aulne (Chandelier et al., 2013) et d'autre part, certaines propensions d'adaptation aux conditions de pollution environnementales par les ETM chez certains clones d'aulne et de saule (Evlard et al., 2013; Bajji et al., 2013). Les clones LIRIA W2, W124, W252 seraient ainsi potentiellement tolérants/résistants à *Phytophthora alni* alors que les clones W137, W169 W62 seraient les plus sensibles. Ce matériel aux comportements contrastés devrait être utile à la détermination des clones à replanter en fonction des particularités des sites.

Les propriétés de reproduction générative sont aussi à prendre en compte. *Alnus glutinosa* est une essence monoïque où coexistent sur un même arbre les fleurs mâles et les cônes femelles. La pollinisation éolienne et la séparation physique des fleurs des deux sexes sont des éléments qui contribuent à un haut degré de « brassage » génétique (Mc Vean, 1953). La capacité des graines à garder leur pouvoir germinatif jusqu'à l'apparition des conditions favorables à leur germination qui peut atteindre plusieurs années, a pour conséquence d'augmenter la diversité locale. La distance annuelle de migration serait de 2000 m selon Huntley et al. (1983) mais pourrait atteindre 70 km et plus encore, le long des cours d'eau importants (Fossit, 1996; Bennet, 1995).

L'aulne glutineux constitue une alternative significative pour les sols gorgés d'eau de manière saisonnière. Il se cantonne principalement sur des buttes dans les habitats humides à marécageux, souvent dans les dépressions et les fonds de bassins versants et convient pour les espaces soumis à l'étiage et inondables. Claessens (2006) situe les conditions des forêts alluviales à base de chêne pédonculé, les sols à argiles blanches d'Ardenne, les parcelles forestières où l'épicéa est exploité ainsi que les terres humides abandonnées par l'agriculture comme sites d'implantation naturels d'aulnaies. Il faut toutefois retenir que les sols couverts de végétation sont moins propices à la régénération naturelle ultérieure dans nos régions.

La conservation des écotypes ligneux dans les conditions naturelles de stress biotiques et abiotiques de l'environnement, constitue une contrainte forte pour nos variétés multiclonaux qui continueront à révéler librement leurs capacités d'adaptation au travers du comportement des clones et de leurs descendants. Le suivi de ceux-ci sur les sites de replantation choisis par les pathologistes pour ce qui concerne les aulnes (Chandelier et al., 2013) et par les gestionnaires de cours d'eau pour ce qui concerne les saules, est dès à présent assuré. Les clones réimplantés sur les berges de Lorraine française et de Wallonie doivent confirmer leurs propriétés. Il en est de même du matériel originaire de placettes nettement contaminées collecté sur 12 cours d'eau différents des provinces wallonnes de Hainaut, Namur, Liège et Luxembourg, et sélectionné (parmi environ 500 individus) eux aussi après une inoculation volontaire de *Phytophthora alni* (Chandelier et al., 2013). Avec l'étude épidémiologique de la maladie (Chandelier et al., 2013), nous préciserons davantage comment et dans quelle mesure la pression s'exerce sur cette espèce. Toute l'information ainsi recueillie des sites d'implantation alimentera, les connaissances relatives aux contextes spécifiques d'adaptation des replantations. Ceci fera progresser la composition clonale des végétalisations du point de vue qualitatif. De plus, chez l'aulne, la traçabilité génétique est assurée. L'unicité d'un clone peut, en effet, être démontrée de manière non équivoque à l'aide de marqueurs microsatellites comme outil de discrimination (Mingeot et al., 2013).

Chez le saule, comme il s'agit d'espèces dioïques, un certain équilibre des sexes doit être respecté à la replantation en vue de permettre la régénération ultérieure sur le parcours des cours d'eau végétalisés. Le choix des espèces doit tenir compte de l'humidité des sols et d'un optimum écologique spécifique qui permet l'adaptation au milieu (Mertens, 2011). Ces espèces se distribuent naturellement dans les espaces libres d'implantation selon leurs niveaux d'exigence en lumière, en eau et selon les propriétés physico-chimiques des sols. L'analyse réalisée par Mertens (2011) sur le territoire wallon constitue, à ce point de vue, une référence pour toute application d'ingénierie végétale. Les besoins en saules, des gestionnaires de cours d'eau, diffèrent selon que le site à revégétaliser se situe en zone urbaine, rurale ou forestière

et selon l'importance de l'habitat aquatique à restaurer. Les gestionnaires choisissent leurs clones sur le phénotype et le système racinaire (Lambot, 2011).

Sont recherchés des saules buissonnants se développant en pied de berge, s'étalant pour former un couvert de branches et de racines comme abris des poissons contre les prédateurs, en période de hautes eaux et de gel hivernal. Les buissons hauts de 1 à 4 m sont privilégiés pour ne pas réduire excessivement la capacité en crue et limiter l'entretien. Les gestionnaires retiennent parfois des arbres ou arbustes à développement plus important, mais toujours avec un port étalé au niveau des basses branches ou comportant un réseau dense de tiges rampantes et surtout avec un système racinaire dense pour fixer les berges. Ces saules pourront même être installés en extradors de méandre. Si un peu d'érosion s'opère, la mise à nu des racines et la création de cavités en sous berge, soutenues par les racines, constituent des habitats extraordinaires pour les poissons.

On se tourne vers des espèces qui ont un rapport volume racine/volume tige élevé. La littérature renseigne un rapport racine/tige de 1,5 pour le saule pourpre et une taille adulte de 2 à 6 m; c'est donc une des espèces indigènes qui remplit le mieux ces fonctions, et qui représente le 1^{er} choix pour des plantations de type multifonctionnel. À cela, il faut ajouter que le saule pourpre est un des seuls à tolérer un ombrage léger. Le suivi qu'effectueront les gestionnaires, sur les plançons issus de ces écotypes, permettra d'évaluer la relation entre le port particulier et le génotype. Une part relativement importante de la première sélection réalisée par les gestionnaires est constituée de saule marsault, saule qui jusqu'à présent, était peu retenu pour les plantations de berges. L'évaluation en rivière nous dira si ce choix s'avère pertinent.

8.4.3 Gestion des risques et maintien des performances des écotypes

Bien que le contrôle de la plupart des risques écologiques ou biologiques repose sur le niveau de diversité génétique des variétés multiclonaux, c'est la bonne transposition de celle-ci sur site qui déterminera finalement la stabilité à long terme des replantations.

Deux règles s'imposent en général, pour diffuser le matériel végétal le plus performant sur le plan de l'adaptation au milieu (Lacaze, 1986) :

- N'utiliser ces variétés multiclonaux que dans les bassins versants des fleuves d'origine des arbres et les régions écologiquement proches;
- Respecter en permanence les proportions dans les mélanges de clones et d'espèces.

□ Les règles de composition en fonction des risques

Pour diffuser une composition génétiquement équilibrée des clones, la réflexion internationale porte sur la limitation des risques dont les règles générales sont rappelées dans de nombreuses publications (Horgan, 1991).

Toutefois, déterminer le niveau d'un risque donné n'est pas chose aisée (Bishir et al., 1999). Si la maladie de l'aulne due à *Phytophthora alni* par exemple, fait bien partie des risques connus, l'émergence de pathogènes aujourd'hui inconnus, le changement climatique, les effets de « mode », etc. sont, par contre, imprévisibles aussi bien au point de vue ampleur que fréquence de manifestation. Ils font partie des risques incertains. Ce qui est essentiel, c'est de fournir aux utilisateurs de la filière, une information relative au comportement du matériel végétal la plus complète possible dès le choix du matériel pour l'implantation. En foresterie, la bonne adaptabilité d'une variété est définie par un nombre optimum de constituants génétiques, que celle-ci soit produite par multiplication végétative ou en verger à graines (Hubert et al., 1999). Pour cela les avis sont partagés.

Chez les conifères, la présence de 20-30 constituants non apparentés est recommandée dans les vergers à graines (Giertych, 1974; Chollet, 1986) afin d'éviter deux risques biologiques connus en cas de pollinisation libre : une dépression de consanguinité trop marquée et une grande variabilité de floraison (Lindgren et al., 1997). Plusieurs études théoriques s'accordent à définir à quelques dizaines, le nombre de clones non apparentés à inclure dans une variété multiclonale aux performances stables dans l'espace et dans le temps (Hühn, 1988; 1992). Pour tester un caractère donné, les expérimentations de variétés forestières prévoient cinq sites d'implantation représentatifs de la diversité des conditions pédoclimatiques (Hubert et al., 1999). Leur choix tient compte de la diversité écologique des stations d'accueil et de leur longévité mais aussi de la surface relative occupée par la variété sur la zone de replantation (Stelzer, 1997). Finalement, c'est leur suivi *in situ* qui déterminera le niveau des performances enregistrées et leur stabilité au sein de nos variétés multiclones.

Les expérimentations relatives à l'évaluation des variétés forestières sont toutefois coûteuses et de longue durée. C'est la raison pour laquelle, très fréquemment, le choix du nombre de constituants de la variété s'effectue à partir de simulations de l'occurrence de l'événement climatique ou biologique défavorable (Libby, 1982; Hühn, 1988; Roberds et al., 1990; Bondesson et al., 1993; Roberds et al., 1997).

Selon certains généticiens forestiers (Hubert et al., 1999), l'augmentation du nombre de constituants réduit le risque d'échec de plantation de façon exponentielle plutôt que linéaire. Avec un niveau de sensibilité de la population initiale modéré (fréquence d'individus sensibles $p < 0,5$) et pour un niveau tolérable d'attaques inférieur à 50 %, le risque d'échec peut être limité à 5-10 % avec 5 à 10 constituants

seulement (Roberds et al., 1990). À l'extrême, afin d'assurer un risque d'échec minimum, différents auteurs s'accordent par contre sur des nombres de constituants variant entre 20 et 40 (Roberds et al., 1997). Avec des conifères pour lesquels le risque est connu, il apparaît que 18 génotypes approcheraient le nombre 'optimum' de clones pour couvrir le risque d'un caractère biotique inconnu (Yanchuk et al., 2006). Toutefois, les essais en champ sont toujours considérés comme recours essentiels à l'évaluation (Weng et al., 2010).

En ce qui concerne «LIRIA F» de Lorraine, la majorité des clones proviennent de sites suivis depuis près de 10 ans déjà. Quant aux clones sélectionnés qui y sont installés (Chandelier et al., 2013), les observations de comportement bénéficieront des connaissances relatives déjà disponibles. Selon Pliūra (2008), chaque famille d'aulnes combine de multiples niveaux d'adaptation et les plus importantes différences entre familles se retrouvent parmi les populations les plus productives.

En Wallonie, la variété multiclonale de merisiers qui a été diffusée par le CRA-W entre la fin des années 1980 et la moitié des années 1990 (avec le soutien du «Groupement Régional pour l'Amélioration et la Gestion des Essences Forestières») constitue une référence de modalités de diffusion que nous nous appliquerons à respecter pour la filière «ECOLIRI». Chaque année, il s'agissait de produire un nombre précis de lignées distinctes de telle sorte qu'une diversité de 60 clones soit atteinte dans la région, endéans une période de 2 à 5 ans de production ; la livraison en mélange se faisant par le Comptoir forestier de Marche-en-Famenne, agréé pour cette fonction.

□ Les règles d'usages à adopter

Le matériel produit à partir des variétés multiclones est mis à la disposition des reboiseurs pour la fixation de berges, la renaturation de ripisylve et la réhabilitation de zones fluviales, humides et équivalentes. Une analyse préparatoire du site d'implantation est à réaliser avec l'identification de ses particularités et contraintes spécifiques. Celles-ci vont orienter la composition clonale et définir le dispositif de plantation à adopter.

Le respect capital de la diversité génétique du matériel diffusé reste de la responsabilité des pouvoirs publics en vue d'anticiper les défauts de fonctionnement éventuels parmi lesquels l'insuffisance de plants disponibles.

Les plants sont délivrés en mélanges clonaux équilibrés, après un an d'élevage en pépinière (**Figure 8.10**). D'après les résultats de bouturage obtenus chez l'aulne (**Tableau 8.4**), le facteur de correction à appliquer pour atteindre une représentation équilibrée des clones au sein du matériel diffusé pourrait atteindre une valeur allant de 2 à 10. Il s'agit donc de planifier les productions annuelles par groupes de clones

constitués sur base de performances d'enracinement préalablement évaluées pour adapter les quantités à l'équilibre recherché.

Ainsi, maintenir le potentiel rhizogène des clones par la répétition des tailles annuelles en parcs à bois est primordial pour l'équilibre de la diffusion. Veiller à maintenir l'évolution des collections initiales, du point de vue de leur composition, avec l'injection de nouveaux clones est positive pour la diversité naturelle générée ultérieurement à partir des zones replantées. Une telle base génétique transposée au sein de vergers à graines d'élites fixerait les propriétés liées aux besoins évolutifs et perpétuerait celles-ci de manière homogène et définitive au travers de la descendance. Ce procédé appliqué chez *Pinus taeda*, a notamment montré que 95 % de la diversité allélique des populations naturelles se retrouvaient au sein des graines (Williams et al., 1995).

Le risque de dysfonctionnement doit toutefois être raisonné (quel que soit d'ailleurs, le type de régénération utilisé, végétative comme reproductive). Si l'origine est prioritaire, le choix de clones définit le niveau d'adaptation. Engager les reboiseurs à évaluer préalablement les risques pathogènes ou de pollutions par les ETM sur le site est aussi préventif. Leur recommander le matériel sélectionné pour garantir une adaptabilité potentiellement meilleure est encore plus important. Les clones les plus tolérants aux métaux lourds seront par exemple, orientés, en priorité, vers les zones les plus proches des risques de pollution. Le suivi des multiclonaux replantés contribuera à adapter la composition ultérieure des groupes de clones.

Chez le saule, la connaissance des caractéristiques du sol (pH, drainage, composition, etc.) décidera de l'espèce à réimplanter. La règle pratique à adopter pour la prise en compte du sexe, consisterait à toujours assurer pour chaque espèce des variétés constituées d'au moins 10 arbres femelles et de 5 arbres mâles provenant de différents (2) bassins versants. Cette précaution tient compte du fait que ces populations installées par pratiques culturales vont se régénérer spontanément dans des conditions de milieu différentes de celles-ci durant la décennie suivant cette installation. Complémentairement, ces variétés devront être recomposées toutes les demi-décennies pour assurer leur aspect évolutif en fonction des conditions changeantes du milieu.

Le long des berges de cours d'eau, ce sont certainement les clones dont le système racinaire assure à la fois une bonne reprise et la stabilisation à long terme qui seront réclamés en priorité. Le traitement «Pralumus» qui stimule le développement racinaire chez l'aulne, devrait aider à l'intégration de clones récalcitrants à l'enracinement dans les dispositifs de plantation.

Chez les forestiers, ne pas dépasser 50 plants d'un même clone par site permet de limiter l'exposition au risque dans l'espace (Hubert et al., 1999). Utiliser des

systèmes d'exploitation à courte révolution diminuerait ainsi la durée d'exposition du matériel replanté, ce qui minimiserait l'impact du risque potentiel. Ainsi en France, des variétés clonales ne sont en cours de développement que pour des espèces à croissance rapide (le peuplier, le douglas et le pin maritime).

Pour ces espèces forestières, aucune réglementation quant à la composition et à l'utilisation n'existe à ce jour pour les variétés multiclones. L'effort d'amélioration est continu de manière à offrir du matériel végétal de plus en plus performant, plus homogène phénotypiquement, avec toujours un nombre de constituants non apparentés compris entre 10 et 20. Seul l'usage de minimum 5 clones en mélange équilibré par plantation était recommandé pour le merisier. Dans d'autres pays, tels que l'Australie, la Nouvelle-Zélande, le Brésil ou les États-Unis, les réglementations d'usage ne porteraient ni sur la composition, ni sur le test des variétés forestières (Hubert et al., 1999).

Si, pour l'aulne, les peuplements à graines forestiers locaux paraissent suffisants pour couvrir les besoins, le phénotype de ripisylves et l'adaptation au dépérissement dû à *Phytophthora alni* qui s'exerce plus intensément en milieu rivulaire, sont des critères spécifiques pris en compte exclusivement par nos multiclones. Chez le saule, la seule contrainte à la diffusion concerne la meilleure qualité possible du point de vue sanitaire sans pour autant imposer de normes.

8.5 Conclusions

Une filière de production de multiclones de ligneux d'aulnes et de saules originaires de la Grande Région a été construite et mise en œuvre pour l'approvisionnement en plants lors de renaturations des berges de cours d'eau, des zones humides à drainage déficient et de surfaces naturelles écologiquement équivalentes. Elle est structurée autour de la certification de l'origine du matériel végétal, de sa représentativité de la diversité naturelle et de la diffusion en accord avec les règles généralement appliquées aux variétés multiclones de plants forestiers. Cette dernière s'accompagne d'informations de comportement, plus spécifiques par rapport à la maladie due à *Phytophthora alni* chez l'aulne, à l'adaptation aux hydro-systèmes chez le saule et vis-à-vis de pollutions accidentelles dues aux métaux lourds.

En ce qui concerne les reboiseurs, c'est vers une information claire et une responsabilisation qu'il faut se diriger. Néanmoins, pour permettre des choix pertinents dans l'utilisation des variétés, les recherches doivent se poursuivre pour parfaire les connaissances relatives à la variabilité génétique réinstallée en lien avec l'adaptabilité aux risques ainsi que les pratiques de replantation et d'aménagement global des territoires (Claessens et al., 2009 ; Mouchet et al., 2010). De toute évidence, le caractère évolutif des populations doit être prioritaire. La composition est fonction des conditions du milieu d'implantation et de la durée de colonisation prévue.

Dans son état actuel, la filière pourrait aussi participer au développement d'activités spécifiques telles la production de biomasse, la remédiation de zones marginalisées (Aldric et al., 2011 ; Evlard et al., 2011) ou encore la vannerie plus particulière au saule (Hogge, 2011).

Des politiques identiques menées dans d'autres pays de l'Union Européenne devraient permettre de mettre ces collections en réseau.

Remerciements

Les recherches présentées dans ce chapitre ont été menées dans le cadre des projets Interreg III-WLL/ECOLIRI et Interreg IV-A Grande Région/ECOLIRIMED soutenus financièrement par le FEDER, le Service Public de Wallonie et la Région Lorraine.

Les auteurs remercient R. Gruselle pour son investissement personnel dans la construction et la mise en œuvre de la filière. Ils sont aussi reconnaissants à R. Baleux et S.M. Hautenoven qui se sont investis respectivement dans les applications des méthodes d'analyse moléculaire et de multiplication végétative.

8.6 Bibliographie

- Aldric J.M. et al., 2011. Potentialités d'application des technologies biologiques pour la dépollution des sols en Wallonie. *J. Ingénieurs*, **132**, 7-13.
- Arbez M., 1994. Fondement et organisation des réseaux européens de conservation des ressources génétiques forestières. *Génét. Sél. Évol.*, **26**, 301-314.
- Bajji M. & Druart Ph., 2013. Apports de la culture *in vitro* dans l'amélioration de la phytoremédiation : cas de l'aulne glutineux (*Alnus glutinosa* [L.] Gaertn.) dans le cadre de la stabilisation des berges de cours d'eau. In : Druart Ph., Husson C. & Paul R. (Eds.). *Renaturation des berges de cours d'eau et phytoremédiation*. Gembloux, Belgique : Presses agronomiques de Gembloux.
- Bennet K.D., 1995. Insularity and the quaternary tree and shrub flora of the British isles. In: Preece RC. (Ed.) *Island Britain: a quaternary perspective*. London: The Geological Society, Special Publications, **96** (1), 173-180.
- Bishir J.W. & Roberds J.H., 1999. On numbers of clones needed for managing risks in clonal forestry. *For. Genet.*, **6**, 149-155.
- Bondesson L. & Lindgren D., 1993. Optimal utilisation of clones and genetic thinning of seed orchards. *Silvae. Genet.*, **42** (4/5), 157-163.
- Chollet F., 1986. Les Vergers à graines. *Rev. For. Fr.*, **XXXVIII**, n° spécial « Amélioration génétique des arbres forestiers », 74-80.
- Claessens H., 2006. Réflexion sur la place de l'aulne en sylviculture, *For. Wallonne*, **80**, 27-35.
- Claessens H. et al., 2009. Le suivi des bandes riveraines des cours d'eau de Wallonie. *Rev. For. Fr.*, **LXI** (6), 595-610.

- Collin E., 2000. La multiplication végétative au service de la conservation des ressources génétiques végétales : l'exemple des ormes. *In* : Verger M. et al. *Multiplication végétative des ligneux forestiers, fruitiers et ornementaux: seconde rencontre du « Groupe de la Sainte Catherine », Antibes, 24-26 novembre 1998.* Paris : ASTREDHOR, 131-139.
- Chandelier A., Delhay N. & Helson M., 2011. First report of ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (anamorph: *Chalara fraxinea*) on *Fraxinus excelsior* in Belgium. *Plant Dis.*, **95** (2), 220.
- Chandelier A., Mertens P., Marçais B. & Husson C., 2013. Aspects sanitaires de la filière aulne glutineux, frêne commun et saule dans le cadre de la renaturation des cours d'eau. *In* : Druart Ph., Husson C. & Paul R. (Eds.). *Renaturation des berges de cours d'eau et phytoremédiation.* Gembloux, Belgique : Presses agronomiques de Gembloux.
- Delcarte J., Gossiaux L. & Evlard A., 2013. Valorisation énergétique du bois produit à des fins de phytoremédiation. *In* : Druart Ph., Husson C. & Paul R. (Eds.). *Renaturation des berges de cours d'eau et phytoremédiation.* Gembloux, Belgique : Presses agronomiques de Gembloux.
- Evlard A., Vanobbergen F., Campanella B. & Paul R., 2011. La phytoremédiation par le saule. *For. Wallonne*, **112**, 36-46.
- Evlard A. & Campanella B., 2013. Les dangers des éléments-traces métalliques et les techniques de phytoremédiation. *In* : Druart Ph., Husson C. & Paul R. (Eds.). *Renaturation des berges de cours d'eau et phytoremédiation.* Gembloux, Belgique : Presses agronomiques de Gembloux.
- Evlard A. et al., 2013. Étude du saule et de l'aulne pour la phytoremédiation des berges de cours d'eau non navigables. *In* : Druart Ph., Husson C. & Paul R. (Eds.). *Renaturation des berges de cours d'eau et phytoremédiation.* Gembloux, Belgique : Presses agronomiques de Gembloux.
- Fossit J.A., 1996. Late quaternary vegetation history of the western isles of Scotland. *New Phytol.*, **132**, 171-196.
- Giertych M., 1974. Seed orchard designs. *For. Comm. Bull.*, **54**, 25-37.
- Hogge F., 2011. La vannerie et les autres utilisations traditionnelles du saule. *For. Wallonne*, **112**, 47-50.
- Horgan G.P., 1991. Risk analysis for forestry. Proceedings of clonal forestry workshop. *FRI Bull.*, **160**, 155-157.
- Hubert C. & Bastien C., 1999. Gain génétique, risque économique, risque écologique : quels liens ? *Rev. For. Fr.*, **LI**, 4, 496-510.
- Hühn M., 1988. Theoretical studies in the necessary number of components in mixtures. 3. Number of components and risk considerations. *Theor. Appl. Genet.*, **72**, 211-218.

- Hühn M., 1992. Multiclonal mixtures and number of clones. II. Number of clones and yield stability (deterministic approach with competition). *Silvae. Genet.*, **41**, 4/5, 205-213.
- Huntley B. & Birks J.B., 1983. *An atlas of past and present pollen maps for Europe: 13000 years ago*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Kremer A., 1994. Diversité génétique et variabilité des caractères phénotypiques chez les arbres forestiers. *Génét. Sél. Évol.*, **26**, 105-123.
- Lachat B., 1998. Conserver, aménager, revitaliser les cours d'eau avec une logique naturelle. *Ann. Limnol.*, **34** (2), 227-24.
- Lacaze J.F., 1986. Amélioration des arbres forestiers. *Rev. For. Fr.*, **XXXVIII**, n° spécial « Amélioration génétique des arbres forestiers », 20-25.
- Lambot F., 2011. Le saule dans le génie végétal : maintien des berges et talus. *For. Wallonne*, **112**, 29-35.
- Lambot F. & Adant S., 2013. La revégétalisation des cours d'eau : une stratégie écologique nécessaire. In : Druart Ph., Husson C. & Paul R. (Eds.). *Renaturation des berges de cours d'eau et phytoremédiation*. Gembloux, Belgique : Presses agronomiques de Gembloux.
- Le Bouler H. & Collin E., 2009. La valorisation des ressources génétiques des arbres forestiers conservées dans les Collections nationales françaises. *Rev. For. Fr.*, **LXI**, 5, 447-455.
- Libby W.J., 1982. What is a safe number of clones per plantation? In: Heybrock H.M., Stephan B.R., von Weissenberg K. *Resistance to diseases and pests in forest trees: Proceedings of the third International Workshop on the genetics of host-parasite interactions in forestry, Wageningen, 14-21 Sept. 1980*. Wageningen, The Netherlands: Center for Agricultural Publishing and Documentation, 342-360.
- Lindgren D., Gea L.D. & Jefferson P.A., 1997. Status number for measuring genetic diversity. *For. Genet.*, **4** (2), 67-76.
- Mc Vean D.N., 1953. Biological flora of the British isles: *Alnus glutinosa* L. Geartn. *J. Ecol.*, **41**, 447-466.
- Mertens P., Elschot P., Ramelot F. & Stordeur G., 2011. Diversité et détermination des saules en Wallonie. *For. Wallonne*, **112**, 7-19.
- Mertens P., 2011. Diversité des milieux de développement pour les saules indigènes. *Forêt Wallonne*, **112**, 20-28.
- Mingeot D., Husson C., Mertens P. & Druart Ph., 2013. Évaluation par marqueurs moléculaires microsatellites de la diversité d'une collection d'aulnes glutineux provenant de Wallonie (Belgique), de Lorraine (France) et du Grand-Duché du Luxembourg. In : Druart Ph., Husson C. & Paul R. (Eds.). *Renaturation des berges de cours d'eau et phytoremédiation*. Gembloux, Belgique : Presses agronomiques de Gembloux.

- Mouchet F. et al., 2010. *Guide d'entretien des ripisylves*. Namur, Belgique : SPW, DGARNE; Gembloux, Belgique : Université de Liège, GxABT, 42 p.
- Roberds J.H. & Bishir J.W., 1997. Risk analysis in clonal forestry. *Can. J. For. Res.*, **27**, 425-432.
- Pliūra A., 2008. Estimation of eco-genetic lability of populations and families : *Alnus glutinosa* example. In: *Seminar on plasticity adaptation in Forest Trees, Treebreedex, Madrid, 27-29 February 2008*.
- Roberds J.H., Namkoong G. & Skroppa T., 1990. Genetic analysis of risk in clonal populations of Forest Trees. *Theor. Appl. Genet.*, **79**, 841-848.
- Stelzer H.E., 1997. Evaluating genetic diversity concerns in clonal deployments. *Can. J. For. Res.*, **27**, 438-441.
- Tréfois R., 1988. *Description des techniques de bouturage feuillé des nouveaux sujets porte-greffe nanifiants du cerisier*. Note Technique du CRA Gembloux N°10/50. 15p.
- Weng Y., Park Y.S. & Krasowski M.J., 2010. Managing genetic gain and diversity in clonal deployment of white spruce in New Brunswick, Canada. *Tree Genet. Genomes*, **6** (3), 367-376.
- Williams C.G., Hamrick J.L. & Lewis P.O., 1995. Multiple-population versus hierarchical conifer breeding programs: a comparison of genetic diversity levels. *Theor. Appl. Genet.*, **90**, 584-594.
- Yantchuk A.D., Bishir J., Russell J.H. & Polsson K.H., 2006. Variation in volume production through clonal deployment: results from a simulation model to minimize risk for both a currently known and unknown future pest. *Silvae Genet.*, **55** (1), 25-37.

