



FACULTE DES SCIENCES

Département des Sciences et Gestion de l'Environnement

GEMBOUX AGRO BIO TECH

Laboratoire de Toxicologie Environnementale

Le potentiel du saule pour la phytostabilisation des sols pollués par les éléments-traces métalliques

Dissertation présentée par Aricia EVLARD en vue de l'obtention du grade de Docteur
en Sciences

28 mai 2013

Président : Pr Roger PAUL (ULg-Gembloux Agro-Bio Tech, Belgique)

Secrétaire : Dr Bruno CAMPANELLA (ULg-Gembloux Agro-Bio Tech, Belgique)

Promoteurs :

Pr Jean-Luc VASEL (ULg-Campus d'Arlon, Belgique)

Dr Gilles COLINET (ULg-Gembloux Agro-Bio Tech, Belgique)

Lecteurs :

Dr Jean-François HAUSMAN (CRP-Gabriel Lippmann, Luxembourg)

Dr Philippe DRUART (CRA-W Gembloux)

Année académique 2012-2013

A Lucia et Camille Bartet, mes grands-parents, mes anges gardiens

Remerciements

Ce travail a pu être réalisé grâce au projet Ecolirimed, projet financé par le Fonds européen de développement régional dans le cadre du programme Interreg IV A « Grande Région » et le Service Public de Wallonie.

J'aimerais tout d'abord remercier le Professeur **Roger Paul** du Laboratoire de Toxicologie environnementale (GxABT, ULg) pour avoir cru en moi et m'avoir donné l'opportunité d'intégrer le monde de la Recherche en m'offrant non seulement mon premier emploi mais également en acceptant que je réalise cette thèse de doctorat. Roger, merci pour votre soutien, votre confiance, votre bonne humeur et, tout simplement, pour siffloter tous les matins en arrivant au laboratoire !

Je remercie **Philippe Druart** de l'Unité Génie biologique du Centre wallon de Recherches Agronomiques pour m'avoir soutenu durant ce programme de recherche mais également pour continuer à me soutenir dans la réalisation des projets qui en ont découlé.

Je remercie le Professeur **Jean-Luc Vasel** et le Docteur **Gilles Colinet** pour avoir accepté d'être les promoteurs de cette thèse, pour le temps qu'ils ont consacré dans la lecture du manuscrit et pour leurs apports en vue de l'améliorer.

Merci au Docteur **Bruno Campanella** pour son enseignement quotidien et grâce auquel j'ai eu une formation de qualité tout au long de ces années. Merci pour sa patience, sa disponibilité, sa confiance et ses encouragements lors des moments plus difficiles survenus durant ce marathon.

Durant ces quatre années, j'ai pu rencontrer d'autres personnes extraordinaires avec lesquelles « le courant est passé », tout simplement. Celles-ci ont joué un rôle important et m'ont donné goût à la Recherche. Je veux parler notamment du Docteur **Jean-François Hausman** du Centre de Recherche Public – Gabriel Lippmann (CRP, Luxembourg). Merci de m'avoir permis de vivre une autre expérience en m'invitant à me former aux aspects fondamentaux de la Recherche au sein du Département EVA. Je remercie également le Professeur **Lucien Hoffmann**, responsable du département EVA d'avoir accepté de m'accueillir.

Je pense aussi à un autre membre de la famille des « CRP-istes », le Docteur **Kjell Sergeant** que je ne remercierai jamais assez. Kjell, merci pour ton aide sacrée dans la réalisation des analyses protéomiques, merci de m'avoir appris à les interpréter, merci pour la rédaction des articles, merci pour nos moments philosophiques et pour ton soutien dans les moments difficiles. Enfin, toute ma gratitude au Docteur **Jenny Renaut** pour sa collaboration en *protéo*, le temps consacré à ma formation, sa gentillesse et sa *zen attitude*.

J'aimerais également remercier tout particulièrement le Docteur **Cédric Guignard** pour m'avoir permis d'analyser les innombrables échantillons dans sa plateforme. Une pensée particulière pour **Johanna Ziebel** qui m'a formée dans l'analyse en métaux des végétaux et des sols.

Merci à **Laurent Solinhac** pour son aide dans l'élaboration des plantations et pour son assistance technique et à **Sébastien Planchon** pour son appui précieux dans les analyses protéomiques. Merci aux doctorants du CRP qui m'ont intégrée dans leur groupe dès mon arrivée à Belval et plus particulièrement à **Bruno Printz** pour son travail considérable dans les analyses des sucres et des pigments et sa collaboration dans la rédaction des articles. Merci de m'avoir formée et d'avoir rendu la technique de la chromatographie un peu moins intimidante.

Je remercie **Marine D'Aulisa**, **François Ferrais**, **Vincent Habimana** et **Lucas Gossiaux**, ces mémorants extraordinaires que j'ai eu le privilège d'encadrer au Laboratoire de Toxicologie environnementale. Merci pour votre aide précieuse dans la réalisation de mes travaux. Merci à **Lanto**, **Fanny** et **Sara** pour leur soutien et leur amitié.

Toute ma gratitude aux collègues du Centre wallon de Recherches Agronomiques : **Martine** pour son aide technique de qualité, sa bonne humeur et son humour. C'est toujours un grand plaisir de travailler avec elle. Merci à **Mohammed** du Centre wallon de Recherches Agronomiques de m'avoir formé à la culture *in vitro*. Merci à **Philippe Maesen** du BEAGx et **Jean-Paul Barthélémy** de l'Unité de Chimie (GxABT, ULg). Un tout grand merci à **Patrick Mertens**, collègue du Centre de Recherche de la Nature, des Forêts et du Bois et membre de la Commission Régionale du Peuplier pour son soutien, sa gentillesse et sa collaboration dans ce travail. Merci également à **Jérôme Delcarte** de l'Unité « biomasse, bioproduits et énergies » (CRA-W) et à **Jean-Marc Aldric** de la Direction de la Protection des Sols (le Décret « Sols » n'a plus de secrets pour moi !). Enfin, merci à Messieurs **Yves Libert** (Direction des recherches hydrauliques) et **Paul-Henri Fally** (Chef de District, Mons) pour leur soutien dans les projets de phytoremédiation.

Il me reste à remercier les autres personnes restées cachées « en coulisse », dont l'aide a été plus que précieuse : **Magali**, merci pour les relectures de mon manuscrit et ce, en respectant des délais souvent très très courts ! Merci à **Anthony** et **Jenny** pour les corrections d'anglais. Merci à **ma famille et ma belle-famille** pour leur soutien, leur discrétion et ces moments de joie qui m'ont permis de décompresser. Merci à mon amie, ma sœur de lait, **Marina**, pour ces instants de détente et la force de ton amitié.

Enfin, **Romain**, mon partenaire de vie, « merci » reste un terme relativement faible pour exprimer ma gratitude. Durant ce parcours, tu as non seulement renforcé mon moral mais ton aide dans la rédaction du manuscrit a été plus que précieuse : je pense que tu es dorénavant devenu expert de la phytoremédiation malgré toi ! Merci...

Table des matières

Introduction générale.....	1
1. Contexte général	1
2. Présentation du projet ECOLIRIMED.....	3
3. Articulation de la thèse	5
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	9
I. Impact des éléments-traces métalliques sur les plantes et les techniques de phytoremédiation	10
II. Le saule.....	25
Chapitre 2 : Impact des métaux sur le saule. Approches phénotypique, physiologique et protéomique	32
Objectifs et stratégies	35
I. Approche phénotypique de la tolérance de clones de saules aux métaux.....	37
A. Matériel et méthode.....	38
B. Résultats	44
C. Discussion sur le point I.....	50
D. Conclusion sur le point I	55
II. Etude du transfert des métaux du substrat vers les parties aériennes chez les saules à forte production de biomasse	57
A. Matériel et méthode	58
B. Résultats.....	59
C. Discussion sur le point II	65
D. Conclusion sur le point II.....	66
III. Approches physiologique et protéomique de la tolérance de clones de saules aux métaux <i>Physiological and proteomic responses of different willow clones (Salix fragilis x alba)exposed to dredged sediment contaminated by heavy metals.....</i>	67
Conclusion du point III.....	91
IV. Tolérance d'un phytoextracteur potentiel dans un contexte de phytoremédiation <i>A multiple-level study of metal tolerance in Salix fragilis and Salix aurita clones</i>	92
Conclusion du point IV.....	118
Discussion sur le chapitre 2	120
Chapitre 3 : Impact du cadmium sur des souches fongiques associées aux racines des ligneux.....	124
Objectifs et stratégies	126
I. Mise en place d'un protocole <i>in vitro</i> de sélection de souches fongiques associées à la rhizosphère de ligneux	

	<i>Effects of Cd on ectomycorrhizal fungal growth. Efficacy of in vitro screening experiment</i>	128
II.	Criblage <i>in vitro</i> de souches fongiques associées aux racines des saules et des aulnes en fonction de leur sensibilité au cadmium	
	<i>In vitro highlight of Cd tolerant dark septate endophytes</i>	137
	Discussion sur le chapitre 3	151
	Chapitre 4 : Discussion générale	154
	Conclusions et perspectives	162
	Bibliographie	168

Résumé

Depuis l'apparition du concept de phytoremédiation dans les années 80, beaucoup de recherches ont été menées sur les ligneux afin de tester leur efficacité en termes d'extraction des polluants métalliques du sol. S'agissant d'une essence à croissance rapide et capable de s'adapter à des conditions environnementales difficiles, le potentiel du genre *Salix* a été fortement exploré.

Dans ce travail, les essais ont été réalisés sur des clones de saules issus d'une collection « wallonne », mise en place par les projets ECOLIRI et ECOLIRIMED. Le premier objectif était d'étudier le potentiel de ces clones de saules « locaux » en considérant non seulement la capacité à extraire les polluants, propre à chaque clone, mais en associant à ce facteur, celui de leur production de biomasse. Cela constitue l'approche phénotypique de la tolérance aux métaux du saule. Le second objectif était d'intégrer à ces critères phénotypiques, des critères physiologiques et protéomiques souvent utilisés pour étudier la tolérance aux métaux d'autres espèces végétales, mais rarement appliqués chez le saule. La combinaison de ces approches confère une vue élargie de la tolérance aux métaux des clones de saules sélectionnés. Les critères phénotypiques permettent de répondre à des questions de capacité d'extraction, alors que les approches physiologiques et protéomiques permettent, quant à elles, de répondre aux questions liées à la « santé » de l'arbre une fois que celui-ci est en présence des métaux. Nos résultats indiquent que ce ne sont pas les clones qui ont produit le plus de biomasse qui ont les teneurs en métaux les plus importantes dans les tiges. Ceux qui montrent une plus faible production de biomasse seraient autant tolérants que ceux ayant produits une plus grande biomasse. Une diminution de la croissance en présence de métaux serait un indice de tolérance. Enfin, nos résultats des teneurs en métaux dans les tiges, confrontés à ceux de la littérature obtenus durant presque vingt ans de recherche, nous ont toutefois poussé à remettre en question l'utilisation du potentiel du saule en phytoextraction.

Le premier chapitre de cette thèse traite de l'étude du saule en présence de métaux, or les racines de ces ligneux sont colonisées par des champignons, ce qui fait de la rhizosphère un écosystème à part entière. Les champignons rhizosphériques, interface entre les racines et les polluants du sol, tiennent un rôle capital dans la tolérance aux métaux des ligneux. Cette microflore mérite donc une attention particulière. C'est pourquoi le second chapitre de cette thèse avait pour objectif de tester la croissance *in vitro*, des champignons récoltés sur les racines des ligneux en présence de cadmium. A l'issue de nos essais, des souches fongiques ont pu être identifiées et classées comme tolérantes à ce métal. Ce chapitre constitue l'amorce d'une étude qui pourrait être menée ultérieurement visant à analyser ces champignons en association aux racines des ligneux, en présence de métaux.

Abstract

Since the '80s, when the concept of phytoremediation first appeared, a lot of research has been put into studying the efficiency of woody plants in metal extraction. Willows, as fast growing plants and because of their tolerance to difficult edaphic conditions, have been particularly well investigated. In this investigation, the essays were done on *Salix* clones, which come from a Walloon collection provided by ECOLIRI and ECOLIRIMED projects. The first objective was to study the potential of these local clones by considering not only their ability to extract their pollutants, but also by adding their biomass production to this parameter. We have called the study of these criteria the phenotypic approach to the tolerance of *Salix* clones to metals. The second added value of this investigation lies in the second objective which aims to complete these phenotypic criteria with physiological and proteomic criteria. These last criteria are often used to study the metal tolerance of plant species, but rarely for willows. The combination of these different approaches gives a expand view of metal tolerance in *Salix* clones studied in this investigation. As the phenotypical parameters help to answer the extraction ability challenge, the physiological and proteomic approaches give answers linked to the "health" of the willow trees when they grow in the presence of metals. Our results indicate that the clones that produced more biomass were the ones that showed the highest metal concentrations. The clones with lower biomass production showed the same tolerance as the highest producers and our results revealed that growth reduction indicates metal tolerance. Finally, after comparing our results of the metal concentrations obtained in the twigs, to results obtained during the last two decades of research papers, we have concluded that we should reconsider the use of *Salix* potential in phytoextraction. The first chapter of this investigation was about *Salix* clones exposed to metals, but, in natural conditions, their roots are colonized by fungi. Thus, their rhizosphere constitutes a separate ecosystem, which is interesting to investigate. The rhizospheric fungi, the first interface between roots and soil pollutants, play an important role in metal tolerance in woody plants.

For this reason, the second chapter of this thesis aimed to test the *in vitro* growth of rhizospheric fungi collected on woody plant roots in the presence of cadmium. The outcome of these essays is that fungal strains have been identified and classified as tolerant to this metal. This chapter thus constitutes a first step in a future study aiming to analyze these strains in association with woody plant roots in the presence of metals.

Liste des Figures

Figure I : Représentation schématique des stratégies de tolérance aux métaux par exclusion et par accumulation	3
Figure II : Articulation de la thèse sur 4 chapitres	8
Figure III : Schéma des objectifs et stratégies développés dans le chapitre 2	6
Figure IV : Schéma regroupant les trois stratégies développées dans le chapitre 3	7
Figure V : Carte de la Wallonie (Belgique) sur laquelle sont représentés les cours d'eau non navigables (lettre minuscule) et les localités associées (lettre majuscule) où ont été prélevés les boutures de saules à l'origine pour la réalisation du parc à clones	40
Figures VI : A gauche : boutures enracinées de saule. A droite : schéma du conteneur	40
Figure VII : Plan général du site de dépôt de produits de dragage (Obourg, Belgique). Implantation des forages sur le terrain d'Obourg (n°26), Maisières (Mons, Belgique). 7 juillet 2000 (Laboratoire de Recherches Hydrauliques, Ministère wallon de l'équipement et des transports)	41
Figure VIII : Vue d'ensemble de l'expérience en conteneurs	43
Figure IX : Biomasse des tiges annuelles produite par l'ensemble des clones de saules dans un substrat contaminés aux métaux	45
Figure X : Teneurs en métaux ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ matière sèche) dans les tiges annuelles des saules ayant poussé sur un substrat contaminé aux métaux	47
Figure XI : Production de biomasse annuelle (tige annuelle en mg de matière sèche) durant l'expérience de 2011 en conteneurs.....	59
Figure XII : Schéma représentant la variabilité des teneurs en métaux dans les clones de saules.....	158

Liste des Tableaux

Tableau I : Variabilité des teneurs en métaux pouvant être accumulées au niveau des tiges chez plusieurs espèces de saule.	28-29
Tableau II : Capacité d'extraction du saule et durée totale pour l'assainissement d'un sol par phytoextraction..	30
Tableau III : Ensemble des clones utilisés pour la plantation en conteneurs dans l'expérience de 2010 (point I)	39
Tableau IV : Teneurs totales et disponibles en métaux (-oïdes) (mg.kg^{-1} matière sèche) dans le substrat	40
Tableau V : Analyse chimique du substrat.....	40
Tableau VI : Lixiviation des métaux (en pourmil) calculé sur base du rapport [quantité en métaux présente dans le lixiviat /la quantité en métaux de départ dans le conteneur]	48
Tableau VII : Facteur de bioconcentration (BCF) des clones de saules plantés en conteneurs	49
Tableau VIII : Ratio des teneurs en fer et en manganèse dans les tiges annuelles des saules plantés en substrat contaminé (expérience de 2010)	53
Tableau IX : Teneurs en métaux dans les produits de dragage utilisés comme substrat dans l'expérience de 2011 en conteneurs.....	58
Tableau X : Teneurs en métaux dans les tiges et les feuilles.	61
Tableau XI : Facteur de bioconcentration (BCF) des tiges des clones de saules plantés en conteneurs durant l'année 2011	62
Tableau XII : Facteur de bioconcentration (BCF) foliaire des clones de saules plantés en conteneurs durant l'année 2011	63
Tableau XIII : Facteur de transfert (TF) des clones de saules plantés en conteneurs durant l'année 2011.	64

Liste des abréviations

BCF : Facteur de bioconcentration.

CEC : Capacité d'échange cationique.

DSE : Dark septate endophyte.

ECM : Ectomycorhizes.

ETM : Élément-trace métallique.

F_o : Fluorescence minimale (après adaptation des feuilles à l'obscurité).

F_m : Fluorescence maximale (après adaptation des feuilles à l'obscurité).

F_v/F_m ou **F_m - F_o/F_m** : Efficacité du photosystème II.

HBP : High biomass producers

HM : Heavy metal.

LBP : Low biomass producers

MTE : Metal trace element.

m.s. : matière sèche.

ROS : Reactive oxygen species.

PSII : Photosystème II.

Sa : *Salix aurita*

Sf : *Salix fragilis*

TF : Facteur de transfert.

T(t)CR : Taillis à (très) courte rotation.

Ecolirimed : projet Interreg IV « Grandes Régions » (2009-2012): « *développement d'une filière d'écotypes ligneux pour la fixation durable et la phytoremédiation des berges de cours d'eau* ».

Les termes métaux lourds et éléments-traces métalliques (ETM) sont définis dans la première partie du chapitre I. Dans ce travail, le terme général « métaux » sera privilégié car le fer et le manganèse ont également été pris en compte dans les analyses et constituent des éléments majeurs de la croûte terrestre et non des ETM.

Introduction générale

1. Contexte général

Comment retracer l'histoire des métaux dans l'histoire de l'humanité ? Il est difficile, pour un scientifique s'intéressant à ce sujet, de ne pas philosopher sur la question. Le repère logique le plus lointain auquel nous puissions remonter est l'apparition d'outils plus élaborés que ceux créés à l'âge de la pierre. L'Homme, depuis son apparition, repousse les limites de chacune de ses inventions, ce qui lui a permis d'évoluer, de progresser par rapport aux autres espèces animales. De la Préhistoire à la Protohistoire (âge du cuivre, bronze, fer), l'espèce humaine a fait face à une structuration croissante de la société et à une maîtrise progressive de la métallurgie à partir de la fin du Néolithique (CNHS, 2013; Tout l'Univers, 1981). C'est alors que l'espèce humaine s'est véritablement *civilisée* (socialisation, économie, échanges commerciaux, etc.).

Civiliser (du latin *civilis*, de *civis*, citoyen)

Faire passer de l'état primitif à un certain degré d'évolution.

Civilisation. Evolution. Progrès. Culture.

Nous pouvons dès lors affirmer que l'exploitation des minerais naturels et l'utilisation des métaux a incontestablement évolué avec la civilisation. Peut-être devrions-nous dire que la civilisation de l'espèce humaine s'est construite, notamment, sur base de la maîtrise des métaux. D'autre part, il nous est difficile de ne pas nous interroger sur la raison pour laquelle de plus en plus de chercheurs sont amenés à proposer des projets de recherche ayant pour thème l'impact des métaux sur notre environnement et notre santé. Comment l'espèce humaine en est-elle arrivée là ? Comment avons-nous intégré, à l'heure actuelle, cette dualité entre prospérité économique et préoccupations environnementales ?

Le Siècle des Lumières a été celui des découvertes et des grandes innovations. Celles-ci ont été les fers de lances de l'industrialisation de nos sociétés et sont à l'origine de notre éternelle course vers la *prospérité*.

Prospérité (du latin *prosperare*)

Etat de ce qui est prospère.

Succès. Réussite. /Abondance. Richesse. Fortune. /Activité. Développement. Essor.

Hier, il s'agissait de fabriquer les premiers outils pour cultiver, les pièces de monnaie pour échanger, les armes pour chasser et se défendre. Aujourd'hui, nous pensons « nano-technologies » dans une ère où l'optimisation et la rationalisation répondent aux enjeux de la mondialisation (télé-communications, transports, technologies informatiques, etc.). La prospérité est la cause principale de l'exploitation continue et en excès des minerais.

Depuis deux siècles, aux quatre coins du globe, les métaux sont extraits et dispersés dans l'environnement. L'activité humaine est devenue une source à part entière de contaminants car elle a

introduit de nouveaux modes de dispersion des métaux (fumées, égouts). L'homme n'a pas modifié les volumes de métaux, qui sont persistants, mais a modifié son niveau d'exposition en changeant leur répartition, leurs formes chimiques et leurs teneurs dans son environnement proche (Miquel, 2001). Il a alors rendu les métaux toxiques et dangereux pour la santé, en contaminant son propre écosystème. Non seulement, les métaux font indéniablement partie du développement de l'Homme, mais ils font désormais partie des problèmes environnementaux.

Les études de risques sur la santé humaine indiquent que les principales voies d'exposition aux métaux sont l'inhalation et l'ingestion. En ce sens, des mesures ont déjà été prises en instaurant des réglementations visant à réduire leurs émissions dans le monde de l'industrie (filtres à particules, essence et peinture sans plomb, normes ISO 14000). Plus récemment, d'autres textes législatifs ont imposé une réglementation en termes de gestion et de dépollution des sites contaminés. En Belgique, les trois régions (Flandre, Bruxelles-Capitale, Wallonie) ont rédigé leur propre Décret « Sols » visant à assainir les sites pollués, tels que les sites industriels désaffectés, avant réaffectation, mais aussi à prévenir toute nouvelle pollution.

L'Homme, pour survivre, a perturbé et continue à perturber les écosystèmes, menaçant ainsi la survie des végétaux. L'activité humaine constitue une contrainte environnementale face à laquelle les capacités d'adaptation développées par les plantes, notamment lorsqu'elles sont en présence de métaux, sont primordiales.

Les végétaux, pour se développer dans un environnement contaminé par les métaux, doivent disposer de mécanismes de **tolérance**. Nous entendons par ce terme la capacité d'une plante à survivre, à croître et à se reproduire sur un sol dont les teneurs en métaux sont toxiques pour d'autres (Macnair et Baker, 1994). Ainsi, la tolérance aux métaux est le résultat de l'évolution des mécanismes d'**homéostasie** contrôlant leur absorption, transport, accumulation et leur détoxification au sein de la plante. Ces mécanismes contrôlent les teneurs en métaux essentiels et réduisent les effets néfastes liés aux excès en métaux essentiels et non essentiels (Clemens, 2001). Les progrès en génétique et en protéomique ont permis d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes de tolérance. C'est ainsi que, entre autres, certains gènes responsables du transport des métaux ont pu être mis en évidence ainsi que des mécanismes de défense. Deux grandes **stratégies de tolérance** aux métaux sont présentées : celle d'*exclusion* et celle d'*accumulation* (Figure I) (Dahmani-Muller *et al.*, 2000). La **stratégie d'exclusion** regroupe les mécanismes limitant le transport des métaux dans la partie aérienne de la plante, concentrant principalement ces derniers dans la rhizosphère et les racines. La **stratégie d'accumulation**, à l'inverse, inclut les mécanismes permettant de tolérer que les métaux se concentrent dans les parties aériennes de la plante.

Les études menées en génétique et sur l'évolution des populations végétales ont approfondi nos connaissances sur les mécanismes cellulaires de tolérance aux métaux. Sachant que les plantes ont des capacités d'adaptation et de tolérance à la présence de métaux, la question suivante s'est posée : pouvons-nous utiliser ces aptitudes pour remédier à la pollution des sols ? Un volet de recherche s'est dès lors développé : l'étude des techniques de **phytoremédiation**.

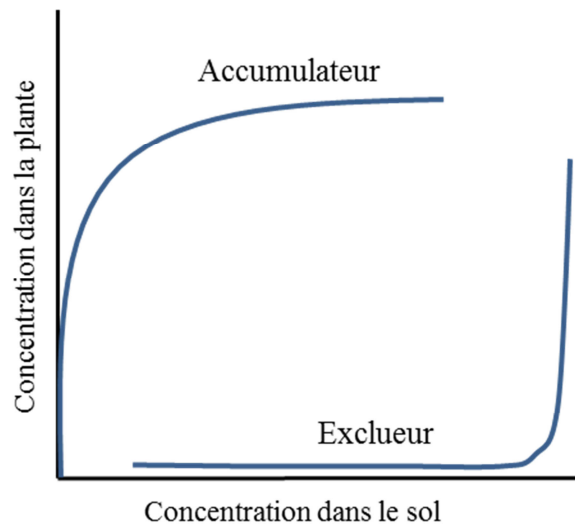


Figure I : Représentation schématique des stratégies de tolérance aux métaux par exclusion et par accumulation.

2. Présentation du projet ECOLIRIMED

Cette thèse a été réalisée dans le cadre du projet Interreg IV « Grande Région » **ECOLIRIMED (2008-2012)**: « Développement d'une filière d'écotypes ligneux pour la fixation durable et la phytoremédiation des berges de cours d'eau ». Ce projet s'inscrit dans la continuité du projet ECOLIRI (Interreg III-A-WLL), lancé en 2004, qui a permis d'établir une filière de production d'écotypes de ligneux tout en préservant la biodiversité de la Wallonie, du Grand-Duché de Luxembourg et de la Lorraine française.

Pour les gestionnaires publics, la renaturation des cours d'eau constitue la voie la plus favorable pour remédier aux inondations et pour réduire les dégâts potentiels causés par ces dernières. La ripisylve¹ joue un rôle primordial, tant au niveau de la stabilisation des berges, qu'aux niveaux de la préservation de la faune et de la qualité de l'eau. L'aulne, le saule et le frêne sont généralement les espèces ligneuses choisies, étant donné la complémentarité de leurs enracinements (système racinaire traçant pour le saule et l'aulne, pivotant pour le frêne). Cependant, dans le cadre du projet ECOLIRIMED, seuls le saule et l'aulne ont pu être considérés (Druart *et al.*, 2013).

¹ Les ripisylves indigènes ou forêts ripicoles sont définies comme des boisements alluviaux occupant le lit majeur des cours d'eau et installés sur des alluvions récentes (<http://spw.wallonie.be/dce/mes/1540.pdf>)

L'objet de ce programme de recherche s'articulait autour de la liaison entre les végétaux de la ripisylve et les métaux à l'échelle des berges de cours d'eau. Les métaux sont véhiculés par les rivières et peuvent s'accumuler dans les sédiments des lits et des berges.

Le système racinaire de la ripisylve est donc particulièrement exposé aux polluants et se trouve, à terme, soumis à un état de stress physiologique. C'est à ce niveau qu'intervient la notion de tolérance chez les ligneux : quelle stratégie développent-ils pour tolérer cet état de stress induit par les métaux ?

Le premier objectif du projet ECOLIRIMED portait sur l'étude de la tolérance aux métaux du matériel végétal issu de la collection de saules et d'aulnes. Le corrolaire de cet objectif intégrait la dimension de valorisation par l'utilisation de la biomasse produite le long des cours d'eau pour l'assainissement des berges par phytoextraction. L'imposition des normes de qualité des eaux de surface oblige la mise en œuvre d'outils permettant la gestion des pollutions liées aux sédiments de cours d'eau. L'utilisation des ligneux en phytoremédiation constitue une alternative aux techniques de décontamination physico-chimiques, surtout lorsqu'il y a nécessité de préserver la stabilité des berges. Cette alternative rencontre les objectifs de la Directive européenne sur l'eau² qui impose aux états membres d'améliorer la qualité des eaux de surface selon un calendrier strict (Evlard *et al.*, 2011). **Le deuxième objectif du projet ECOLIRIMED était de promouvoir l'utilisation de ligneux « locaux » de qualité afin de conserver la biodiversité à l'aide des écotypes d'aulnes et de saules.**

Les racines des ligneux sont colonisées par divers champignons (Smith et Read, 2008 ; Drénou, 2006). Ces derniers aident à la nutrition de la plante grâce à leurs hyphes qui parcourent le volume de sol et véhiculent les éléments nutritionnels vers les racines (Smith et Read, 2008). Les champignons rhizosphériques jouent donc un rôle crucial dans le développement des ligneux. Ces micro-organismes peuvent également être affectés par les métaux, ce qui peut dès lors perturber le succès d'une installation de la ripisylve en présence des polluants. **Un troisième objectif du projet était donc d'évaluer la tolérance aux métaux de champignons isolés à partir des racines d'aulnes et de saules** localisés sur les berges de cours d'eau non navigables.

Cette thèse, **présentée en partie sous forme d'articles**, intègre deux objectifs du projet ECOLIRIMED :

- 1) L'impact des métaux sur le saule
- 2) L'impact du cadmium sur des souches fongiques associées aux racines des aulnes et des saules

² Directive Cadre Eau, 2000/60/CE.

3. Articulation de la thèse

Cette thèse s'organise autour de 4 chapitres (Figure II):

Le **chapitre 1** constitue la **partie bibliographique** ventilée en deux points.

Le **point I** a fait l'objet d'un article :

- *Impact des éléments-traces métalliques sur les plantes et les techniques de phytoremédiation*
Article accepté pour publication dans « *Renaturation des berges de cours d'eau et phytoremédiation* ». Gembloux (Belgique) : Presses agronomiques de Gembloux).

Le **point II** est la partie bibliographique concernant les études menées sur le saule et son potentiel en phytoremédiation.

Le **chapitre 2** constitue **l'étude de l'impact des métaux sur le saule**. Ce chapitre, ventilé en quatre points, regroupe les trois expériences en conteneurs menées en extérieur de 2010 à 2012 avec du matériel local (saules) dont nous connaissons la provenance (projet ECOLIRIMED). Les quatre points correspondent à différents objectifs qui sont mis en évidence sous fond gris sur la Figure III. Pour répondre à chaque objectif, une stratégie a été mise en place (fond blanc dans la Figure III). Le **point I** répond à des objectifs de **sélection** de saules selon un point de vue **phénotypique** (production de la biomasse en milieu contaminé, teneurs en métaux dans les parties aériennes). Dans ce point, l'influence des racines des saules sur la mobilité des métaux a également été testée. **A l'issue du point I, plusieurs clones de saules ont pu être sélectionnés**. Ceux-ci ont été de nouveau étudiés afin de calculer le transfert des métaux au sein des parties aériennes (point II).

Pour le peuplier, qui fait également partie de la famille des *Salicaceae*, l'utilisation des approches physiologique et protéomique dans l'étude de l'impact des métaux et autres stress abiotiques est de plus en plus courante (Marmioli *et al.*, 2011). Cependant, ces deux approches ont été peu utilisées chez le saule. Dans les **points III et IV**, nous avons développé une étude de la tolérance des saules sélectionnés à l'issue du point I en utilisant une approche **physiologique** qui consistait à mesurer la fluorescence chlorophyllienne, à doser les pigments ainsi que des sucres dans les feuilles. L'expression de protéines suite à l'exposition aux métaux a également été investiguée chez ces saules (approche **protéomique**). Les points III et IV sont présentés sous forme de deux articles :

- « *Physiological and proteomic responses of different willow clones (Salix fragilis x alba) exposed to dredged sediment contaminated by heavy metals* ». Soumis à International Journal of Phytoremediation
- « *A multiple-level study of metal tolerance in Salix fragilis and Salix aurita clones* ».
A soumettre.

CHAPITRE 2 : Impact des métaux sur le saule
Approches phénotypique, physiologique et protéomique

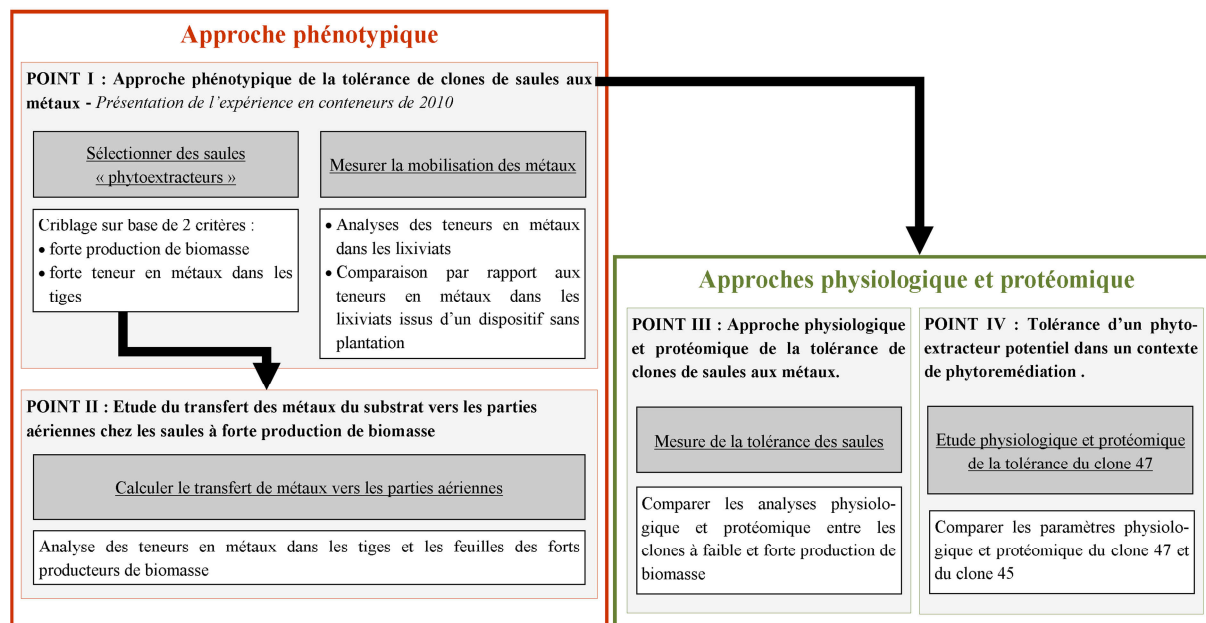


Figure III : Schéma des objectifs (fond gris) et stratégies (fond blanc) développés dans le chapitre 2 consacré à l'étude de la tolérance des clones de saules aux métaux en utilisant une approche phénotypique (encadré rouge) ainsi que des approches physiologique et protéomique (encadré vert).

Le **chapitre 3** constitue **l'étude de l'impact du cadmium** sur des souches fongiques issues de racines d'aulnes et de saules (Figure IV). En 2009, dans le cadre d'ECOLIRIMED, des souches fongiques associées aux racines de saules et d'aulnes localisés le long de berges de cours d'eau non navigables, ont été récoltées. Suite à ce travail de prospection, une mycothèque de 91 souches fongiques a été réalisée et une étude de la sensibilité au cadmium a été menée sur cette collection de souches. Le cadmium a été choisi pour deux raisons. Premièrement parce que, comme le plomb, il ne constitue pas un élément essentiel pour les organismes vivants, et deuxièmement, parce que le cadmium est plus toxique que le plomb car il est plus facilement assimilable par les organismes vivants (similarité avec le Zn, plus disponible) (Balsberg Pahlsson, 1989).

Cette étude fait l'objet du chapitre 3 qui comprend deux points (Figure IV):

- **Point I :** Mise en place d'un protocole *in vitro* permettant d'évaluer rapidement la tolérance au cadmium chez les souches fongiques de la mycothèque. Ce point est présenté sous forme d'un article intitulé :
 - « *Effects of Cd on ectomycorrhizal fungal growth. Efficacy of in vitro screening experiment* ». Publié dans *Agrochimica*, 2011, 55(2): 85-93.

Cet article présente un protocole d'expérimentation et les résultats obtenus sur une première série de champignons rhizosphériques de la mycothèque.

- **Point II** : Utilisation du protocole développé dans le point précédent afin de caractériser ces souches fongiques sur base de leur sensibilité au cadmium. Ce point est présenté sous forme d'un article intitulé :

- « *In vitro highlight of Cd tolerant dark septate endophytes* ».

Soumis à International Journal of Phytoremediation

Dans ce deuxième article, certaines souches utilisées dans le point I ainsi qu'une deuxième série de souches de la mycothèque ont été testées selon le même protocole.

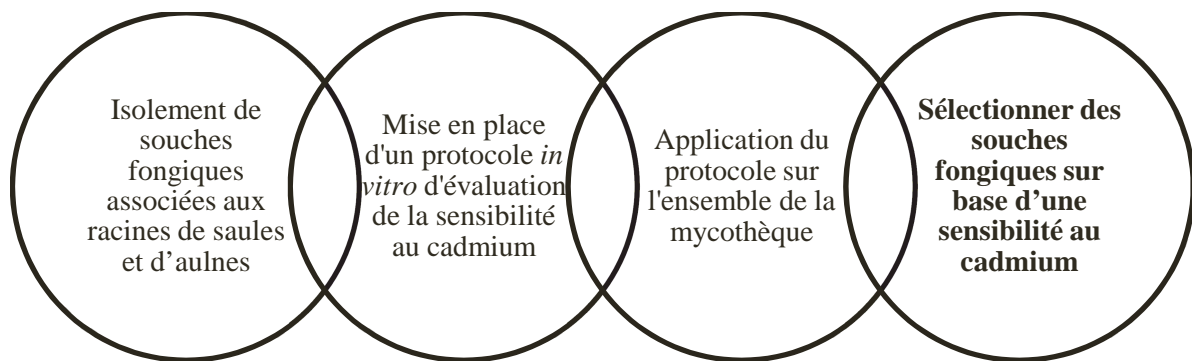


Figure IV : Schéma regroupant les trois stratégies (cercles) développées dans le chapitre 3 consacré à l'étude de la sensibilité au cadmium de souches fongiques issues des racines d'aulnes et de saules.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

- I. Impact des éléments-traces métalliques sur les plantes et les techniques de phytoremédiation¹
- II. Le saule

Chapitre 2

Impact des métaux sur le saule

Approches phénotypique, physiologique et protéomique

- I. Approche phénotypique de la tolérance aux métaux de clones de saules
- II. Etude du transfert des métaux du substrat vers les parties aériennes chez les saules à forte production de biomasse
- III. Approches physiologique et protéomique de la tolérance de clones de saules aux métaux²
- IV. Tolérance d'un phytoextracteur potentiel dans un contexte de phytoremédiation²

Chapitre 3

Impact du cadmium sur des souches fongiques associées aux racines des ligneux

- I. Mise en place d'un protocole *in vitro* de sélection de souches fongiques associées à la rhizosphère de ligneux³
- II. Criblage *in vitro* de souches fongiques associées aux racines des saules et des aulnes en fonction de leur sensibilité au cadmium²

Chapitre 4

Discussion générale

Conclusions et perspectives

Figure II : Articulation de la thèse en 4 chapitres. ¹Article accepté pour publication dans « Renaturation des berges de cours d'eau et phytoremédiation. Gembloux (Belgique) : Presses agronomiques de Gembloux).

² Point présenté sous forme d'article. ³ Article publié dans *Agrochimica* 2011, 55(2): 85-93.



Chapitre 1

Synthèse bibliographique

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

II. Le saule

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

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

Aricia Evlard, Bruno Campanella

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

Article accepté pour publication dans l'ouvrage : Druart P., Husson C. et Paul R. (Eds.). « Renaturation des berges de cours d'eau et phytoremédiation ». Presses agronomiques de Gembloux (Belgique) (17/04/2013).

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

Aricia Evlard*, Bruno Campanella

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

Bruno Campanella : Bruno.Campanella@ulg.ac.be

*Corresponding author: aevlard@gmail.com. Tel: +32(0)81.62.24.94 - Fax: +32(0)81.60.07.27

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

Synthèse bibliographique

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

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 anti-oxydatif 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.

Abstract

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

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.

1. Les éléments-traces métalliques dans l'environnement

1.1 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 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.

1.2 Mobilité et biodisponibilité des éléments-traces métalliques

La teneur totale d'un élément donne une idée du « stock » 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 de 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 de 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 microbologique.

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 transporté 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).

2. 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 ($0.05 - 10 \text{ mg.kg}^{-1}$ mat. sèche). C'est un composé d'enzymes telles que les glyoxalases et uréases ainsi que quelques superoxyde 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 co-enzymes 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.

2.1 L'interaction entre les métaux

Plusieurs métaux se retrouvent en même temps dans les 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 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.

2.2 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 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 (a); 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 1).

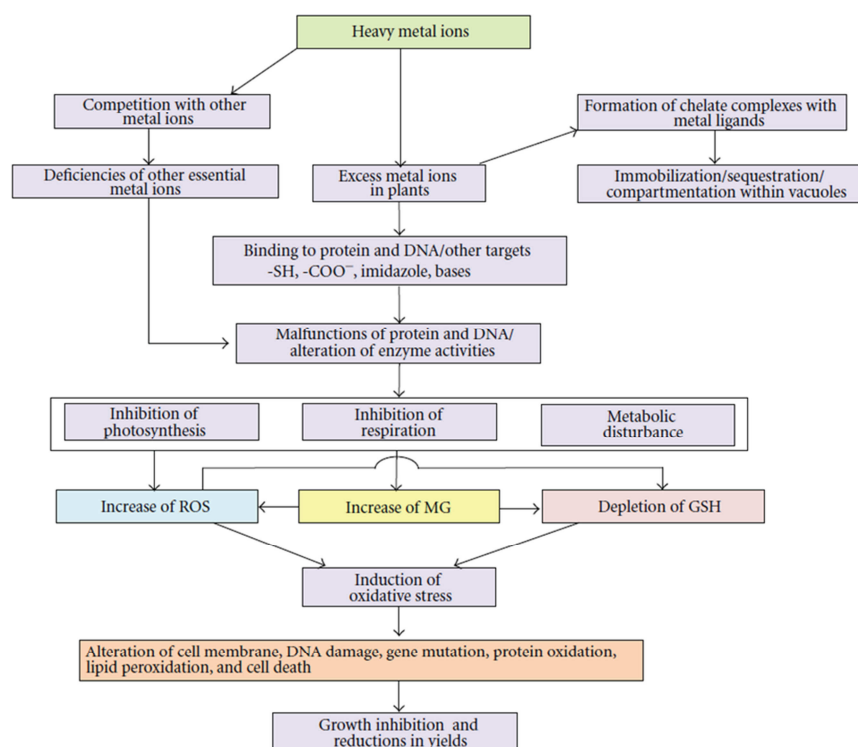


Figure 1 : Mécanismes biochimiques et moléculaires impliqués dans la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) et le dommage cellulaire chez les plantes suite à la présence des ETM. Les initiales MG sont utilisées pour methylglyoxal et GSH pour Glutathione. (figure issue de Hossain *et al.*, 2012(a)). *Biochemical and molecular mechanisms involved in the production of reactive oxygen species (ROS) and cellular damages in plants due to the presence of MTE. The initial letters MG are used for methylglyoxal and GSH for Glutathione (figure from Hossain et al., 2012(a)).*

2.3 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.

2.3.1 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 symbiotes, 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).

2.3.2 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. Etant 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,b ; 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 ; Krznanic *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 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).

2.3.3 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(a)). Une série de familles de gènes est impliquée dans la séquestration et la compartimentation des métaux au sein de la cellule (Figure 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, $\gamma\text{-Ala}$, Ser, Gln ou Glu et $n = 2-11$. Les MT sont également des

polypeptides à faible poids moléculaire riches en cystéine. 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(a)). 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 2). La famille des transporteurs CDF (Cation Diffusion Facilitator) serait impliquée dans le transport de Zn^{2+} et Cd^{2+} (ZAT) dans la vacuole. Egalement au niveau du tonoplaste, la présence probable d'antiports Cd^{2+}/H^{+} et $Ca^{2+}/cation$ (CAX) a été signalée (Sanita di Toppi *et al.*, 1999; Clemens, 2001; Hossain *et al.*, 2012(a)). 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(a)).

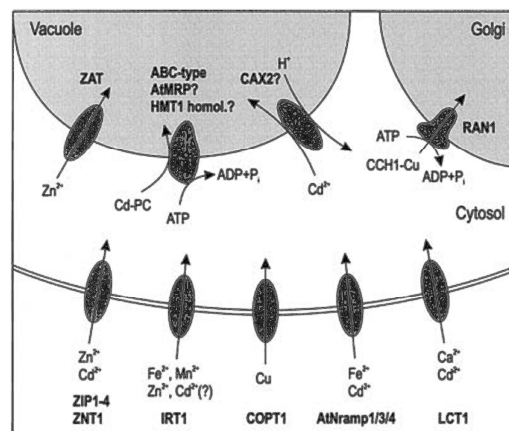


Figure 2 : Transporteurs impliqués dans la compartimentation des ETM (figure issue de Clemens, 2001). *Metal plant transporters involved in the sequestration of MTE (figure from Clemens, 2001).*

2.3.4 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.

3. 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 (stratégie d'exclusion ou d'accumulation, voir 2.3.3).

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 forme moins toxique.

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

3.1 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 point 2.3). 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 ; Vamerali *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. Eventuellement, 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 ; Vamerali *et al.*, 2010).

3.2 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⁻¹. 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. 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.

Les termes métaux lourds et éléments-traces métalliques (ETM) ont été définis dans cette première partie. Dans la suite de ce travail, le terme général « métaux » sera privilégié car le fer et le manganèse ont également été pris en compte dans les analyses et constituent des éléments majeurs de la croûte terrestre et non des ETM.

II. Le saule

Les saules, du genre *Salix*, appartiennent à la famille des *Salicaceae*. Les différentes caractéristiques des saules font de ce genre l'un des plus utilisés dans le monde entier. *Salix*, comprenant entre 330 et 500 espèces, est originaire des zones tempérées et subtropicales. Sa distribution géographique s'étend sur tous les continents à l'exception de l'Antarctique et de l'Australie (FAO, 2013 ; Mertens *et al.*, 2011a, 2011b). Cette large distribution est due au fait que les saules sont des essences à croissance rapide, pouvant se propager par multiplication végétative et s'adapter à différentes conditions (sol, climat). Le saule constitue donc une des essences les plus étudiées dans la restauration environnementale mais aussi pour la lutte contre l'érosion du sol et les inondations. Par ailleurs, il confère un habitat et est source de nourriture pour divers organismes. De plus, grâce à sa grande efficacité dans la capture du carbone (CO₂), il s'avère utile face au changement climatique. En plus de son utilisation traditionnelle (foresterie, agriculture), le saule a donc été récemment envisagé comme source d'énergie renouvelable et dans la gestion des sols pollués (Baudouin, 1993 ; Kuzovkina *et al.*, 2005 ; FAO, 2008, 2013; Lambot, 2011).

Les saules ont une capacité d'adaptation à diverses conditions environnementales et ce, parce qu'ils bénéficient d'une évolution dynamique des gènes, ce qui favorise notamment la formation d'hybrides (Mertens *et al.*, 2011 ; Evlard *et al.*, 2011). « *La diversité, dans un contexte global, est essentielle à la survie des espèces et à leurs adaptations spécifiques aux environnements. Elle est fondamentale dans les interactions biologiques, dans le fonctionnement des écosystèmes et dans les grands équilibres de la planète (climat, cycles biogéochimiques...)* » (Faucon, 2009). La biodiversité des saules est un critère important à conserver. En ce sens, "The International Poplar Commission (IPC)" a été fondée afin de promouvoir la culture et la conservation des genres qui constituent la famille des *Salicaceae*. En Wallonie, le projet ECOLIRI (Interreg III-A-WLL), lancé en 2004, a permis la création d'une filière de production de saules, ceci grâce à la prospection et à la récolte de boutures ainsi qu'à la production de jeunes plants (Druart *et al.*, 2013). Cette collection regroupe des centaines de clones balayant une large diversité de saules provenant de la Wallonie.

Plusieurs études de laboratoire et de terrain ont pu mettre en évidence la variabilité inter et intra-spécifique du saule à accumuler les métaux (Marmioli *et al.*, 2011). Quelques exemples recouvrant les résultats d'études menées *in situ* ou en pots avec différentes espèces de saule sont repris dans le Tableau I.

De nombreux essais ont évalué la faisabilité d'une extraction des métaux par les ligneux en se basant sur plusieurs observations :

- A l'issue des essais en laboratoire, de fortes teneurs en métaux dans les tiges de certains individus ont pu être mises en évidence (Dickinson *et al.*, 2009).
- Bien que, chez le saule, les teneurs en métaux dans la biomasse soient inférieures à celles retrouvées chez les plantes hyperaccumulatrices, la quantité de métaux pouvant être extraite

sera plus importante chez le ligneux, par unité (plante/hectare), grâce à son importante production de biomasse (Ekval et Greger, 2003 ; Migeon *et al.*, 2009 ; Marmioli *et al.*, 2011).

- L'extraction peut être améliorée en favorisant la production des parties récoltables grâce aux techniques de culture adéquates. L'une d'entre elles est le taillis à (très) courte rotation (T(t)CR) (Laureysens *et al.*, 2004). Il s'agit d'ôter la dominance apicale (croissance en hauteur) afin de privilégier le développement des bourgeons axillaires et donc la ramification. Ainsi, en augmentant la production de biomasse là où s'accumule le métal et la fréquence de récolte (3 à 5 ans), il est possible d'augmenter l'extraction du métal (Marmioli *et al.*, 2011, Witters *et al.*, 2009 ; Pietrini *et al.*, 2010).

Au cours du vieillissement de l'arbre, il y a transformation du bois : les cernes les plus en périphérie sont les plus récents et permettent la montée de la sève brute vers les parties aériennes. Cette zone, permettant aussi le stockage des éléments, est appelée l'**aubier**. Lorsque ces cernes de croissance ne font plus circuler la sève, ils se transforment en **duramen** (ou bois de cœur) et une partie des éléments chimiques est redistribuée vers l'aubier, similairement au processus de la sénescence foliaire (Weitner, 2007). Hagemeyer (1995, 2000) dans Gossiaux (2012) a montré des mouvements similaires des métaux au sein du bois. Premièrement, l'aubier, *via* la circulation de la sève, est plus concentré en certains métaux. Deuxièmement, lors de la transformation de l'aubier en bois de cœur, certains éléments sont remobilisés vers l'aubier. Or, le taillis du saule favorise la formation de ce bois. Le T(t)CR privilégie donc l'extraction des polluants.

Quelques techniques de valorisation de biomasse ont été proposées et/ou sont en cours d'investigation. Les parties ligneuses peuvent être utilisées comme biomasse énergétique. La chaleur produite fournit alors de l'énergie et permet une certaine rentabilité économique au système de dépollution (Hammer *et al.*, 2003). Toutefois, l'incinération ne peut être envisagée que si des systèmes de filtration limitent les émissions de métaux dans l'atmosphère. Un dispositif de récupération des métaux dans les cendres est également envisagé (Meers *et al.* 2005 ; Kuppens *et al.*, 2010).

Il s'agirait alors d'une extraction douce, moins onéreuse par rapport aux méthodes physico-chimiques demandant d'importants investissements énergétiques et financiers (Witters *et al.*, 2009 ; Vanobberghen, 2011).

L'incinération « contrôlée » implique un investissement de départ, qui peut cependant être amorti par la production d'énergie et un commerce des métaux recyclés (Ledin, 1998).

Cependant, la phytoextraction présente quelques inconvénients :

- Elle n'est possible que sur des sols faiblement à modérément contaminés. D'une part, parce que des teneurs en métaux trop importantes sont toxiques pour les plantes et empêchent leur installation (Pulford *et al.*, 2001 ; King *et al.*, 2006 ; Meers *et al.*, 2007 ; Dickinson, 2000). D'autre part, parce que la législation du Décret Sols, au-delà de certaines valeurs « seuil », impose un assainissement par techniques traditionnelles et ne privilégie pas la phytoextraction.

- La contamination doit être localisée au niveau de la couche supérieure du sol (moins de 50 cm) où se situent les racines (Witters *et al.*, 2009).
- Il s'agit d'une technique très lente de décontamination (Baum *et al.*, 2006 ; Pietrosanti *et al.* 2009). Plusieurs modèles et équations ont permis de calculer le temps nécessaire à la décontamination du sol par phytoextraction et celui-ci serait compris entre une et plusieurs centaines d'années. Vu la variabilité des teneurs obtenues au sein d'une même espèce, il est difficile de pouvoir comparer les quantités de métaux extraites par les saules. Aussi, les teneurs en métaux ainsi que les caractéristiques du sol varient d'une étude à l'autre. Cependant, des résultats d'essais *in situ* ayant tenté de calculer la durée d'une phytoextraction sont regroupés dans le Tableau II. Ces calculs se basent sur plusieurs critères « optimistes » qui ne sont pas toujours vérifiés tels que l'extraction maximale continue du métal ou la production maximale de biomasse (10 à 15 t.ha⁻¹.an⁻¹). De plus, certains auteurs obtiennent des durées de décontamination moins importantes en se basant uniquement sur une fraction biodisponible, parce qu'elle est considérée comme potentiellement dangereuse, sous-entendant une fraction totale immuable (Van Der Lelie *et al.*, 2001).
- Les teneurs en métaux sont, de manière générale, plus importantes dans les racines (Ruttens *et al.* 2011, Pietrosanti *et al.*, 2009 ; Verveake *et al.*, 2004, Rosselli *et al.*, 2003).

Tableau I : Variabilité des teneurs en métaux pouvant être accumulées au niveau des tiges de différentes espèces de saule.

Espèce	Type d'expérience	Substrat	Concentration en métaux ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS)						Référence
			Tige						
			Cd	Zn	Cu	Cr	Pb	Ni	
<i>S. amygdaloides</i> Anderss.	Collecte	Non indiqué	<1.7 – 4.3	169.0 – 466.5					Brieger <i>et al.</i> , 1992
<i>S. interior</i> Rowlee			<0.8	44.8 – 84.7					
<i>S. viminalis</i>	Collecte de branches d'un an	Cd : 0.52 - 0.59 (fraction HNO ₃)							Greger et Landberg, 1995
78101 (High accumulator)	sur un arbre de trois ans (TTCR)	pH 6.6-6.8	0.7 – 1.2						
78183 (Medium accumulator)			0.35 - 0.82						
78112 (Low accumulator)			0.3 - 0.66						
<i>S. daphnioides</i>	Collecte de branches sur un site pollué	Total (Echangeable)	0.1 - 1.0	40 - 150	0.8 - 4.5				Landberg <i>et al.</i> , 1996
<i>S. purpurea</i>		Cd : 67.4 (0.52 à 0.63)	0.1	80					
<i>S. triandra</i>		Cu : 97.2 (1.85 à 2.41)	1.2	120					
<i>S. viminalis</i>		Zn : 770 (54.8 à 64)	0.1 - 0.3	25 - 330					
		pH 5.6							
<i>S. caprea</i>	<i>In situ</i> (1 à 3 ans)	Cu : 11670 à 9100 (fraction HNO ₃)			126 - 134.7				Dickinson, 2000
<i>S. purpurea</i>					263				
<i>S. alba</i>					126				
<i>S. rubens</i>					208				
<i>S. viminalis</i>					121				
<i>S. fragilis</i>					102				
<i>S. calodendron</i>					207				
<i>Salix</i> spp.	<i>In situ</i>	(aqua regia)		28 - 482		<7 – 63			Pulford <i>et al.</i> , 2001
		Zn : 2333							
		Cr : 1788							
<i>S. viminalis</i>	<i>In situ</i>	(fraction HNO ₃)	4.5	190	18				Rosselli <i>et al.</i> , 2003
		Cd : 1.8							
		Zn : 620							
		Cu : 557							
		pH 7.4							
<i>Salix</i> spp.	Pot (8 mois)	Zn : 848		200 - 300	20				
		Cu : 1140							
<i>S. viminalis</i>	<i>In situ</i> (5 ans)	Dornach (Fraction HNO ₃) pH 7.3	1.5	70					Hammer <i>et al.</i> , 2003
		Cd : 2.3							
		Zn : 650							
		Caslano (Fraction HNO ₃) pH 5.2	2.2	430					
		Cd : 2.8							
		Zn : 1158							

Tableau I : Variabilité des teneurs en métaux pouvant être accumulées au niveau des tiges de différentes espèces de saule (suite).

Espèce	Type d'expérience	Substrat	Concentration en métaux ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS)							Référence
			Tige							
			Cd	Zn	Cu	Cr	Pb	Ni		
<i>S. viminalis</i>	<i>In situ</i>	Cd : 3 Zn : 437.3 Cu : 72.5 Pb : 142.9	3.6	146.1	5.3		12.7		Vervaeke <i>et al.</i> , 2003	
<i>S. viminalis</i>	<i>In situ</i>	Cd : 1.0-4.6 Zn : 144 - 729 Cu : 18 - 99 Pb : 28 -147 Cr : 28 - 115 Ni : 13 - 44	Bois 1.6-3.3 Ecorce 3.2-5.9	Bois 38-65 Ecorce 262-460	Bois 5.9-7.8 Ecorce 8.6-9.7	Bois 0.2-0.3 Ecorce 0.3-0.4	Bois 1.6-3.3 Ecorce 3.2-6.0	Bois 0.2-0.5 Ecorce 0.5-0.8	Meers <i>et al.</i> , 2005	
<i>Salix</i> spp.	<i>In situ</i> (3 ans)	Cd : 0.3-6.1 Zn : 121-329 Cu : 5.9-307 Pb : 99-720 Ni : 24-50 pH : 6.8 - 7.4	3 - 8	100 - 300	15 - 30		0-2	1.5-3.0	French <i>et al.</i> , 2006	
<i>Salix</i> spp.	<i>In situ</i> (3 ans)	Cd : 20 Zn : 4285 Cu : 740 Pb : 1445 Cr : 980 pH : 3.7 - 6.3	10.5	1620	26.8		14		King <i>et al.</i> , 2006	
<i>Salix</i> spp.	Pot	Aqua regia (3 types de sol) Cd : 8-25 Cd Zn : 275-1160 Cu : 28-111 Pb : 134-206 Cr : 12-440 Ni : 4.4-49 pH : 6.6 - 7.5	4 - 40	100 - 600	2.1 - 9.8	0.58 - 2.2	0.46 - 3.9		Meers <i>et al.</i> , 2007	
<i>Salix</i> spp.	<i>In situ</i> (2 ans)	Aqua regia Cd : 5.7 Zn : 343 Cu : 35 Pb : 185	6 -30	600 - 800	8 à 10		8 - 60		Ruttens <i>et al.</i> , 2011	

Tableau II : Capacité d'extraction du saule et durée totale pour l'assainissement d'un sol par phytoextraction.

Référence	Type expérience	Concentration (tige) ($\mu\text{g.g}^{-1}$ m.s.)	Quantité extraite g/ha.an	Durée d'assainissement (année)
Greger et Landberg, 1995; 1999	Plantation	Cd	2.2	36 ^a
	Plantation	Cd	22.2	216 ^b
Hammer <i>et al.</i> , 2003	Plantation (5 ans)	Cd	1.5 à 2.2	31 à 175
		Zn	70 à 430	86 à 460
Meers <i>et al.</i> , 2005	Sur base d'une production annuelle de bioma	Cd	(réduction annuelle ^f : 0.02 mg.kg ⁻¹)	83 ^c
		Zn	(réduction annuelle ^f : 1.4 mg.kg ⁻¹)	5034 ^c
		Cu	(réduction annuelle ^f : 0.04 mg.kg ⁻¹)	145 ^c
		Pb	(réduction annuelle ^f : 0.02 mg.kg ⁻¹)	83 ^c
		Ni		12 ^c
		Cr		6 ^c
French <i>et al.</i> , 2006	Plantation (3 ans)	Cd	Réduction de 5.6 $\mu\text{g.g}^{-1}$ d	
		Zn	Réduction de 96 $\mu\text{g.g}^{-1}$ d	
Witters <i>et al.</i> , 2009	Plantation (3 ans)	Cd	10 à 34.5	108 à 55 ^e
Ruttens <i>et al.</i> , 2011				

^a Sur base d'une production de 12t/ha.an, pour passer de 5 $\mu\text{gCd.g}^{-1}$ sol à 0.5 $\mu\text{gCd.g}^{-1}$ sol.

^b Sur base d'une production de 10t/ha.an.

^c Sur base d'une production de 10 à 15 t/ha.an.

^d Réduction sur une plantation de 20 ans en considérant une constance dans l'accumulation et dans les propriétés du sol.

^e Pour atteindre les valeurs du Décret Sol Flamand.

^f Dans le sol.

Compte tenu de ces résultats en phytoextraction, la phytostabilisation est certainement plus envisageable sur les sites contaminés aux métaux. La sélection de plants se portera alors sur les individus de saule développant des mécanismes d'exclusion et limitant la contamination de la biomasse (Evlard *et al.*, 2013, Suer et Andersson-Sköld, 2011).

Une plantation de saules, exploitée en T(t)CR, promeut le développement des racines et accroît la densité racinaire de la couche supérieure du sol jusqu'à une profondeur comprise entre 2 et 3 m. En augmentant la densité racinaire, on augmente la surface de contact entre les racines et le sol, favorisant la stabilisation des métaux (adsorption, chélation,...) (King *et al.*, 2006 ; Marmioli *et al.*, 2011). De plus, la densité racinaire accroît les chances de la prolifération des bactéries et champignons (faune et flore de la rhizosphère), favorisant ainsi la dégradation des polluants organiques ou l'immobilisation des métaux (De Paolis *et al.*, 2011). La re-végétalisation des sites contaminés permet l'installation d'un couvert végétal limitant la dispersion des métaux par l'air ou par l'eau (Migeon *et al.*, 2009 ; Pietrosanti *et al.*, 2009). Par ailleurs, l'utilisation d'amendements pour réduire significativement la mobilité et la disponibilité des métaux est également proposée (Van Der Lelie *et al.*, 2001 ; Vangronsveld *et al.*, 2009).

Chapitre 2

Impact des métaux sur le saule

Approches phénotypique, physiologique et protéomique

- I. Approche phénotypique de la tolérance aux métaux des clones de saules
 - II. Etude du transfert des métaux du substrat vers les parties aériennes chez les saules à forte production de biomasse
 - III. Approches physiologique et protéomique de la tolérance de clones de saules aux métaux
 - IV. Tolérance d'un phytoextracteur potentiel dans un contexte de phytoremédiation
-

Chapitre 2 : Impact des métaux sur le saule. Approches phénotypique, physiologique et protéomique.

Aujourd'hui, les mécanismes de tolérance chez les herbacées sont largement étudiés et la définition de tolérance proposée par Macnair et Baker (1994) comme étant la *capacité d'une plante à survivre, à croître et à se reproduire sur un sol dont les teneurs en métaux sont toxiques pour d'autres*, est claire. Néanmoins, cette définition est-elle applicable pour les ligneux ? Comment la tolérance se traduit-elle à l'échelle de la vie d'un arbre ?

Pour les saules, l'étude de la tolérance aux métaux débute par l'observation de la **réponse phénotypique** de différents individus, appartenant à une ou plusieurs espèces. Par réponse phénotypique nous entendons, dans le cadre de ce travail, la mesure de la croissance et les teneurs en métaux accumulées dans les différents organes (racines, tiges, feuilles). Ensuite, l'investigation approfondie de ces réponses phénotypiques a impliqué une **approche physiologique** et **biochimique**. Il s'agit par exemple, de la mesure de la fluorescence chlorophyllienne qui a l'avantage d'être une technique non destructive. Associé à cela, nous retrouvons le dosage des pigments et des hexoses dans les feuilles. Ces approches permettent d'obtenir alors des « indicateurs de tolérance » et de compléter la vue d'ensemble de la réponse d'un clone au stress métallique (Pietrini *et al.*, 2010).

L'analyse génétique chez les espèces herbacées telles que *Thlaspi caerulescences* et *Arabidopsis halleri*, a permis de faire progresser nos connaissances quant aux gènes responsables de cette tolérance. Cependant, ce genre d'études est pratiquement absent chez les *Salicaceae* (Marmioli *et al.*, 2011) et dans le cadre de nos essais, nous avons développé une **approche protéomique**. Chez les ligneux, l'expression de protéines en réponse à la présence de métaux a déjà pu être testée chez le peuplier (Durand, 2009 ; Durand *et al.*, 2010a,b ; Kieffer *et al.*, 2008 ; 2009a, 2009b ; Villiers *et al.*, 2011) et, dans une moindre mesure, chez le saule (Landberg et Greger, 2004).

C'est pourquoi, dans ce chapitre, des paramètres phénotypiques mais également physiologiques et protéomiques des clones de saules sont étudiés. Deux autres critères, liés à la présence de saules sur un sol contaminé, sont également utiles pour caractériser les clones :

- Premièrement, les racines peuvent avoir une incidence sur la mobilisation des métaux dans le sol. Ceci peut être lié à la disponibilité des nutriments. Si ceux-ci sont peu disponibles, la plante libère des enzymes ou exsudats au niveau de la rhizosphère. La respiration racinaire acidifie le sol et influence également la disponibilité des éléments (Drénou, 2006). De cette manière, les métaux peuvent être également relâchés dans la phase mobile et être rendus disponibles pour la plante. D'une part, cette caractéristique peut privilégier l'absorption du métal par le végétal. D'autre part, elle pourrait augmenter le lessivage du métal si l'absorption n'est pas suffisamment rapide (Vervaeke *et al.*, 2004 ; Baum *et al.*, 2006 ; King *et al.*, 2006 ;

Suer and Andersson-Sköld, 2011). Peu de recherches ont été menées sur cette problématique chez les ligneux, contrairement aux herbacées.

- Deuxièmement, les métaux ont tendance à s'accumuler dans les feuilles par rapport aux tiges, rendant également possible une remobilisation des métaux lors de la restitution à la litière (Migeon *et al.*, 2009 ; Witters *et al.* 2009 ; Ruttens *et al.*, 2011 ; Pietrosanti *et al.*, 2009 ; Vervaeke *et al.*, 2004 ; Meers *et al.*, 2005 ;2007 ; French *et al.*, 2006). Qu'en est-il du transfert des métaux pour les clones de saules étudiés dans ce travail ? Pour répondre à cette question, les teneurs en métaux ont été dosés non seulement dans les tiges, mais également dans les feuilles.

Objectifs et Stratégies du chapitre 2

Les différents objectifs et stratégies sont repris de manière schématique dans la Figure III ci-dessous. Afin de mieux les situer au cours du chapitre 2, ce schéma sera repris avec les conclusions intermédiaires, avec, en surbrillance, l'objectif auquel nous répondons.

Objectifs d'un point de vue phénotypique

1. Sélectionner des saules selon les deux critères d'un « phytoextracteur idéal », à savoir, combinant une forte biomasse et de fortes teneurs en métaux.

Stratégie développée dans le point I : Criblage d'une série de saules sur base de la production de biomasse et des teneurs en métaux dans les tiges. Plusieurs clones ont été plantés dans un même substrat contaminé aux métaux (Expérience 2010).

2. Mesurer l'impact de la rhizosphère sur la mobilisation des métaux.

Stratégie développée dans le point I : Analyse des teneurs en métaux dans les lixiviats (Expérience 2010).

3. Calculer le transfert des métaux au sein des parties aériennes chez les forts producteurs de biomasse.

Stratégie développée dans le point II : Analyses des teneurs en métaux dans les tiges et les feuilles des forts producteurs de biomasse sélectionnés à l'issue du point I (Expérience 2011). Les clones ayant produit le plus de biomasse ont été de nouveau plantés dans le même substrat contaminé. La méthodologie de 2010 a été répétée.

Objectifs d'un point de vue physiologique et protéomique

1. Mesurer la tolérance des saules par une approche physiologique et protéomique.
 - Les individus les plus performants, en termes de biomasse, présentent-ils moins de signes de stress par rapport aux moins performants ?

Stratégie développée dans le point III: Comparaison des analyses physiologique et protéomique entre les clones à faible et forte production de biomasse sélectionnés à l'issue du point I.

Ce point est présenté sous forme d'article « *Physiological and proteomic responses of different willow clones (*Salix fragilis x alba*) exposed to dredged sediment contaminated by heavy metals* ».

2. Vérifier la tolérance d'un phytoextracteur potentiel d'un point de vue physiologique et protéomique.

Lors du criblage de 2010, le clone 47 (*Salix aurita*) a été mis en évidence car il présentait non seulement une forte production de biomasse, mais également les plus fortes teneurs en métaux.

- Présente-t-il pour autant des symptômes de stress par rapport à un fort producteur de biomasse tel que le clone 45 (*S. fragilis*) qui accumule moins de métaux ?

Stratégie développée dans le point IV : Comparaison des paramètres physiologique et protéomique mesurés chez ces deux clones après les avoir plantés dans un substrat artificiellement contaminé.

Ce point est présenté sous forme d'article : « *A multiple-level study of metal tolerance in *Salix fragilis* and *Salix aurita* clones* ». Dans cet article, le clone 47 est nommé *Salix aurita* et le clone 45, *Salix fragilis*.

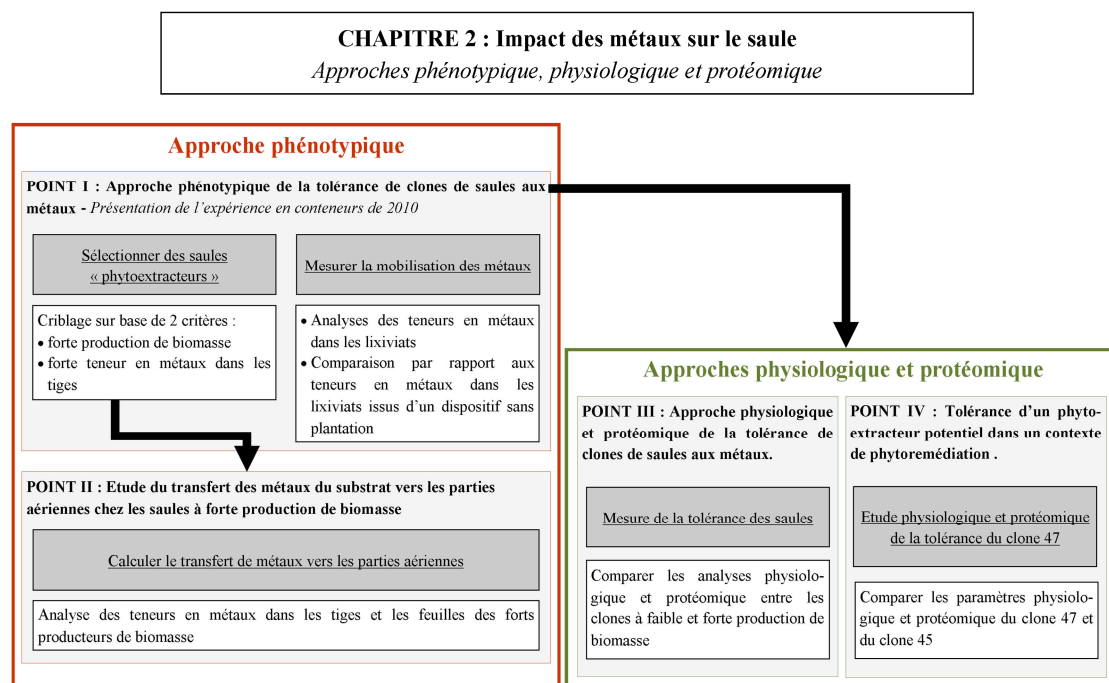


Figure III : Schéma des objectifs (fond gris) et stratégies (fond blanc) développés dans le chapitre 2 consacré à l'étude de la tolérance des clones de saules aux métaux en utilisant une approche phénotypique (encadré rouge) ainsi que des approches physiologique et protéomique (encadré vert).

I. Approche phénotypique de la tolérance de clones de saules aux métaux. Présentation l'expérience en conteneurs de 2010.

Les objectifs du point I (Figure III) sont de :

- Sélectionner des saules selon les deux critères d'un « phytoextracteur idéal », à savoir, combinant une forte biomasse et de fortes teneurs en métaux.
- Mesurer l'impact de la rhizosphère sur la mobilisation des métaux.

Une série de saules a été criblée sur base de la production de biomasse et des teneurs en métaux dans les tiges. Plusieurs clones ont été plantés dans un même substrat contaminé aux métaux. Les teneurs en métaux ont été analysées dans les lixiviats et comparées à celles dans les lixiviats issus d'un dispositif sans plantation.

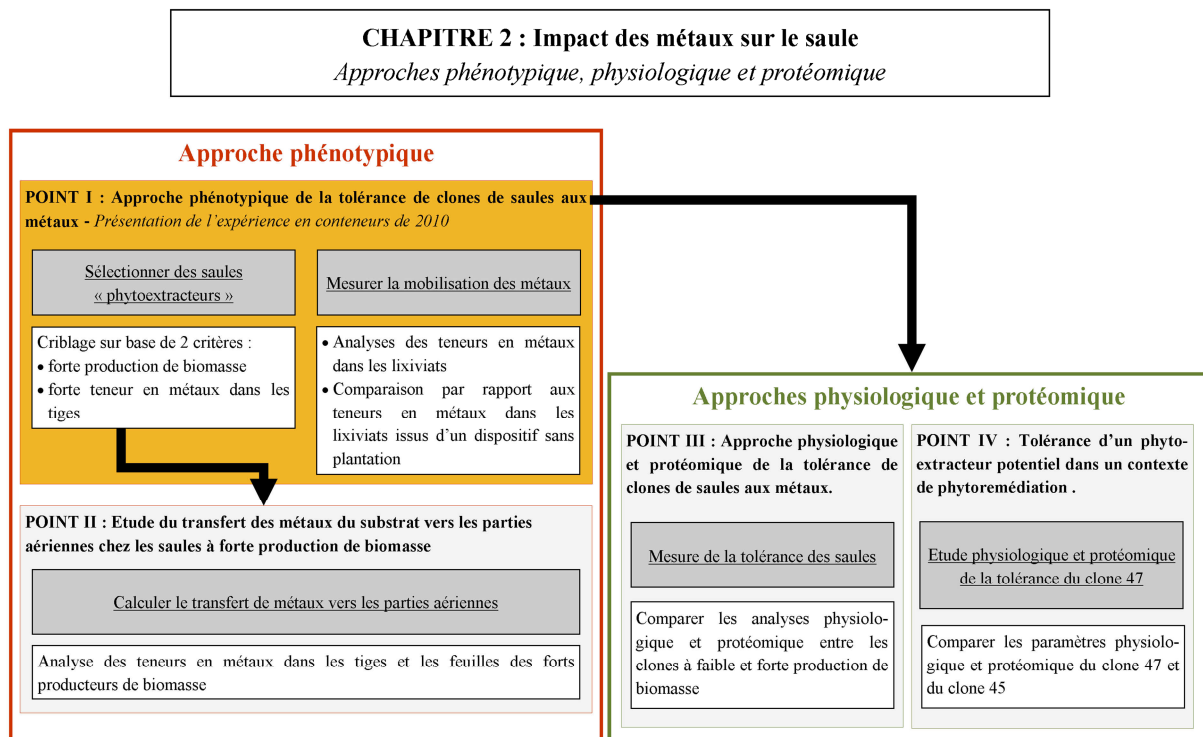


Figure III : Objectifs du point I (fond orange).

A. Matériel et méthode

Le matériel et les méthodes sont décrits en détails dans l'article « Physiological and proteomic responses of different willow clones (Salix fragilis x alba) exposed to dredged sediment contaminated by heavy metals » (point III). Nous reprenons brièvement ci-dessous les éléments essentiels avec quelques précisions complémentaires.

1. Matériel végétal et conditions de culture

Durant l'année précédant la plantation, les boutures de saule ont été préparées comme suit. En hiver, trois boutures à bois sec ont été prélevées sur 41 clones de saules de la collection LIRIS (Ecoliri 2004, CRA-W) (Wallonie, Belgique). La Figure V indique la provenance des clones. La liste des clones est présentée en annexe (Tableau III). Le but de cet essai est la sélection d'individus potentiellement intéressants en phytoremédiation, toutes espèces confondues. Dans ces essais, le facteur « espèce » n'a donc pas été pris en compte. Parmi les 23 clones identifiés, nous avons des hybrides *Salix alba x fragilis* (12), 4 *S. viminalis* et 5 *S. fragilis*. Le clone 47 appartient à l'espèce *S. aurita* et le clone 51 à *S. triandra*.

Ces boutures sont conservées jusqu'au printemps en chambre froide à 2°C dans un sachet et sont traitées au fongicide à large spectre. Au printemps, les boutures sont d'abord recoupées au niveau de la tête et de la base, pour obtenir une longueur de ± 20 cm, avant d'être insérées, sur la moitié de leur hauteur, dans un substrat composé de terreau et de sable (2v/1v). En mars 2010, les plants issus de ces boutures, ont été utilisées pour la plantation en conteneurs (Figure VI).

Tableau III : Ensemble des clones utilisés pour la plantation en conteneurs dans l'expérience de 2010 (point I).

Clone	Espèce	Origine
Liris 41	<i>Salix viminalis</i> (hermaphrodite)	Escaut, Obigies
Liris 42	<i>Salix viminalis</i> (mâle)	Escaut, Obigies
Liris 43	<i>Salix viminalis</i> (mâle)	Escaut, Obigies
Liris 44	<i>Salix viminalis</i> (mâle)	Escaut, Obigies
Liris 45	<i>Salix fragilis</i>	Escaut, Obigies
Liris 46	Non déterminé	Escaut, Obigies
Liris 47	<i>Salix aurita</i>	Escaut, Obigies
Liris 48	<i>Salix fragilis</i> (femelle)	Escaut, Obigies
Liris 49	Non déterminé	Escaut, Obigies
Liris 50	Non déterminé	Escaut, Obigies
Liris 51	<i>Salix triandra</i> (mâle)	Escaut, Obigies
Liris 107	<i>Salix fragilis x alba</i> (mâle)	Orneau, Corroy
Liris 108	<i>Salix fragilis x alba</i> (mâle)	Orneau, Corroy
Liris 111	<i>Salix fragilis</i> (femelle)	Orneau, Corroy
Liris 112	Identification incertaine	Orneau, Corroy
Liris 113	<i>Salix fragilis x alba</i>	Orneau, Corroy
Liris 114	<i>Salix fragilis</i>	Orneau, Corroy
Liris 115	Non déterminé	Orneau, Corroy
Liris 116	Identification incertaine	Orneau, Corroy
Liris 117	Non déterminé	Ligne, St Martin
Liris 118	Non déterminé	Ligne, St Martin
Liris 247	<i>Salix fragilis x alba</i> (mâle)	Trouille, Givry
Liris 248	Identification incertaine	Trouille, Givry
Liris 249	Non déterminé	Trouille, Givry
Liris 250	<i>Salix fragilis x alba</i> (femelle)	Trouille, Givry
Liris 251	<i>Salix fragilis x alba</i> (mâle)	Trouille, Givry
Liris 252	<i>Salix fragilis x alba</i> (mâle)	Trouille, Givry
Liris 253	Identification incertaine	Trouille, Givry
Liris 254	<i>Salix fragilis x alba</i> (mâle)	Trouille, Givry
Liris 255	<i>Salix fragilis x alba</i> (mâle)	Trouille, Givry
Liris 256	<i>Salix fragilis x alba</i>	Trouille, Givry
Liris 257	Non déterminé	Ture, Solre s/Sambre
Liris 258	<i>Salix fragilis</i> (femelle)	Ture, Solre s/Sambre
Liris 259	Non déterminé	Ture, Solre s/Sambre
Liris 260	Identification incertaine	Ture, Solre s/Sambre
Liris 261	Identification incertaine	Ture, Solre s/Sambre
Liris 262	Non déterminé	Ture, Solre s/Sambre
Liris 263	Identification incertaine	Ture, Solre s/Sambre
Liris 264	Identification incertaine	Ture, Solre s/Sambre
Liris 265	<i>Salix fragilis x alba</i> (femelle)	Ture, Solre s/Sambre
Liris 266	<i>Salix fragilis x alba</i> (femelle)	Ture, Solre s/Sambre

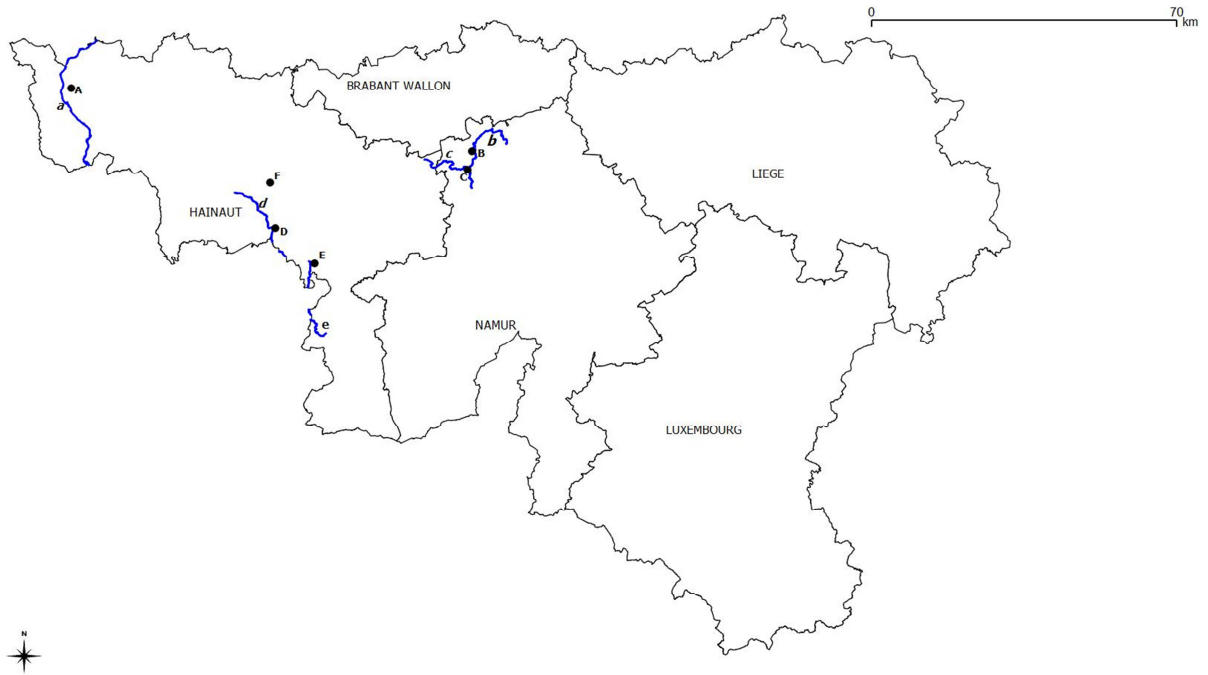
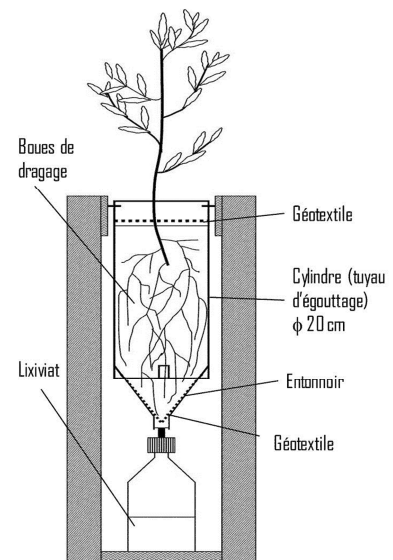


Figure V : Carte de la Wallonie (Belgique) sur laquelle sont représentés les cours d'eau non navigables (lettre minuscule) et les localités d'origine (lettre majuscule) des clones de saules LIRIS utilisés. Escaut, Obigies (a, A) ; Orneau, Corroy-Le-Château (b, B) ; Ligne, Saint-Martin (c,C) ; Trouille, Givry (d, D) ; Thure, Solre-Sur-Sambre (e, E). Le substrat utilisé dans le dispositif expérimental provient du site de dépôt d'Obourg (F) (Carte réalisée par A.Evlard avec le logiciel QGis).



Figures VI : A gauche : boutures enracinées de saules. A droite : schéma du conteneur.

Pour la plantation, des conteneurs, permettant la récolte des lixiviats, ont été élaborés (Figure VI) et disposés à l'extérieur (Gembloux, Belgique). Des boues de dragage du canal du Centre (Belgique) ont été utilisées comme substrat afin de bénéficier d'une contamination historique et d'un équilibre physico-chimique installé depuis au moins dix ans dans le sédiment. Ces boues déversées sur le site d'Obourg, proviennent essentiellement de dragages du canal du Centre, entre Thieu et Mons, depuis les années '80 jusqu'en 1994. D'après le rapport d'étude du terrain d'Obourg (2000), la zone la plus contaminée en métaux se situe au sud du site (la zone 6 (F 60) sur la Figure VII). Le substrat a été prélevé à cet endroit.

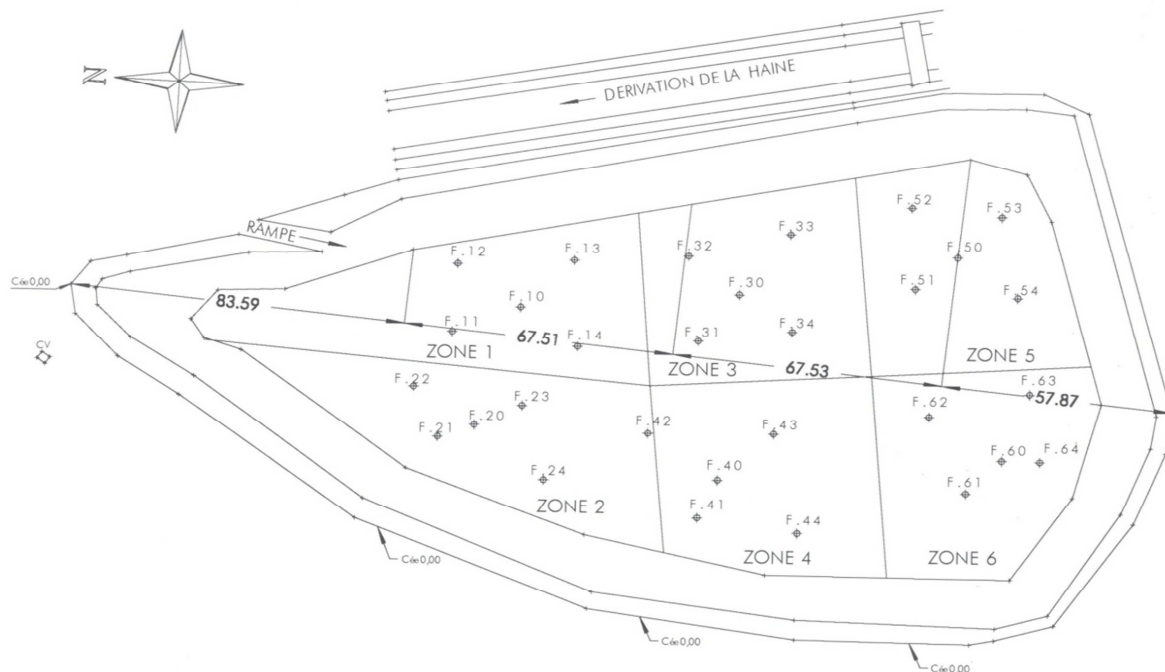


Figure VII : Plan général du site de dépôt de produits de dragage (Obourg, Belgique). Implantation des forages sur le terrain d'Obourg (n°26), Maisières (Mons, Belgique). 7 juillet 2000 (Laboratoire de Recherches Hydrauliques, Ministère wallon de l'équipement et des transports).

Une analyse des teneurs totales en métaux a toutefois été répétée après homogénéisation d'un petit volume de substrat. Ensuite, le volume nécessaire pour la plantation a été collecté sur une profondeur de sol allant de 10 à 50 cm à partir de la surface, en ôtant un maximum de racines. Une fois rapporté au Laboratoire de Toxicologie environnementale, le substrat a été mélangé par déplacements successifs du tas et analysé pour ce qui concerne les teneurs totales en métaux, en éléments nutritifs. La capacité d'échange cationique (CEC) et la disponibilité en métaux ont été mesurées (Tableaux IV et V). Les méthodes d'analyses ainsi que les résultats sont visibles dans l'article « *Physiological and proteomic responses of different willow clones (Salix fragilis x alba) exposed to dredged sediment contaminated by heavy metals* » présenté dans le point III.

Le substrat présente un pH relativement neutre. La teneur en matière organique (342.2 g.kg⁻¹ m.s.) est élevée en comparaison à celle d'un sol agricole standard (10 g.kg⁻¹m.s.) ou dans l'humus (500 g.kg⁻¹m.s.). Le rapport C/N est proche de 50. Ces résultats indiquent une fraction organique faiblement dégradée principalement composée de carbone organique. La teneur en calcium est également très élevée lorsqu'on la compare à un sol agricole standard (5g.kg⁻¹m.s.). Nous pouvons remarquer des teneurs en zinc et en plomb importantes dans le substrat. Aussi, certains éléments (Cr, Fe) sont faiblement disponibles par rapport à d'autres (Cd, Pb) dont la fraction disponible représente plus de 50% de leur teneur totale. Le pH, la CEC (47 cmolc.kg⁻¹ m.s.) ainsi que les fortes teneurs en matière organique et en calcium indiquent une faible mobilité des éléments dans le substrat.

Tableau IV : Teneurs totales et disponibles en métaux (-aloïdes) (mg.kg⁻¹ matière sèche) dans le substrat. Entre parenthèses, la disponibilité relative des éléments.

	Cd	Cu	Zn	Ni	Pb	Co	As	Cr	Mn	Fe
Total ¹	3.2	82.7	1200	40	333	20.2	20.5	68	640	27100
Disponible ²	1.83 (57%)	33.7 (41%)	451 (38%)	3.2 (8%)	184 (55%)	1.7 (8%)	0.49 (2%)	0.4 (0.6%)	114 (18%)	760 (0.03%)

¹ Digestion à l'aqua regia ; ² Extraction avec 0.5 N NH₄OAc, 0.5 N HOAc, 0.02 M EDTA, pH 4.65.

Tableau V: Analyse chimique du substrat. Entre parenthèses, la disponibilité relative des éléments. Les teneurs sont exprimées en g.kg⁻¹ de matière sèche.

	K ₂ O (g.kg ⁻¹)	CaO (g.kg ⁻¹)	MgO (g.kg ⁻¹)	Na ₂ O (g.kg ⁻¹)	P ₂ O ₅ (g.kg ⁻¹)	N (g.kg ⁻¹)	C _{org} (g.kg ⁻¹)	pH (H ₂ O)
Total	3.9 ¹	73.9 ¹	5.4 ¹	0.7 ¹	3.2 ³	5.3 ⁴	261.8 ⁵	7.4
Disponible	0.5 ² (11.4%)	67.2 ² (91%)	0.5 ² (8.6%)	0.08 ² (11.4%)	0.09 (2.8%)	-	-	-

¹ Digestion à l'aqua regia (HCl and HNO₃) ; ² Extraction avec 0.5 N NH₄OAc, 0.5 N HOAc, 0.02 M EDTA, pH 4.65.

³ Méthode spectrométrique au molybdate d'ammonium (NF EN ISO 6878 :2005) après digestion à l'aqua regia (NFEN ISO 6878:2005) ; ⁴ Méthode de Kjeldahl modifiée (ISO11261:1995) ; ⁵ Oxydation sulfochromique (ISO 14235:1998).

Au total, l'expérience comptait 129 conteneurs (Figure VIII). Dans 9 d'entre eux, aucun saule n'a été planté (non planté, NP). L'expérience a débuté en mars et s'est terminée en octobre 2010. Durant cette période, les 129 conteneurs ont été arrosés à l'eau de ville. L'arrosage se faisait généralement tous les 15 jours mais pouvait varier en fonction des conditions météorologiques. Les lixiviats étaient récoltés dans des bidons afin d'éviter une trop longue saturation du substrat en eau et une dernière fois, en fin d'essai, avant la récolte des tiges (octobre 2010).



Figure VIII : Vue d'ensemble de l'expérience en conteneurs. En dessous de ceux-ci, ont été installés des bidons afin de récolter les lixiviats (Photos : A. Evlard).

2. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental a été déterminé avec l'aide de l'Unité de Statistique, Informatique et Mathématique appliquées (Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège, Belgique).

Les conteneurs ont été disposés entre les laboratoires de Toxicologie environnementale et de la Biologie Végétale (Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège, Belgique) et en dessous d'un couvert végétal (érables et platanes). La couverture végétale a permis de limiter l'assèchement du substrat en période d'intense soleil.

Afin d'assurer un contrôle de l'hétérogénéité, liée à l'exposition du domaine expérimental, l'ensemble des conteneurs ont été répartis selon un dispositif en pseudo-carré latin. Ce dispositif a permis un double contrôle d'hétérogénéité, dans le sens des trois lignes et dans le sens des trois colonnes. Enfin, ce pseudo-carré latin était équilibré, car chaque clone, à l'aide de trois réplicats, a été disposé une fois dans chaque bloc-ligne et chaque bloc-colonne. Grâce à cela, bien qu'un gradient de luminosité ait pu être mis en évidence, les moyennes observées correspondent à la meilleure estimation de la biomasse d'un clone sur l'ensemble du dispositif expérimental.

3. Récolte de la biomasse et analyse en métaux

L'aspect matériel et méthode est repris de manière complète dans le point III mais la méthodologie pour la récolte est reprise brièvement ici afin de faciliter la compréhension des résultats présentés.

Les pousses annuelles ont été récoltées en octobre 2010, après une période de croissance de 225 jours. Les tiges ont été brièvement lavées à l'eau déminéralisée, séchées et pesées. Pour cette première expérience, les feuilles avaient été récoltées peu avant la fin de l'essai et stockées à -80°C pour les dosages de sucres et les analyses protéomiques (cf. point III).

4. Analyse statistique

L'Analyse de la Variance à un facteur (One-Way ANOVA) a été utilisée avec, comme variables, la biomasse et les teneurs en métaux des tiges et, comme facteur fixe, le clone. Lorsque l'ANOVA a indiqué une différence significative entre les clones, le test de comparaison des moyennes de Gupta a été utilisé comme structuration de moyennes. Le principe du test de Gupta est repris en détails dans le point III. Brièvement, il s'agit d'un test permettant de distinguer les groupes de clones selon la biomasse produite et les teneurs en métaux des tiges. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Minitab v.16.2.2.

B. Résultats

Les résultats de biomasse complets figurent dans l'article du point III et sont résumés ci-dessous. Cependant, les résultats d'analyses en métaux pour l'ensemble des clones plantés en conteneurs sont repris afin de faciliter la compréhension des liens avec les points II, III et IV.

1. Survie et croissance des clones de saules en milieu contaminé aux métaux

Seuls 26 des 41 clones de saules (Tableau III) ont pu être étudiés (Figure IX). En effet, 14 clones ont été ôtés du dispositif dès qu'un des réplicats ne survivait pas afin de ne pas biaiser l'équilibre du pseudo-carré latin. Il est cependant intéressant de souligner que l'ensemble des réplicats des clones 42, 43 et 248 sont morts au cours de l'expérience. La production de biomasse varie selon le clone et le test de comparaison des moyennes de Gupta indique que les clones « forts producteurs de biomasse » sont les clones 46, 50, 108 et 111 (Figure IX). Ce sont ces clones, nommés HBP (pour high biomass producer), qui ont été investigués dans les études physiologiques et protéomiques (point III).

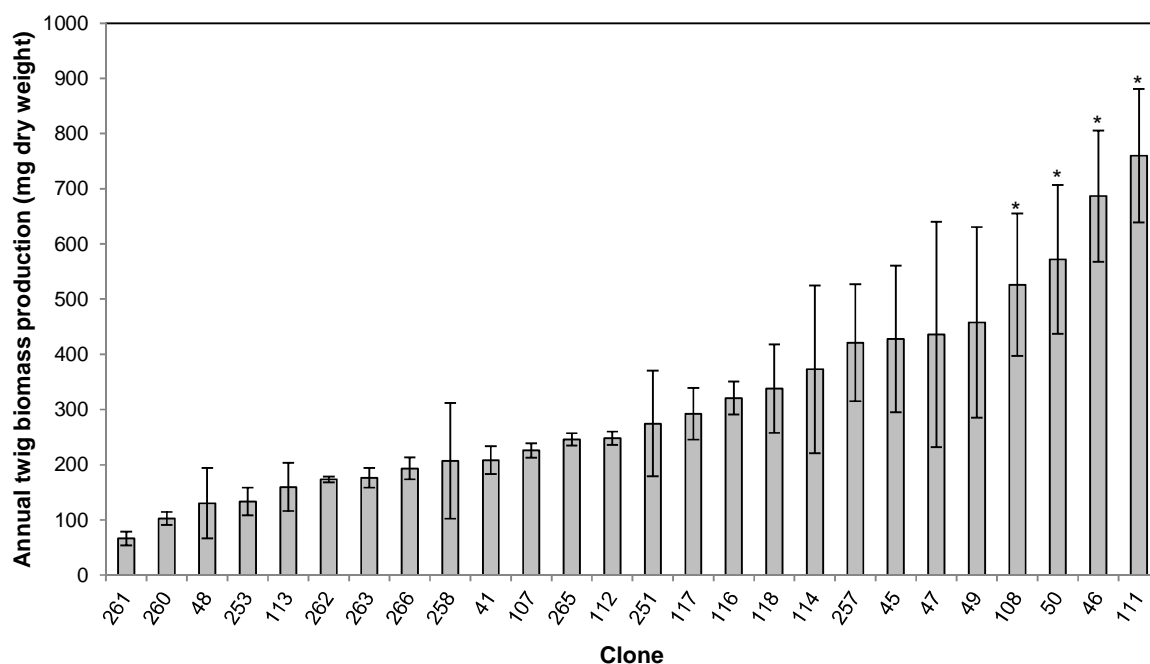


Figure IX : Production de biomasse des tiges annuelles par les clones de saules dans un substrat contaminés aux métaux. Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne (SE). Les astérisques indiquent les clones déterminés comme « forts producteurs de biomasse » (HBP) par le test de comparaison des moyennes de Gupta.

2. Teneurs en métaux dans les tiges annuelles et lixiviats de l'ensemble des clones étudiés

2.1 Teneurs en métaux dans les tiges annuelles

Il existe une grande variation inter-clonale des teneurs en métaux dans les tiges annuelles (Figure X). Pour plus de clarté, les clones, en abscisses, sont classés en fonction du rendement croissant en biomasse.

Le fer et le manganèse ne sont pas des ETM mais des éléments majeurs constituant la croûte terrestre. Toutefois, ces métaux ont été dosés dans les tiges car ils constituent des éléments essentiels pour la croissance.

Plusieurs observations ont pu être mises en évidence :

- Les teneurs en cuivre, en fer, en cobalt et en plomb sont plus importantes chez les clones à production de biomasse plus faible.
- Le clone 47 (*Salix aurita*) présente de fortes teneurs en métaux sauf pour le cuivre et le fer. Toutefois, ce clone se démarque des autres bien qu'il n'ait pas accumulé de manière significative le plomb.
- Les teneurs en manganèse, en nickel, en cadmium et en zinc ne semblent pas dépendre des résultats en biomasse et sont très variables d'un clone à l'autre.

2.2 Teneurs en métaux dans les lixiviats

Le lessivage des métaux ne varie pas d'un clone à un autre et les teneurs en métaux ne diffèrent pas de celles des conteneurs « sans plantation » (NP).

Les lixiviats contiennent très peu de métaux (Tableau VI). En moyenne, 0.07 ‰ Cu, 0.02 ‰ Fe, 0.07 ‰ Mn, 0.04 ‰ Cd, 0.02 ‰ Zn, 0.2‰ Ni, 0.03 ‰ Co et <0.0002 ‰ Pb, présents au départ dans le substrat, ont été lessivés. Il est donc possible de considérer que les teneurs en métaux dans le substrat soient stables sur la période de croissance. Ces résultats sur les lixiviats concordent avec les analyses de la matière organique et de la CEC (47 cmolc.kg⁻¹ m.s.) indiquant une assez forte rétention potentielle des éléments, bien que la fraction biodisponible mesurée sur le substrat indique une potentielle mobilité des métaux (Tableaux IV et V).

Partant du fait que les métaux sont restés stables dans le substrat durant l'essai, le facteur de bioconcentration (BCF) des tiges peut être calculé (Tableau VII). Le BCF, ou le ratio des concentrations en métaux plant/substrat, donne des informations complémentaires sur le transfert des métaux du substrat vers les différentes parties de la plante (Rosselli *et al.*, 2003 ; Zacchini *et al.*, 2009 ; Dickinson et Pulford, 2005, Cecchi, 2008).

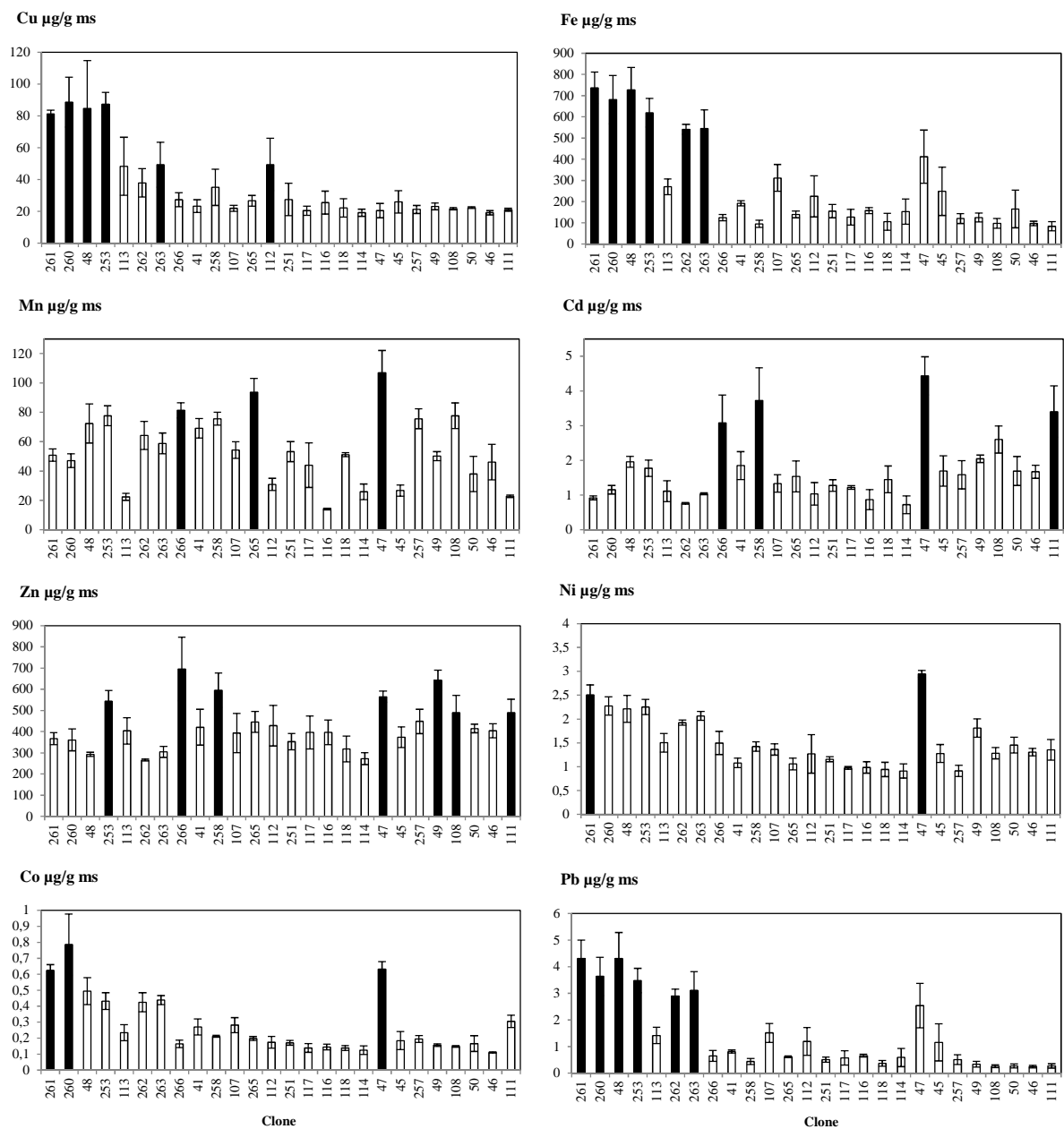


Figure X : Teneurs en métaux ($\mu\text{g.g}^{-1}$ matière sèche) dans les tiges annuelles des saules ayant poussé sur un substrat contaminé aux métaux. Les rectangles à fond noir sont les clones pour lesquels la teneur en un métal donné est la plus élevée (selon le test de comparaison des moyennes de Gupta). Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne (SE).

Tableau VI : Lixiviation des métaux (en ‰) calculée sur base du rapport [quantité en métaux présente dans le lixiviat /la quantité en métaux de départ dans le conteneur].

Clone	Cu	± SE	Fe	± SE	Mn	± SE	Cd	± SE	Zn	± SE	Ni	± SE	Co	± SE	Pb	± SE
41	0,106	0,001	0,037	0,002	0,016	0,008	0,042	0,005	0,036	0,000	0,362	0,002	0,033	0,003	0,000085	0,000018
45	0,075	0,008	0,028	0,004	0,041	0,030	0,034	0,003	0,029	0,004	0,276	0,036	0,028	0,002	0,000057	0,000024
46	0,108	0,024	0,033	0,005	0,003	0,002	0,048	0,011	0,030	0,005	0,318	0,059	0,026	0,002	0,000055	0,000009
47	0,062	0,023	0,021	0,008	0,016	0,015	0,026	0,011	0,021	0,008	0,208	0,079	0,022	0,009	0,000060	0,000012
48	0,079	0,025	0,030	0,010	0,027	0,008	0,035	0,009	0,029	0,008	0,281	0,091	0,029	0,010	0,000047	0,000011
49	0,053	0,007	0,022	0,005	0,092	0,043	0,027	0,008	0,022	0,003	0,214	0,051	0,030	0,010	0,000036	0,000010
50	0,035	0,017	0,013	0,006	0,018	0,015	0,018	0,009	0,013	0,007	0,141	0,067	0,015	0,008	0,000035	0,000014
107	0,058	0,010	0,021	0,004	0,050	0,033	0,038	0,008	0,024	0,003	0,205	0,048	0,021	0,004	0,000036	0,000009
108	0,070	0,018	0,024	0,006	0,021	0,015	0,040	0,012	0,026	0,009	0,227	0,059	0,023	0,007	0,000073	0,000013
111	0,083	0,015	0,028	0,001	0,110	0,053	0,056	0,019	0,028	0,003	0,276	0,032	0,036	0,008	0,000116	0,000085
112	0,033	0,016	0,013	0,006	0,014	0,009	0,016	0,008	0,012	0,006	0,113	0,067	0,013	0,008	0,000045	0,000027
113	0,104	0,008	0,036	0,004	0,102	0,071	0,054	0,022	0,039	0,008	0,335	0,018	0,040	0,008	0,000260	0,000178
114	0,071	0,035	0,022	0,012	0,019	0,015	0,032	0,016	0,024	0,012	0,190	0,100	0,020	0,011	0,000176	0,000152
116	0,089	0,010	0,030	0,002	0,090	0,084	0,041	0,009	0,032	0,006	0,250	0,027	0,030	0,006	0,000132	0,000110
117	0,086	0,022	0,027	0,007	0,044	0,044	0,044	0,008	0,025	0,007	0,229	0,058	0,027	0,010	0,000125	0,000104
118	0,035	0,020	0,012	0,006	0,067	0,033	0,026	0,013	0,015	0,008	0,103	0,052	0,014	0,006	0,000033	0,000013
251	0,015	0,010	0,006	0,004	0,011	0,009	0,014	0,013	0,008	0,006	0,056	0,042	0,006	0,004	0,000015	0,000007
253	0,056	0,017	0,017	0,002	0,434	0,359	0,041	0,004	0,023	0,003	0,160	0,014	0,044	0,023	0,000030	0,000011
257	0,082	0,003	0,026	0,002	0,026	0,014	0,038	0,008	0,027	0,002	0,238	0,011	0,025	0,002	0,000132	0,000068
258	0,053	0,025	0,017	0,008	0,011	0,009	0,017	0,008	0,014	0,006	0,151	0,074	0,016	0,008	0,000111	0,000087
260	0,083	0,018	0,028	0,004	0,234	0,108	0,058	0,017	0,034	0,006	0,297	0,053	0,051	0,011	0,000168	0,000131
261	0,044	0,021	0,015	0,007	0,067	0,043	0,034	0,017	0,021	0,010	0,138	0,068	0,017	0,007	0,000042	0,000025
262	0,112	0,038	0,025	0,007	0,023	0,013	0,046	0,012	0,029	0,005	0,221	0,043	0,020	0,003	0,000067	0,000006
263	0,076	0,025	0,026	0,008	0,057	0,006	0,041	0,008	0,028	0,007	0,236	0,076	0,026	0,009	0,000233	0,000208
265	0,063	0,013	0,025	0,005	0,109	0,099	0,043	0,024	0,024	0,006	0,201	0,019	0,032	0,011	0,000052	0,000005
266	0,031	0,016	0,010	0,004	0,034	0,019	0,036	0,018	0,014	0,009	0,098	0,055	0,012	0,005	0,000013	0,000005
NP	0,076	0,019	0,022	0,006	0,047	0,025	0,055	0,019	0,024	0,006	0,214	0,056	0,022	0,006	0,000074	0,000022

Tableau VII : Facteur de bioconcentration (BCF) des clones de saules plantés en conteneurs. BCF = teneur en métal dans les tiges de la plante ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{m.s.}$)/teneur en métal dans le substrat ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{m.s.}$).

Clone	Cu	$\pm SE$	Fe	$\pm SE$	Mn	$\pm SE$	Cd	$\pm SE$	Zn	$\pm SE$	Ni	$\pm SE$	Co	$\pm SE$	Pb	$\pm SE$
261	0,98	0,03	0,03	0,00	0,08	0,01	0,29	0,02	0,31	0,02	0,06	0,01	0,03	0,00	0,01	0,00
260	1,07	0,19	0,03	0,00	0,07	0,01	0,36	0,04	0,30	0,04	0,06	0,00	0,04	0,01	0,01	0,00
48	1,02	0,36	0,03	0,00	0,11	0,02	0,61	0,05	0,24	0,01	0,06	0,01	0,02	0,00	0,01	0,00
253	1,06	0,09	0,02	0,00	0,12	0,01	0,55	0,07	0,45	0,04	0,06	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00
113	0,58	0,22	0,01	0,00	0,03	0,00	0,35	0,09	0,34	0,05	0,04	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
262	0,46	0,11	0,02	0,00	0,10	0,02	0,24	0,01	0,22	0,00	0,05	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00
263	0,60	0,17	0,02	0,00	0,09	0,01	0,32	0,01	0,25	0,02	0,05	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00
266	0,33	0,05	0,00	0,00	0,13	0,01	0,96	0,25	0,58	0,13	0,04	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
41	0,28	0,05	0,01	0,00	0,11	0,01	0,58	0,13	0,35	0,07	0,03	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
258	0,43	0,14	0,00	0,00	0,12	0,01	1,17	0,29	0,50	0,07	0,04	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
107	0,27	0,02	0,01	0,00	0,08	0,01	0,42	0,08	0,33	0,08	0,03	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
265	0,32	0,04	0,01	0,00	0,15	0,01	0,48	0,14	0,37	0,04	0,03	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
112	0,60	0,20	0,01	0,00	0,05	0,01	0,32	0,10	0,36	0,08	0,03	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
251	0,33	0,12	0,01	0,00	0,08	0,01	0,40	0,05	0,29	0,03	0,03	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
117	0,25	0,04	0,00	0,00	0,07	0,02	0,38	0,02	0,33	0,07	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
116	0,31	0,09	0,01	0,00	0,02	0,00	0,27	0,09	0,33	0,05	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
118	0,27	0,07	0,00	0,00	0,08	0,00	0,45	0,12	0,27	0,05	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
114	0,23	0,03	0,01	0,00	0,04	0,01	0,23	0,08	0,23	0,02	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
47	0,25	0,05	0,02	0,00	0,17	0,02	1,39	0,17	0,47	0,02	0,07	0,00	0,03	0,00	0,01	0,00
45	0,31	0,09	0,01	0,00	0,04	0,01	0,53	0,14	0,31	0,04	0,03	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
257	0,26	0,03	0,00	0,00	0,12	0,01	0,50	0,13	0,37	0,05	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
49	0,28	0,03	0,00	0,00	0,08	0,00	0,64	0,03	0,54	0,04	0,05	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
108	0,26	0,01	0,00	0,00	0,12	0,01	0,81	0,12	0,41	0,07	0,03	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
50	0,27	0,01	0,01	0,00	0,06	0,02	0,53	0,13	0,35	0,02	0,04	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
46	0,23	0,02	0,00	0,00	0,07	0,02	0,52	0,06	0,34	0,03	0,03	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
111	0,25	0,01	0,00	0,00	0,04	0,00	1,06	0,23	0,41	0,05	0,03	0,01	0,02	0,00	0,00	0,00

C. Discussion sur le point I

L'expérience de 2010 a permis de trier les clones de saules selon leur production de biomasse en milieu contaminé aux métaux (Figure IX). Quatre clones ont été classés comme forts producteurs de biomasse. Il s'agit des clones 46, 50, 108 et 111. Les clones ayant les plus fortes teneurs en métaux dans les tiges annuelles ont également été mis en évidence (Figure X). Les résultats indiquent que les clones à plus forte biomasse ne sont pas ceux ayant les plus fortes teneurs en métaux, mis à part le clone 111 pour le cadmium. Au contraire, les clones ayant produit le moins de biomasse sont ceux pour lesquels les teneurs en cuivre, fer, cobalt et plomb sont les plus importantes. Dans le cas du cadmium, zinc, nickel et manganèse, il n'y a pas de distinction claire entre les forts et les faibles producteurs de biomasse, ce qui indique plutôt que les teneurs en ces métaux ne suivent pas le critère de production de biomasse. Greger et Landberg (2001) rapportent des résultats similaires pour le saule. Le clone 47 se différencie des autres clones par des teneurs plus importantes en métaux par rapport aux autres.

Cadmium et plomb

Le cadmium et le plomb ne sont pas des éléments essentiels et sont même toxiques à très faibles doses. Les valeurs des teneurs en métaux observées dans les tiges sont compatibles avec celles présentées dans la plupart d'autres essais menés sur le saule. La littérature indique des teneurs en cadmium inférieures à $5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s., comme dans notre essai (Tableau I ; Mleczek *et al.*, 2009 ;2010). Pulford *et al.* (2002) rapportent la présence de 2.5 et $20.6 \mu\text{g Cd}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s. selon la variété du clone et la partie de la branche (écorce, bois). King *et al.* (2006) ont mesuré le cadmium chez plusieurs hybrides de saule de 3 ans plantés sur un terrain contaminé et rapportent une concentration moyenne de $10.5 \pm 1.51 \mu\text{g}\cdot(\text{g m.s.})^{-1}$. Meers *et al.* (2007) ont pu mettre en évidence 3 espèces de saules (*S. dasyclados* 'Loden', *S. fragilis* 'Belgisch Rood', *S. schwerinii* 'Christina') accumulant de manière plus importante le cadmium (entre 10 et $40 \mu\text{g Cd}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s. selon la contamination du sol). Ruttens *et al.*, 2011 rapportent des valeurs pouvant varier entre 6 et $30 \mu\text{g Cd}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s. selon la variété. En hydroponie, les teneurs des parties aériennes pouvaient atteindre 400 à $900 \mu\text{g Cd}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s. (Zacchini *et al.*, 2009). Dans leur étude, Pugh *et al.* (2002) comparent les teneurs des tiges de saule à celles évaluées comme phytotoxiques par Levy *et al.* (1999) sur *Andropogon gerardii* Vitman et *Panicum virgatum* L. Selon ces auteurs, les concentrations non phytotoxiques (dites « normales » selon Pugh *et al.*, 2002) sont comprises entre 0.05 et $2 \mu\text{g Cd}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s. et celles phytotoxiques varient entre 5 et $700 \mu\text{g Cd}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s. Pugh *et al.* (2002) citent également Balsberg-Pahlsson (1989) qui situent les valeurs phytotoxiques entre 5 et $10 \mu\text{g Cd}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s. chez certaines espèces de *Picea*, *Alnus* et *Quercus*. Dans nos essais, les teneurs comprises entre 3 et $5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s. retrouvées chez certains clones se pourraient dès lors avoir induit des troubles physiologiques.

En ce qui concerne le plomb, [Meers et al. \(2005\)](#) et [Vervaeke et al. \(2003\)](#) indiquent des teneurs allant de 1.6 à 12.7 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s. alors que [Stals et al. \(2010\)](#) et [Ruttens et al. \(2011\)](#) rapportent des valeurs proches de 30 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s. Les concentrations en plomb ne présentant pas de signes de toxicité chez la plante sont comprises entre 0.5 et 10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s mais celles comprises entre 30-300 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s. sont, quant à elles, phytotoxiques ([Levy et al., 1999 dans Pugh et al., 2002](#)). Dans notre essai, les plus fortes teneurs (comprises entre 3 et 4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s.) ne seraient dès lors pas phytotoxiques mais pourraient, comme pour le cadmium, induire des troubles au niveau physiologique.

Zinc, cuivre, fer et manganèse

Le fer et le manganèse sont des éléments majeurs constituant la croûte terrestre alors que le zinc et le cuivre sont des ETM (cf. chapitre 1). Ces quatre métaux sont essentiels pour la croissance de la plante mais deviennent phytotoxiques en fortes concentrations. Les teneurs « normales » chez la plante varient entre 1 et 400 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s. pour le zinc et 3 et 30 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s pour le cuivre ([Pugh et al., 2002](#) ; [Kabata-Pendias et Pendias dans Vervaeke et al. 2003](#)). Des essais menés sur le saule indiquent des concentrations en zinc variant entre 40 et 500 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s. ([Tableau I](#) ; [Pulford et al., 2002](#) ; [Mleczek et al., 2009](#) ; [2010](#)) et celles en cuivre relativement faibles (10 et 30 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s.) ([Greger et al., 1999](#) ; [Pulford, 2002](#) ; [Rosselli, 2003](#) ; [Vervaeke et al., 2003](#) ; [Meers, 2005](#) ; [French et al., 2006](#) ; [King et al., 2006](#) ; [Mleczek et al., 2010](#)). [Dickinson \(2000\)](#) et [Stals et al. \(2010\)](#), quant à eux, indiquent des concentrations en cuivre allant de 100 à 800 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s. La plupart des clones étudiés ici présentent donc des teneurs que l'on peut retrouver dans la littérature.

Toutefois, les clones sélectionnés selon le test de Gupta présentent des teneurs en zinc (> 500 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s.) et en cuivre (50-80 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s.) supérieures aux teneurs normales déterminées dans [Pugh et al. \(2002\)](#). Bien que le cuivre et le zinc soient essentiels pour la plante, les concentrations plus importantes retrouvées chez ces clones pourraient avoir une incidence au niveau physiologique.

[Alvarez et al. \(2003\)](#) rapportent des teneurs en fer proches de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s. chez *Salix atrocinerea*. Ces auteurs indiquent que celles-ci, par comparaison aux valeurs définies par [Kabata-Pendias et Pendias \(1984\)](#) sont au-dessus des teneurs suffisantes (50 – 250 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s.) mais normales pour [Larcher \(1995\)](#) (2–700 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s.). Les concentrations naturelles en fer dans la plante selon [Levy et al. 1999 dans Pugh et al., \(2002\)](#) sont comprises entre 30 et 300 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s. et phytotoxiques au-delà de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s. Partant de ces comparaisons, les teneurs en fer dans les tiges des saules de notre essai sont normales et non phytotoxiques. Toutefois, les clones sélectionnés selon le test de Gupta présentent des teneurs en fer proches des valeurs phytotoxiques.

[Alvarez et al. \(2003\)](#) rapportent, toujours chez *S. atrocinerea*, des teneurs en manganèse autour de 400 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s. et classent celles-ci comme phytotoxiques par rapport aux valeurs définies par [Kabata-Pendias et Pendias \(1984\)](#) (300 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s.). D'autres essais indiquent des concentrations en manganèse allant de 0 à 80 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s. ([Zalesny et al., 2007](#) ; [Migeon et al., 2009](#) ; [Arik & Yaldiz, 2010](#)) voire jusqu'à 2 701 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s. en conditions contrôlées ([Shanahan, 2007](#)).

Dans notre essai, les teneurs en manganèse sont inférieures à celles phytotoxiques dans Alvarez *et al.* (2003) et peuvent être considérées comme normales, non phytotoxiques.

L'antagonisme dans l'absorption du fer et du manganèse a souvent été rapporté (Vizier, 1990). Alvarez *et al.* (2003) expliquent que le fer et le manganèse sont impliqués dans des processus métaboliques et doivent être présents dans certaines proportions. Le ratio Fe/Mn dans les tissus végétaux doit être compris entre 1.5 et 2.5. Ces auteurs ont pu mettre en évidence une interaction entre le fer et le manganèse variable entre des ligneux et des herbacées issus d'un site contaminé. Les ligneux ont montré une préférence pour le manganèse (ratio < 1.5) alors que les herbacées préfèrent le fer (ratio >2.5). Les valeurs du ratio Fe/Mn ont été calculées afin de déterminer les interactions entre ces deux éléments pour les saules étudiés dans notre essai (Tableau VIII). Contrairement à ces auteurs, nos résultats indiquent que la majorité des clones absorbent davantage le fer que le manganèse avec des ratios les plus élevés pour les plus faibles producteurs de biomasse. Les clones 108, 257, 258, 265 et 266, quant à eux, indiquent, au contraire, une « affinité » pour le manganèse avec des ratios de 1.2 ou 1.5.

Il existe une forte compétitivité entre le fer et le manganèse à l'interface sol-racines et un déséquilibre dans l'absorption de ces éléments est visible (Vizier, 1990). Dans notre essai, ce déséquilibre n'a pas entraîné de carence en manganèse chez les faibles producteurs de biomasse alors que l'accumulation en fer approchait la phytotoxicité. L'accumulation en fer peut être expliquée par la teneur en fer très élevée du substrat par rapport à celle du manganèse (Van der Vorm *et al.*, 1979 dans Vizier, 1990).

Tableau VIII : Ratio des teneurs en fer et en manganèse dans les tiges annuelles des saules plantés en substrat contaminé (expérience de 2010).

Clone	Fe/Mn	$\pm SE$
261	14,5	$\pm 0,6$
260	14,8	$\pm 3,1$
48	10,3	$\pm 1,3$
253	7,9	$\pm 0,3$
113	12,0	$\pm 0,9$
262	8,8	$\pm 1,2$
263	9,2	$\pm 0,8$
266	1,5	$\pm 0,1$
41	2,8	$\pm 0,1$
258	1,2	$\pm 0,2$
107	5,7	$\pm 0,7$
265	1,5	$\pm 0,3$
112	8,6	$\pm 4,9$
251	2,9	$\pm 0,2$
117	5,7	$\pm 4,1$
116	11,1	$\pm 0,6$
118	2,1	$\pm 0,8$
114	7,8	$\pm 4,6$
47	3,7	$\pm 0,7$
45	8,7	$\pm 2,9$
257	1,6	$\pm 0,2$
49	2,5	$\pm 0,5$
108	1,2	$\pm 0,2$
50	3,9	$\pm 1,0$
46	2,5	$\pm 0,7$
111	3,6	$\pm 0,8$

Nickel et cobalt

Le nickel et le cobalt sont également essentiels pour le développement de la plante. Le nickel est généralement facilement absorbé par les racines et se retrouve dans tous les tissus à des teneurs variant entre 0.05 et 5.0 $\mu\text{g.g}^{-1}$ m.s. C'est un composant de l'uréase, une enzyme qui transforme l'urée en ammonium. Bien qu'il soit très important pour le métabolisme azoté, ce métal n'est nécessaire qu'en très faibles quantités (Hopkins, 2003). Dans cet essai, les saules montrent de faibles teneurs en nickel ($< 2.70 \mu\text{g.g}^{-1}$ m.s.) comme chez Meers *et al.* (2005), French *et al.* (2006), Vamerali *et al.* (2009) et Arik & Yaldiz (2010). Néanmoins les travaux de Pulford *et al.* (2002) et Arik & Yaldiz (2010) ont montré des teneurs plus importantes (de 2.7 à 31.3 $\mu\text{g.g}^{-1}$ m.s.).

Dans notre essai, les saules indiquent également de faibles teneurs en cobalt. Moins d'études ont été réalisées sur le cobalt mais quelques références mentionnent des teneurs très faibles en cobalt : l'une en deçà de la limite de détection (0.2 $\mu\text{g.g}^{-1}$ m.s.) (Vamerali *et al.*, 2009) et l'autre, de 0.42 $\mu\text{g.g}^{-1}$ m.s. (Arik & Yaldiz, 2010).

Facteurs de bioconcentration (BCF)

Bien que le test de comparaison de Gupta ait indiqué que certains clones présentent des teneurs plus importantes en métaux par rapport à d'autres clones, les valeurs des facteurs de bioconcentration (BCF) sont largement inférieures ou égales à 1 (Tableau VII). Dans d'autres essais sur site, le BCF dans les parties ligneuses variait entre 0.05 et 16.8 pour le cadmium (Dickinson et Pulford, 2005) et était inférieur à 1 pour le cuivre, le plomb et le zinc (Vervaeke *et al.*, 2003). Les BCF supérieurs à 1 indiquent une accumulation active des métaux par les plantes (Dickinson et Pulford, 2005). En conséquence, bien que des clones soient différenciés quant à leurs teneurs en métaux, le BCF ne permet pas de les classer comme « accumulateurs » (Fitz *et al.*, 2002 ; Dickinson et Pulford, 2005).

Les analyses de sol et des lixiviats indiquent une faible mobilité des métaux dans le substrat. Les plants n'auraient donc pas d'incidence notable sur la mobilité des éléments. Cette faible mobilité des polluants pourrait également expliquer leur faible bioaccumulation dans les tiges indiquée par les valeurs faibles de BCF.

D. Conclusion du point I

L'objectif premier du point I était de sélectionner parmi nos clones, ceux dont le profil correspondait aux deux critères d'un « phytoextracteur idéal » usuellement utilisés dans la littérature ; à savoir, la combinaison d'une forte biomasse et de fortes teneurs en métaux dans les tissus. Dans la littérature, le saule étant généralement considéré comme un fort producteur de biomasse, les auteurs comparent uniquement les teneurs en métaux présents dans les parties aériennes récoltables.

La plus-value de notre essai réside dans le fait que nous avons réalisé une analyse en métaux, associée à une analyse de la production de la biomasse pour chacun des clones.

A l'issue de ce point I, nous avons pu constater que certains clones produisaient plus de biomasse que d'autres en milieu contaminé. Or, ces clones plus productifs ne présentaient pas les plus fortes teneurs en métaux dans les tiges annuelles. Les teneurs en métaux ne sont pas nécessairement corrélées à la production de biomasse.

Le deuxième objectif est de savoir si le saule influence la mobilité des métaux. Nous avons pu constater que les saules n'ont pas augmenté le lessivage de ces derniers dans nos conditions de culture. Nous en avons déduit que les concentrations en métaux pouvaient être considérées comme stables durant l'essai et avons pu ainsi calculer le facteur de bioconcentration (BCF) des tiges. Dans un premier temps, les clones ont pu être classés selon les teneurs en métaux des tiges : certains clones présentent des teneurs plus importantes par rapport à d'autres. Le clone 47 (*Salix aurita*) se différencie en présentant des teneurs en métaux et une biomasse plus importantes par rapport aux autres. Il pourrait donc être un candidat potentiel en phytoextraction. Sa tolérance aux métaux a dès lors été plus investiguée en utilisant des approches physiologique et protéomique. Néanmoins, les valeurs du BCF, largement inférieures à 1, indiquent que nos clones de saules ne sont pas de forts extracteurs de métaux. La combinaison des deux critères du phytoextracteur idéal n'a donc pas été vérifiée chez les saules étudiés. La capacité à extraire les métaux des clones de saules étudiés dans cette étude n'est pas suffisante pour envisager leur utilisation en phytoextraction. Cependant, les concentrations en cadmium, zinc et cuivre seraient suffisantes chez certains clones pour créer des troubles physiologiques. C'est pourquoi, pour compléter ces analyses phénotypiques de la tolérance, il est important de considérer les réponses physiologiques et protéomiques induites par la plante en présence de métaux. L'utilisation des deux approches permettra donc d'évaluer l'impact des métaux sur la « santé » des clones pouvant être potentiellement utilisés dans un projet de phytoremédiation.

Les résultats du point I constituent l'amorce des points suivants du chapitre 2 :

- . Les clones de saules ont été sélectionnés sur base des objectifs d'ECOLIRIMED (sélection de clones tolérants aux métaux et conservation de la biodiversité), lesquels se sont déclinés, à mesure des avancées de nos travaux, vers la valorisation d'un site contaminé via la production de biomasse. Or, dans cette sélection de saules, nous avons identifié un transfert, bien que minime, des métaux vers la partie récoltable. Ces métaux sont-ils véhiculés également vers les feuilles ? Si tel est le cas, quel danger représentent ces feuilles « contaminées » dans la mobilisation des métaux du sol lors de la dégradation de la litière ? L'étude du transfert des métaux dans les parties aériennes fait l'objet du point II.
- . Deux groupes de clones ont pu être formés sur base de la production de biomasse : l'un regroupant les 4 plus forts producteurs de biomasse (HBP pour high biomass producers). A l'opposé, les 4 plus faibles producteurs de biomasse constituent le deuxième groupe (LBP pour low biomass producers). L'étude de la tolérance aux métaux de ces deux groupes fait l'objet du point III. Dans ce point, une approche physiologique et protéomique a été utilisée pour notre étude de la tolérance.
- . La tolérance du clone 47 (*Salix aurita*) a été davantage investiguée également en utilisant les deux approches physiologique et protéomique. Cette étude fait l'objet du point IV.

II. Etude du transfert des métaux du substrat vers les parties aériennes chez les saules à forte production de biomasse.

L'objectif du point II est de calculer le transfert des métaux au sein des parties aériennes chez les clones de saules sélectionnés à l'issue du point I (forte production de biomasse associée à une diversité des clones) (Figure III). Les teneurs en métaux ont été analysées dans les tiges et les feuilles. Ceux-ci ont été de nouveau plantés dans le même substrat contaminé aux métaux. La méthodologie de 2010 a été répétée.

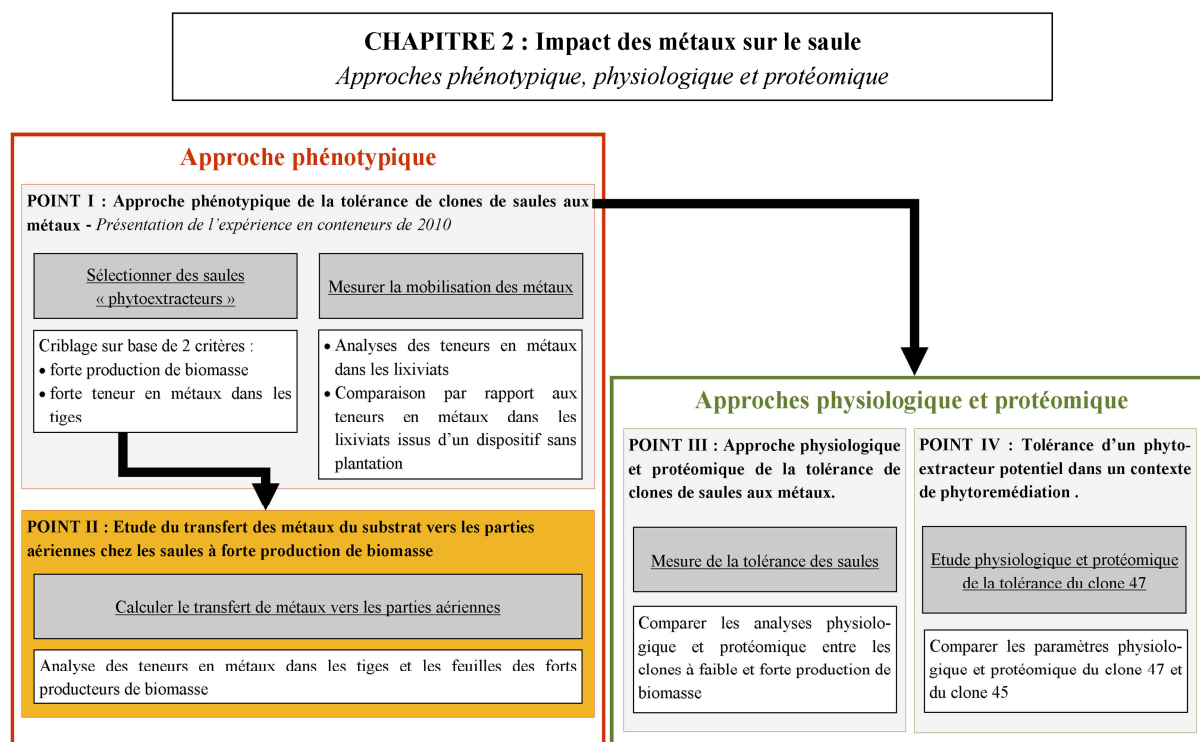


Figure III : Objectifs du point II (fond orange).

A. Matériel et méthode

1. Matériel végétal et conditions de culture

A l'issue du point I, selon le test de Gupta, les clones 46, 50, 108 et 111 ont été considérés comme les plus forts producteurs de biomasse (HBP). Ils ont donc de nouveau été sélectionnés dans cette deuxième expérience. *A contrario*, les clones 48, 253, 260 et 261 n'ont pas été choisis car ils ont été considérés comme les plus faibles producteurs de biomasse (LBP). D'autre part, la sélection s'est étendue sur 6 autres clones (45, 49, 116, 117 et 257) afin de respecter l'objectif d'Ecolirimed visant à préserver une biodiversité. Enfin, les clones 112, 263, 265 et 266 ont été ajoutés au dispositif car ils présentaient des teneurs élevées en métaux d'après le test de Gupta (Cu pour le clone 112 ; Cu, Fe et Pb pour le clone 263 ; Mn pour le clone 265 ; Cd, Zn et Mn pour le clone 266).

En mars 2011, ces 13 clones de saules, à raison de 5 réplicats par clone, ont été plantés à partir de boutures enracinées (point I.A). Les conteneurs et le substrat de l'expérience de 2010 (ré-homogénéisé) ont été de nouveau utilisés. Les teneurs en métaux dans le substrat ont été préalablement analysés avant la plantation (Tableau IX). Les conteneurs ont été disposés aléatoirement sur le terrain suite à un élagage de la couverture végétale surplombant l'installation qui a permis de réduire les gradients de luminosité. La fréquence d'arrosage se faisait généralement tous les 15 jours mais pouvait varier en fonction des conditions météorologiques. En dessous de chaque conteneur, un bidon a été mis en place afin de récolter les lixiviats. Ceux-ci étaient récoltés au cours de l'essai afin d'éviter une trop forte saturation du substrat en eau et une dernière fois, en fin d'essai, avant la récolte (octobre 2011).

Tableau IX : Teneurs en métaux dans les produits de dragage utilisés comme substrat dans l'expérience de 2011 en conteneurs.

	Cd	Cu	Zn	Ni	Pb	Co	As	Cr
Total	3,25	80,7	1182,9	37,3	291,7	19,5	19,2	48,3
Disponibile	1,86	35,4	434,1	3,6	175,0	1,5	0,7	1,4
	57%	44%	37%	10%	60%	7%	4%	3%

2. Récolte et analyses en métaux des tiges annuelles et des feuilles

Les pousses annuelles et les feuilles ont été récoltées en octobre 2011, après une période de croissance de 205 jours. Les tiges et les feuilles ont été brièvement lavées à l'eau déminéralisée, séchées et pesées. Les lixiviats ont été récoltés le même jour. Les teneurs en métaux ont été analysées dans les tiges et les feuilles. Il s'agissait des éléments métalliques suivants : Cd, Zn, Cu, Pb, Fe, Mn, Co, Ni.

3. Analyse statistique

L'Analyse de la Variance à un facteur (One-Way ANOVA) a été utilisée avec, comme variables, la biomasse et les teneurs en métaux dans les tiges et les feuilles et, comme facteur fixe, le clone. Lorsque l'ANOVA indique une différence significative entre les clones, le test de comparaison des moyennes de Tukey a été utilisé comme structuration de moyennes. Les teneurs en métaux entre les organes (tige et feuille) ont été comparées statistiquement pour chacun des clones à l'aide d'une ANOVA à un facteur (organe) et ayant comme variable, les teneurs en métaux. Les analyses statistiques ont été réalisées dans le logiciel Minitab v.16.2.2.

B. Résultats

1. Survie et croissance des clones de saules en milieu contaminé aux métaux

Les cinq réplicats de chaque clone ont pu croître sur le substrat contaminé sauf pour les clones 108, 116 et 257 (4 réplicats) et pour le clone 50 (3 réplicats). La production de biomasse pour chacun des clones est présentée dans la Figure XI. La production annuelle de biomasse est supérieure à 200 mg m.s. pour chaque clone, comme l'année précédente.

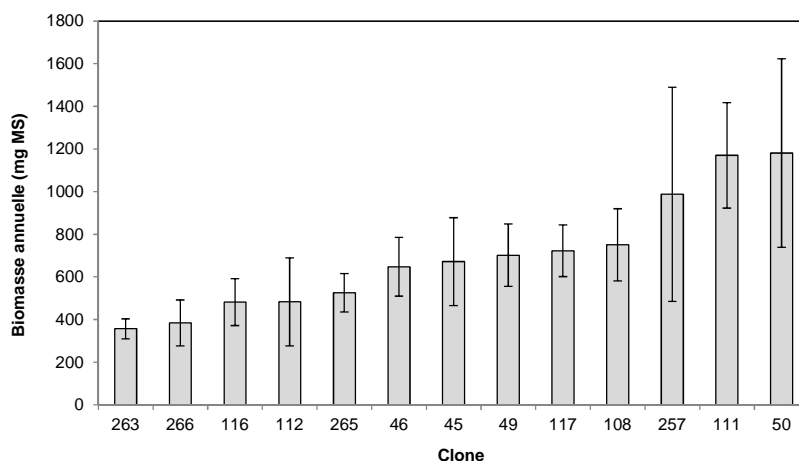


Figure XI : Production de biomasse annuelle (tige annuelle en mg de matière sèche) durant l'expérience de 2011 en conteneurs. Les clones sont classés par ordre croissant de production de biomasse. Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne (SE).

2. Teneurs en métaux

Les teneurs en métaux dans les tiges varient d'un clone à l'autre sauf pour le cuivre et le nickel. Les teneurs foliaires changent également d'un clone à l'autre à l'exception du cuivre et du fer. Les teneurs en métaux dans les feuilles sont plus importantes que dans les tiges, sauf pour le cuivre (Tableau X). Cependant, cette différence de teneurs entre les organes n'est pas généralisée pour tous les clones. En effet, il n'y a que 2 clones qui montrent une différence entre organes pour le cadmium (clones 49 et 116) et que 5 clones pour le nickel (clones 108, 114, 257, 265, 266) et le fer (clones 45, 108, 111, 112, 117).

Les teneurs en métaux dans les lixiviats ont été comparées à celles de 2010 et elles sont du même ordre de grandeur. Par conséquent, nous pouvons considérer que, comme en 2010, les teneurs en métaux sont stables dans le substrat et que le lessivage est négligeable. Les valeurs des facteurs de bioconcentration (BCF) pour les tiges et les feuilles ont donc été calculées (Tableaux XI et XII) ainsi que le facteur de transfert des métaux des tiges vers les feuilles (TF) (Tableau XIII) (Yoon *et al.*, 2006 ; Fitz et Wenzel, 2002). Les BCF supérieurs à 1 indiquent une accumulation active des métaux par les plantes (Dickinson et Pulford, 2005). Le calcul du TF donne une idée la capacité de transfert des métaux des tiges vers les feuilles. Comme pour l'année précédente, les valeurs des BCF pour les tiges sont bien inférieures à 1 sauf pour le cadmium. Les BCF foliaires sont généralement inférieurs à 1 sauf pour le cadmium et le zinc. Le calcul de BCF ne permet pas de classer les clones de saules à forte biomasse comme « accumulateurs » (Fitz *et al.*, 2002). Excepté pour le cuivre, les valeurs des TF sont supérieures à 1 pour tous les métaux, indiquant une capacité de transfert de la tige vers les feuilles.

Tableau X : Teneurs en métaux dans les tiges et les feuilles. Les lettres différentes indiquent des différences significatives entre les organes pour un même clone et un même élément.

Ecotype	Cu		Fe		Mn		Cd	
	Tige	Feuille	Tige	Feuille	Tige	Feuille	Tige	Feuille
45	22.7 ± 1.6 a	12.7 ± 1.5 b	145.2 ± 28.1 a	264.0 ± 25.1 b	27.87 ± 7.21 a	68.77 ± 3.78 b	3.23 ± 0.20 a	3.58 ± 0.21 a
46	23 ± 2 a	17.7 ± 1.7 a	133.7 ± 25.5 a	162.0 ± 16.4 a	24.03 ± 4.90 a	76.19 ± 9.62 b	3.32 ± 0.73 a	4.37 ± 1.10 a
49	23.1 ± 1.1 a	16.2 ± 0.9 b	134.0 ± 25.0 a	156.4 ± 12.6 a	27.15 ± 4.58 a	95.23 ± 9.72 b	3.57 ± 0.28 a	4.91 ± 0.45 b
50	18.7 ± 1.6 a	16.1 ± 1.6 a	91.6 ± 30.9 a	143.6 ± 6.2 a	21.82 ± 6.26 a	82.90 ± 18.00 b	2.96 ± 0.26 a	3.74 ± 0.55 a
108	23.3 ± 1.7 a	14.6 ± 0.7 b	85.7 ± 8.3 a	163.5 ± 18.2 b	46.96 ± 4.07 a	127.30 ± 14.10 b	4.13 ± 0.77 a	4.37 ± 0.70 a
111	23.9 ± 0.9 a	15.6 ± 1.3 b	76.7 ± 9.1 a	187.0 ± 11.5 b	10.19 ± 1.13 a	45.30 ± 2.43 b	4.26 ± 0.56 a	3.41 ± 0.51 a
112	34.2 ± 1.7 a	13.8 ± 1.0 b	155.0 ± 20.8 a	293.4 ± 42.4 b	28.91 ± 4.23 a	62.34 ± 5.79 b	2.81 ± 0.18 a	3.20 ± 0.23 a
116	42.9 ± 2.7 a	14.4 ± 1.1 b	662.0 ± 225.0 a	606.0 ± 284.0 a	41.10 ± 10.60 a	77.80 ± 10.60 b	2.58 ± 0.12 a	4.26 ± 0.64 b
117	19 ± 2 a	15.6 ± 1.1 a	82.3 ± 12.5 a	172.2 ± 21.7 b	26.26 ± 4.16 a	120.70 ± 14.60 b	2.83 ± 0.65 a	4.35 ± 1.06 a
257	29 ± 3 a	14.5 ± 1.1 b	309.0 ± 189.0 a	149.6 ± 14.0 a	44.00 ± 14.40 a	117.70 ± 23.20 b	5.46 ± 0.90 a	7.12 ± 1.31 a
263	24.7 ± 1.2 a	12.4 ± 0.5 b	256.7 ± 21.0 a	1076.0 ± 643.0 a	46.77 ± 5.48 a	88.10 ± 20.60 a	4.38 ± 0.65 a	4.64 ± 0.54 a
265	27.7 ± 0.7 a	15.4 ± 1.2 b	121.5 ± 17.6 a	220.8 ± 77.2 a	42.23 ± 6.96 a	139.10 ± 19.90 b	5.66 ± 1.16 a	6.97 ± 1.21 a
266	26 ± 1 a	13.3 ± 0.8 b	99.5 ± 13.1 a	128.4 ± 8.7 a	44.51 ± 4.74 a	115.77 ± 7.29 b	6.16 ± 1.56 a	8.49 ± 2.04 a

Ecotype	Zn		Ni		Co		Pb	
	Tige	Feuille	Tige	Feuille	Tige	Feuille	Tige	Feuille
45	435 ± 56 a	907 ± 59 b	2.14 ± 0.31 a	2.15 ± 0.11 a	0.21 ± 0.04 a	0.46 ± 0.05 b	0.62 ± 0.16 a	1.41 ± 0.15 b
46	596 ± 120 a	1569 ± 344 b	2.68 ± 0.40 a	2.82 ± 0.16 a	0.16 ± 0.01 a	0.55 ± 0.08 b	0.32 ± 0.05 a	0.66 ± 0.06 b
49	672 ± 56 a	2037 ± 174 b	2.94 ± 0.23 a	3.46 ± 0.33 a	0.20 ± 0.03 a	0.92 ± 0.22 b	0.48 ± 0.20 a	0.66 ± 0.06 a
50	508 ± 157 a	1492 ± 450 a	2.68 ± 0.75 a	3.16 ± 0.61 a	0.20 ± 0.05 a	1.00 ± 0.26 b	0.26 ± 0.07 a	0.62 ± 0.08 b
108	624 ± 98 a	1822 ± 143 b	2.39 ± 0.42 a	3.87 ± 0.18 b	0.22 ± 0.02 a	0.87 ± 0.17 b	0.31 ± 0.06 a	0.71 ± 0.08 b
111	417 ± 43 a	819 ± 124 b	1.50 ± 0.18 a	2.38 ± 0.03 b	0.16 ± 0.02 a	0.41 ± 0.04 b	0.28 ± 0.02 a	0.83 ± 0.05 b
112	577 ± 51 a	1705 ± 170 b	2.33 ± 0.33 a	2.28 ± 0.14 a	0.19 ± 0.02 a	0.49 ± 0.06 b	0.64 ± 0.14 a	1.35 ± 0.12 b
116	514 ± 36 a	1896 ± 196 b	2.20 ± 0.28 a	2.41 ± 0.14 a	0.26 ± 0.05 a	0.47 ± 0.06 b	0.78 ± 0.07 a	1.37 ± 0.16 b
117	333 ± 66 a	1029 ± 244 b	1.81 ± 0.28 a	2.58 ± 0.25 a	0.17 ± 0.02 a	0.83 ± 0.11 b	0.30 ± 0.08 a	0.82 ± 0.11 b
257	711 ± 100 a	2139 ± 226 b	2.54 ± 0.20 a	4.24 ± 0.14 b	0.22 ± 0.05 a	0.72 ± 0.08 b	0.41 ± 0.11 a	0.68 ± 0.09 a
263	618 ± 31 a	1508 ± 137 b	2.55 ± 0.12 a	2.87 ± 0.33 a	0.24 ± 0.01 a	0.59 ± 0.11 b	1.17 ± 0.15 a	1.96 ± 0.16 b
265	587 ± 89 a	2111 ± 301 b	2.45 ± 0.27 a	4.78 ± 0.72 b	0.27 ± 0.05 a	1.62 ± 0.43 b	0.31 ± 0.03 a	0.74 ± 0.07 b
266	788 ± 84 a	2341 ± 381 b	2.65 ± 0.25 a	3.96 ± 0.37 b	0.20 ± 0.02 a	1.24 ± 0.08 b	0.35 ± 0.08 a	0.62 ± 0.05 b

Tableau XI : Facteur de bioconcentration (BCF) des tiges des clones de saules plantés en conteneurs durant l'année 2011. BCF = teneur en métal dans les tiges de la plante ($\mu\text{g.g}^{-1}$ m.s.)/teneur en métal dans le substrat ($\mu\text{g.g}^{-1}$ m.s.). Le fer et le manganèse n'ayant pas été dosé dans le substrat (Tableau IX), le BCF n'a pu être calculé pour ces métaux.

Clone	Cu	\pm SE	Cd	\pm SE	Zn	\pm SE	Ni	\pm SE	Co	\pm SE	Pb	\pm SE
45	0.28	± 0.02	0.99	± 0.06	0.37	± 0.05	0.06	± 0.01	0.011	± 0.002	0.002	± 0.0005
46	0.28	± 0.02	1.02	± 0.22	0.50	± 0.10	0.07	± 0.01	0.008	± 0.000	0.001	± 0.0002
49	0.29	± 0.01	1.10	± 0.09	0.57	± 0.05	0.08	± 0.01	0.010	± 0.001	0.002	± 0.0007
50	0.23	± 0.02	0.91	± 0.08	0.43	± 0.13	0.07	± 0.02	0.010	± 0.002	0.001	± 0.0002
108	0.29	± 0.02	1.27	± 0.23	0.53	± 0.08	0.06	± 0.01	0.011	± 0.001	0.001	± 0.0002
111	0.30	± 0.01	1.31	± 0.17	0.35	± 0.04	0.04	± 0.00	0.008	± 0.001	0.001	± 0.0001
112	0.42	± 0.02	0.86	± 0.06	0.49	± 0.04	0.06	± 0.01	0.010	± 0.001	0.002	± 0.0005
116	0.53	± 0.03	0.79	± 0.04	0.43	± 0.03	0.06	± 0.01	0.014	± 0.002	0.003	± 0.0003
117	0.24	± 0.02	0.87	± 0.20	0.28	± 0.06	0.05	± 0.01	0.009	± 0.001	0.001	± 0.0003
257	0.36	± 0.03	1.68	± 0.28	0.60	± 0.08	0.07	± 0.01	0.011	± 0.002	0.001	± 0.0004
263	0.31	± 0.01	1.35	± 0.20	0.52	± 0.03	0.07	± 0.00	0.012	± 0.001	0.004	± 0.0005
265	0.34	± 0.01	1.74	± 0.36	0.50	± 0.07	0.07	± 0.01	0.014	± 0.002	0.001	± 0.0001
266	0.32	± 0.01	1.89	± 0.48	0.67	± 0.07	0.07	± 0.01	0.010	± 0.001	0.001	± 0.0003

Tableau XII : Facteur de bioconcentration (BCF) foliaire des clones de saules plantés en conteneurs durant l'année 2011. BCF = teneur en métal dans les tiges de la plante ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{m.s.}$)/teneur en métal dans le substrat ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{m.s.}$). Le fer et le manganèse n'ayant pas été dosé dans le substrat (Tableau IX), le BCF n'a pu être calculé pour ces métaux.

Clone	Cu	$\pm SE$	Cd	$\pm SE$	Zn	$\pm SE$	Ni	$\pm SE$	Co	$\pm SE$	Pb	$\pm SE$
45	0.16	± 0.02	1.10	± 0.06	0.77	± 0.05	0.058	± 0.003	0.023	± 0.002	0.005	± 0.0012
46	0.22	± 0.02	1.34	± 0.34	1.33	± 0.29	0.076	± 0.004	0.028	± 0.004	0.002	± 0.0002
49	0.20	± 0.01	1.51	± 0.14	1.72	± 0.15	0.093	± 0.009	0.047	± 0.011	0.002	± 0.0002
50	0.12	± 0.05	0.69	± 0.30	0.76	± 0.37	0.051	± 0.023	0.031	± 0.014	0.001	± 0.0005
108	0.15	± 0.04	1.08	± 0.32	1.23	± 0.32	0.083	± 0.021	0.036	± 0.011	0.002	± 0.0005
111	0.19	± 0.02	1.05	± 0.16	0.69	± 0.10	0.064	± 0.001	0.021	± 0.002	0.003	± 0.0002
112	0.17	± 0.01	0.98	± 0.07	1.44	± 0.14	0.061	± 0.004	0.025	± 0.004	0.005	± 0.0004
116	0.14	± 0.04	1.05	± 0.30	1.28	± 0.35	0.052	± 0.013	0.019	± 0.005	0.004	± 0.0010
117	0.19	± 0.01	1.34	± 0.33	0.87	± 0.21	0.069	± 0.007	0.043	± 0.006	0.003	± 0.0004
257	0.14	± 0.04	1.75	± 0.54	1.45	± 0.39	0.091	± 0.023	0.029	± 0.008	0.002	± 0.0005
263	0.15	± 0.01	1.43	± 0.17	1.28	± 0.12	0.077	± 0.009	0.030	± 0.006	0.007	± 0.0005
265	0.19	± 0.01	2.15	± 0.37	1.79	± 0.25	0.128	± 0.019	0.083	± 0.022	0.003	± 0.0003
266	0.16	± 0.01	2.61	± 0.63	1.98	± 0.32	0.106	± 0.010	0.063	± 0.004	0.002	± 0.0002

Tableau XIII : Facteur de transfert (TF) des clones de saules plantés en conteneurs durant l'année 2011. TF = teneur en métal dans les feuilles ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{m.s.}$)/teneur en métal dans les tiges ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{m.s.}$).

Clone	Cu	$\pm SE$	Cd	$\pm SE$	Zn	$\pm SE$	Ni	$\pm SE$	Co	$\pm SE$	Pb	$\pm SE$	Fe	$\pm SE$	Mn	$\pm SE$
45	0.56	± 0.05	1.12	± 0.08	2.18	± 0.21	1.08	± 0.14	2.35	± 0.29	2.88	± 0.65	2.10	± 0.36	2.97	± 0.58
46	0.77	± 0.06	1.26	± 0.08	2.58	± 0.12	1.12	± 0.12	3.40	± 0.36	2.21	± 0.28	1.34	± 0.20	3.46	± 0.39
49	0.70	± 0.0	1.38	± 0.08	3.05	± 0.15	1.20	± 0.12	4.34	± 0.56	2.02	± 0.43	1.27	± 0.15	3.85	± 0.62
50	0.88	± 0.14	1.25	± 0.09	2.96	± 0.12	1.28	± 0.25	4.90	± 0.30	2.64	± 0.41	1.86	± 0.43	3.95	± 0.30
108	0.64	± 0.06	1.08	± 0.12	3.03	± 0.29	1.72	± 0.20	3.92	± 0.47	2.47	± 0.26	1.90	± 0.07	2.76	± 0.37
111	0.65	± 0.04	0.80	± 0.08	2.02	± 0.33	1.67	± 0.17	2.70	± 0.32	2.98	± 0.16	2.50	± 0.13	4.67	± 0.55
112	0.41	± 0.05	1.15	± 0.09	2.96	± 0.13	1.07	± 0.17	2.74	± 0.43	2.39	± 0.33	2.15	± 0.62	2.35	± 0.38
116	0.34	± 0.04	1.63	± 0.18	3.70	± 0.36	1.16	± 0.20	1.88	± 0.26	1.75	± 0.12	1.20	± 0.51	2.23	± 0.56
117	0.83	± 0.05	1.51	± 0.11	3.01	± 0.29	1.48	± 0.10	4.85	± 0.51	3.02	± 0.48	2.24	± 0.33	4.76	± 0.53
257	0.52	± 0.09	1.30	± 0.17	3.21	± 0.53	1.69	± 0.13	3.55	± 0.48	1.94	± 0.38	1.02	± 0.35	3.15	± 0.54
263	0.51	± 0.04	1.08	± 0.04	2.44	± 0.17	1.14	± 0.14	2.51	± 0.52	1.74	± 0.17	4.03	± 2.38	1.84	± 0.24
265	0.56	± 0.05	1.29	± 0.10	3.61	± 0.09	1.98	± 0.26	5.63	± 0.55	2.36	± 0.16	1.76	± 0.40	3.34	± 0.09
266	0.52	± 0.05	1.41	± 0.12	2.99	± 0.48	1.50	± 0.10	6.35	± 0.35	2.16	± 0.52	1.38	± 0.20	2.68	± 0.23

C. Discussion sur le point II

Sur base des résultats obtenus dans le point I, des clones de saules ont été sélectionnés et ont été plantés une nouvelle fois en containers. La croissance des clones se vérifie d'une année à l'autre et la sélection sur base de la biomasse est donc justifiée et fiable. Afin de connaître le transfert des métaux vers les différentes parties aériennes, les teneurs en métaux dans leurs tiges annuelles ainsi que dans les feuilles ont été mesurées. Ces résultats sont indicatifs de ce qui pourrait être remobilisé au niveau de la litière si ces clones venaient à être utilisés en phytoremédiation. Les teneurs en métaux dans les feuilles sont plus importantes que dans les tiges sauf pour le cuivre (Tableau X). Pour le cadmium, le fer et le nickel, peu de clones ont montré une différence d'accumulation entre les organes. D'autres essais ont également montré que les teneurs en métaux sont plus importantes au niveau des feuilles, comparativement aux tiges (Migeon *et al.*, 2009 ; Witters *et al.* 2009 ; Ruttens *et al.*, 2011 ; Pietrosanti *et al.*, 2009 ; Vervaeke *et al.*, 2004 ; Meers *et al.*, 2005 ;2007 ; French *et al.*, 2006). Nous avons pu constater que les valeurs des BCF pour les tiges restent inférieures à 1 comme en 2010 (point I) sauf, à nouveau pour le cadmium où les valeurs sont proches de 1. Le calcul de BCF ne permet pas de classer les clones de saules à forte biomasse comme « accumulateurs » (Fitz *et al.*, 2002 ; Dickinson et Pulford, 2005). Cet essai de 2011 apporte toutefois des informations supplémentaires par rapport au transfert sol/feuilles et nous avons pu constater que les BCF foliaires sont également inférieurs à 1 sauf pour le cadmium et le zinc. Les valeurs des TF sont supérieures à 1 pour tous les métaux, indiquant une capacité de transfert de la tige vers les feuilles, mais ces valeurs sont néanmoins faibles.

Dans notre expérience, bien que les métaux soient transférés vers les tiges et en plus fortes teneurs vers les feuilles, les saules restent toujours de faibles extracteurs de métaux car le transfert vers les parties aériennes est restreint. Certains auteurs rapportent que le transfert vers les feuilles reste faible même lorsque le sol est fortement contaminé en Cd (Dickinson *et al.*, 2005) et qu'une augmentation des teneurs en métaux dans le sol ne conduit pas nécessairement à une augmentation des teneurs dans les tissus du ligneux en général (Marmiroli *et al.*, 2011). De plus, d'autres études, notamment en conditions contrôlées, indiquent que le cadmium ainsi que le plomb se retrouvent essentiellement au niveau des racines (Punshon et Dickinson, 1997; Landberg, 1996; Hammer, 2003 ; Cosio *et al.*, 2006 ; Pietrosanti *et al.*, 2009 ;Vervaeke *et al.*, 2004).

Les saules étudiés dans ce travail, en réduisant le transfert vers les parties aériennes, sont donc à privilégier pour éviter la mobilisation des métaux dans le sol (phytostabilisation). Toutefois, bien que les valeurs de transfert tige/feuille restent faibles, le transfert des métaux vers les feuilles est à prendre en considération. Après la chute des feuilles, lors du recyclage de la litière, il y a un risque que les métaux soient à nouveau rendus disponibles. La restitution des métaux dans le sol suite à la dégradation des feuilles et leur absorption mériteraient d'être davantage investigués.

D. Conclusion du point II

L'objectif de ce point II était d'étudier le transfert des métaux au sein des parties aériennes chez les clones de saules sélectionnés à l'issue du point I (forte production de biomasse associée à une diversité des clones). Ces clones sont les suivants : 45, 46, 49, 50, 108, 111, 116, 117, 257. Nous avons également élargi la sélection en intégrant les clones 112, 263, 265 et 266 sur base de la sélection du test de Gupta relatif aux teneurs en métaux.

Dans nos conditions de culture, d'une année à l'autre, la croissance des clones s'est vérifiée. La sélection sur base de la biomasse est donc fiable. Nous avons ainsi pu confirmer que les saules à forte production étudiés dans notre travail ont tendance à restreindre le transfert vers les parties aériennes et sont de faibles extracteurs de métaux. Les métaux étant faiblement lessivés et transférés dans les parties aériennes, nous pouvons conclure que les saules sont à privilégier en phytostabilisation.

Toutefois, nos résultats indiquent que les feuilles contiennent de plus fortes teneurs en métal que les tiges. Il y a donc un transfert des métaux des tiges vers les feuilles. La dégradation de la litière constitue donc un risque de remobilisation des métaux dans le sol. Ces métaux seraient alors de nouveau disponibles pour les saules. Si la technique du T(t)CR est envisagée, la récolte de l'ensemble des parties aériennes (tiges et feuilles) permettra d'éviter une réabsorption de ces métaux par les ligneux. Le risque de remobilisation des métaux doit toutefois être plus investigué.

Dans la littérature, les études sur la phytoremédiation et sur la tolérance des ligneux aux métaux sont dissociées. Dans le premier cas, un ligneux est étudié pour mesurer sa capacité d'extraction des métaux, sans se soucier de la « santé » de l'arbre. Dans le deuxième cas, les études relatives à la tolérance des ligneux ne se soucient pas de leur rendement en biomasse qui permettrait de calculer un rendement d'assainissement. Dans notre travail, nous avons associé ces deux notions. Les points I et II de notre travail répondent d'abord à un questionnement lié au potentiel des clones de saules en phytoremédiation. Le point III a pour objectif d'évaluer l'impact des métaux sur la santé des clones qui peuvent être potentiellement utilisés dans un projet de phytoremédiation.

Un faible producteur de biomasse montre-t-il des symptômes de sensibilité aux métaux par rapport aux forts producteurs de biomasse ? A l'issue du point I, deux groupes de clones ont été déterminés à partir des résultats de biomasse. Selon le test de Gupta, l'un comprend les clones, 46, 50, 108 et 111 (les forts producteurs de biomasse (HBP)). L'autre groupe comprend les plus faibles producteurs de biomasse (LBP) : les clones 48, 253, 260, 261. Des mesures physiologiques et protéomiques ont été réalisées sur les feuilles de ces deux groupes. Le point III, consiste en la réalisation d'une étude comparative des réponses physiologiques et protéomique entre les deux groupes de saules.

III. Approches physiologique et protéomique de la tolérance de clones de saules aux métaux.

L'objectif du point III est de comparer la tolérance des forts et à celle des faibles producteurs de biomasse en utilisant des approches physiologique et protéomique (Figure III). Ces deux groupes de clones ont été déterminés à l'issue d'une sélection (point I). En 2010, la fluorescence chlorophyllienne a été mesurée sur ces clones. Des feuilles ont été récoltées, en quantité suffisante, avant la fin de l'essai de 2010. Elles ont été stockées à -80°C pour les futurs dosages des sucres et les analyses protéomiques. Dans ce point, la capacité d'extraction des deux groupes de clones est également mesurée. Ce point est présenté sous forme d'article « *Physiological and proteomic responses of different willow clones (Salix fragilis x alba) exposed to dredged sediment contaminated by heavy metals* ».

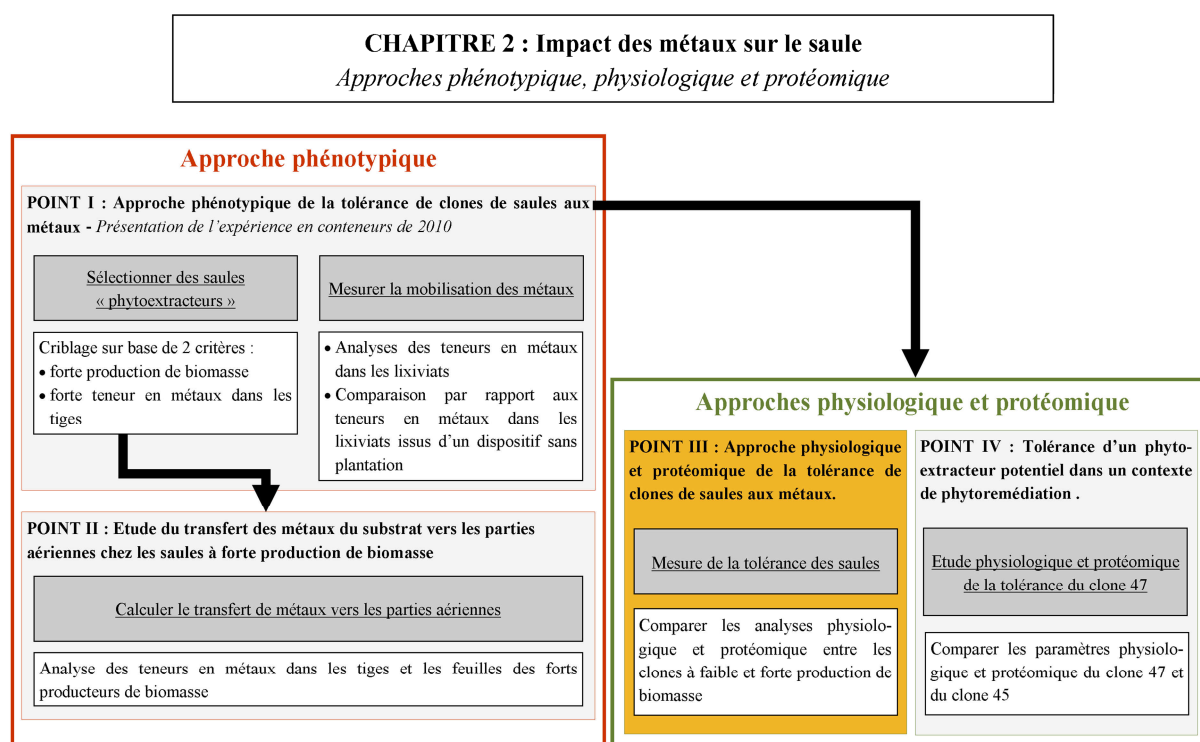


Figure III : Objectifs du point III (fond orange).

Article :

Physiological and proteomic responses of different willow clones (Salix fragilis x alba) exposed to dredged sediment contaminated by heavy metals

Aricia Evlard^{a*}, Kjell Sergeant^b, Salvador Ferrandis^c, Bruno Printz^b, Jenny Renaut^b, Cedric Guignard^b, Roger Paul^a, Jean-Francois Hausman^b, Bruno Campanella^a

^aLaboratoire de Toxicologie environnementale, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liège, 2, passage des Déportés, B-5030 Gembloux, Belgium

^b Centre de Recherche Public — Gabriel Lippmann, Department of Environment and Agrobiotechnologies, 41, rue du Brill, L-4422 Belvaux, Luxembourg

^c Unité de Statistique, Informatique et Mathématiques appliquées, University of Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, 2, passage des Déportés, B-5030 Gembloux, Belgium

Soumis à International Journal of phytoremediation (07/02/2013)

Physiological and proteomic responses of different willow clones (*Salix fragilis x alba*) exposed to dredged sediment contaminated by heavy metals

Aricia Evlard^{a*}, Kjell Sergeant^b, Salvador Ferrandis^c, Bruno Printz^b, Jenny Renaut^b, Cedric Guignard^b, Roger Paul^a, Jean-Francois Hausman^b, Bruno Campanella^a

^aLaboratoire de Toxicologie environnementale, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liège, 2, passage des Déportés, B-5030 Gembloux, Belgium

^b Centre de Recherche Public — Gabriel Lippmann, Department of Environment and Agrobiotechnologies, 41, rue du Brill, L-4422 Belvaux, Luxembourg

^c Unité de Statistique, Informatique et Mathématique appliquées, University of Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, 2, passage des Déportés, B-5030 Gembloux, Belgium

Kjell Sergeant: sergeant@lippmann.lu

Salvador Ferrandis: s.ferrandis@ulg.ac.be

Bruno Printz: printz@lippmann.lu

Jenny Renaut: renaut@lippmann.lu

Cedric Guignard: guignard@lippmann.lu

Roger Paul: roger.paul@ulg.ac.be

Jean-Francois Hausman: hausman@lippmann.lu

Bruno Campanella: [Bruno.Campanella@ulg.ac.be](mailto: Bruno.Campanella@ulg.ac.be)

Abstract

Biomass producing species are considered as tools for remediation of contaminated soils. Willows (*Salix* spp.) are prominent study subjects in this regard. In this study, different willow clones (*Salix fragilis* x *alba*) were planted on heavy-metal polluted dredging sludge. A first objective was assessment of the biomass production for these clones. Using a Gupta statistic, four clones, with a significantly higher biomass production compared to the others, were identified, forming the group called high biomass producers (HBP). For comparison, a group of four clones with lowest biomass production were selected (LBP). A second objective was to compare the physiology and proteomic of the leaves of these two groups, whereas they grown on the same contaminated substrate, and taking into account metal uptake in the annual twigs. Cd, Zn and Ni total uptake was higher in the HBP but Pb total uptake was higher in LBP. F_o , F_m and F_v were significantly higher in the HBP. Proteins involved in antioxidant defence mechanisms were more abundant in the LBP as well as the extrinsic oxygen-evolving enhancer protein OEC33. This may be linked to the high concentrations of Pb in these plants although a combined effect of the other metals cannot be excluded.

Keywords: 2-DiGE; Antioxidant defence; Oxygen evolution; Variable fluorescence

Abbreviations

CAT, catalase; 2-DE, two-dimensional electrophoresis; F_o , minimal chlorophyll fluorescence yield obtained with dark-adapted leaves; F_m , maximal chlorophyll fluorescence yield obtained with dark-adapted leaves; F_v , maximum variable fluorescence emission; F_v/F_m : PSII efficiency; GSH, glutathione; HBP, high biomass producer; LBP, low biomass producer; LHCP, light harvesting chlorophyll a/b binding protein; NP, non-planted container; OEC, oxygen-evolving complex; OEE, oxygen-evolving enhancer protein; PCD, programmed cell death; POD, peroxidase; PsbO, PsbP, PsbQ, extrinsic oxygen-evolving proteins; PSII, photosystem II; RCII, reaction centres of photosystem II; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; VDAC, porin/voltage-dependent anion-selective channel protein

* Corresponding author : Aricia Evlard. Laboratoire de Toxicologie environnementale Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liège, 2, passage des Déportés, B-5030 Gembloux, Belgium. aevlard@gmail.com Tel.: +32 81 622 494 Fax: +32 81 600 727

1. Introduction

Due to their increasing dispersion and their inherent environmental persistence, the impact of heavy metals on plants remains one of the most important worldwide concerns (Migeon *et al.*, 2009; Vangronsveld *et al.*, 2009; Durand *et al.*, 2010b; Banfalvi, 2011). It is known that soils containing naturally high concentrations of heavy metals exist all over the world; however, the widespread existence of secondary metal-contaminated soils can be attributed mainly to human activities (Vassilev *et al.*, 2004). Although metals such as Cu, Co, Fe, Mn, Ni and Zn are essential for plant growth and development, their occurrence in excess is dangerous for plants. On the other hand, several non-essential metals, such as Cd and Pb, are phytotoxic even at low concentration (Lasat, 2002; Bertrand and Poirier, 2005). Metals can be toxic in many ways. They disturb the nutritional balance of the plant and thereby cause a deficiency of essential elements. The other consequence of metal toxicity resides in the disruption of the equilibrium between the generation and detoxification of reactive oxygen species (ROS) ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 ; HO^{\bullet}), which induces oxidative stress in plants. Depending on their oxidation states, heavy metals are classified either as redox-active or as redox-inactive metals. Redox-active heavy metals (Fe, Cu, Cr, Co) are directly involved in redox reactions in cells via the Haber-Weiss and Fenton reactions and result in the formation of ROS. Redox-inactive heavy metals (Cd, Zn, Ni, Al) induce oxidative stress indirectly by interacting with the antioxidant defence system and the electron transport chain. ROS-levels are generally controlled by antioxidative defence mechanisms. Plants have enzymatic antioxidant mechanisms such as superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) but also non-enzymatic components (glutathione, carotenoids and ascorbate) to protect their cells against oxidative stress (Bhaduri and Fulekar, 2012). However, most enzymes involved in antioxidant defence contain metal ion cofactors. The replacement of this metallic cofactor by another reduces or suppresses enzymatic activity. Heavy metals can also reduce or suppress the activity of other proteins or pigment-protein complexes (chlorophyll, RuBisCO). Similarly, metals have a high affinity for sulphhydryl groups (cysteine), making some free-sulphhydryl groups containing proteins and enzymes more vulnerable to the effects of heavy metals (Kieffer *et al.*, 2009; Hossain 2012a; Jozefczak *et al.*, 2012; Sanchez *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2012). Cellular macromolecules such as DNA and lipids can also be oxidised by metallic pollutants (Bhaduri and Fulekar, 2012). Thus the denaturation of enzymes and proteins, and the inactivation of functional groups of essential macromolecules, ultimately affect plant metabolism, photosynthesis efficiency and respiration reactions (Apel and Hirt, 2004; Colls and Hall, 2004; Hossain, 2012a).

The strategies developed by plants to resist or to accumulate high amounts of metal have been well studied, especially due to the identification of metal hyperaccumulator plant species (*i.e.* plants accumulating more than 1% of heavy metals in their aerial organs without suffering phytotoxic effects (Rascio and Navar-Izzo, 2011)). However, these species generally show a low level of biomass production and thus accumulate low amounts of extracted metal. Thus, concurrently with the research on hyperaccumulators, the idea of using high biomass producers (e.g. alder, poplar, willow), which

have the ability to accumulate heavy metals, has emerged over recent years (Dickinson, 2000; Rosselli *et al.*, 2003; Meers *et al.*, 2005, 2007; Durand *et al.*, 2010b). However, even when trees produce large amounts of biomass, they still tend to take up small amounts of metal; this therefore shows that high biomass production is not related to high metal accumulation (Pulford *et al.*, 2002; Ekvall and Greger, 2003). Nonetheless, increased biomass production can amplify the total amount of metals extracted, while keeping low metal concentrations in the plant (Greger and Landberg, 2001; Ekvall and Greger, 2003; Pulford and Watson, 2003). This is referred to as the dilution effect caused by higher biomass production. The positive side is that this dilution effect offers the potential for an important economic opportunity through the production of renewable energy on contaminated land using, for instance, short rotation coppice willow (Pulford *et al.*, 2002).

The molecular mechanisms involved in metal toxicity, tolerance and accumulation in plants are now better understood. The emergence of proteomic techniques is now contributing to our increasing understanding of these mechanisms. Recently, the techniques of two-dimensional electrophoresis coupled with multiplexing fluorescent probes (2-DiGE) and mass spectrometry have been increasingly used to compare proteomic changes resulting from the growth of plants under stress conditions, including their exposure to heavy metals (Ahsan *et al.*, 2009; Duquesnoy *et al.*, 2009; Kieffer *et al.*, 2009; Villiers *et al.*, 2011). In the current study, different clones of willow (*Salix fragilis* x *alba*) grown on metal-contaminated substrate were screened for biomass production and two groups were composed: high and low biomass producers. The objective was to discern the differences in the physiology of these two groups when grown on substrate containing heavy metals. To this end, a combination of physiological (chlorophyll fluorescence, carbohydrate content) and molecular (proteomic) analyses was performed on leaves. Data was interpreted in terms of the accumulated metals in the annual twigs of the different clones.

2. Material and methods

2.1 Experimental design

2.1.1 Plant material and growth conditions

Rooted cuttings of 26 clones, originating from different areas in Wallonia (Belgium), were planted outdoors in 10 L containers. Each clone was represented by 3 replicates. Using containers (Figure 1) facilitates the study of the fraction of lixiviated metals as well as the fraction of phytoextracted metals. Nine additional containers were not planted (NP) and were used to follow the evolution of the soil as a control. Dredging sludge, collected from the disposal site in Obourg (Belgium), was used as substrate. The Obourg disposal site was filled with dredging sludge originating from the canal “du Centre” from the 1980s until 1994; the sludge contains elevated metal concentrations. The total volume of collected dredging sludge used in the present study was mixed thoroughly before a sample (± 0.5 kg) was collected to perform initial substrate analyses.

Total P content was determined using the molybdenum blue method and molecular absorption spectrophotometry after sediment digestion using aqua regia (composed of HCl and HNO₃) (NFEN ISO 6878:2005). The Kjeldahl method was used to determine the total N content (ISO11261:1995). The total content of Ca, Mg, Na, K and metal trace elements (As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn) (after aqua regia digestion) and the percentage of available metals (extraction with 0.5 N NH₄OAc, 0.5 N HOAc, 0.02 M EDTA, pH 4.65) were measured using atomic absorption spectrometry (AAS800-PerkinElmer)(ISO 11 466:1995, NBN EN 13657:2002, ISO 11407:1998, ISO 20280:2007). Levels of organic carbon were determined using the sulfochromic oxidation method (ISO 14 235:1998).

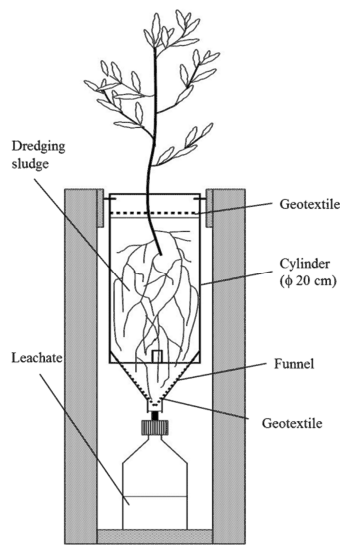


Figure 1: Diagram of a container. Each container contained 10 L of substrate.

2.1.2 Statistical selection of high biomass producers

Containers were organised within a pseudo Latin square experimental design, allowing a double control for heterogeneity (Dagnelie, 2003). The containers were randomized into 3 groups. Each group was established according to a 3x3 array, with each container occurring exactly once in each row and exactly once in each column. During the growth period, the substrate in each container was watered every ten days until saturation. After a growing period of 225 days and, preceding the harvest of the annual twigs, about 600 mg of fresh leaves were collected from all plants (three biological replicates for each clone), washed with distilled water and stored at -80 °C prior to carbohydrate and proteomic analyses.

The annual twigs were sampled, washed with demineralized water, dried at 70 °C in an oven until mass constancy and weighed. An univariate analysis of variance (ANOVA) was applied to analyse the measured production of biomass in the different willow clones. Column and row blocks were included in the model. A Gupta's multiple mean comparison test was performed at a 90% confidence level. The Gupta method is a selection procedure for choosing the best subset using the largest mean of the observed variable as a "reference" (Gupta, 1965; Dagnelie, 2011). In the present study, we used the

Gupta test to highlight the subset of high biomass producers (HBPs); the clone used as the reference was clone 111, the one that ranked highest in terms of biomass production (Figure 2). Clones whose means were significantly different from the mean of this “reference clone” were considered as “low biomass producers” (LBPs). These analyses were performed using MINITAB Statistical Software v.16.2.2.

For physiological and molecular analyses, two groups were considered: the first group consisted of four “high biomass producers”, as highlighted by the Gupta selection test (clones 108, 50, 46 and 111), and, for comparison, the second group consisted of the four lowest biomass producers (clones 261, 260, 48 and 253) (Figure 2). Accordingly, physiological and proteomic analyses were performed only on leaves of these two distinct groups of clones.

2.2 Metal analysis

Metal content (Cd, Zn, Cu, Pb, Ni, Co, As, Mn and Fe) was analysed in the annual twigs using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Perkin Elmer Elan DRC-e). An aliquot of 100 to 250 mg of dried sample was digested in 7 mL HNO₃ (Plasma Pure 67–70%, SCP Science) and 3 mL H₂O₂ (30%, trace metal analysis grade, Fisher Scientific). Acid digestion was performed in Teflon tubes in a microwave oven (Anton Paar Multiwave 3000) by increasing temperature and pressure up to 200 °C and 30 bars. At the end of the procedure, samples were diluted with ultrapure water up to 25 mL and were maintained at 4 °C prior to analysis. Blank samples and certified reference material were included at each mineralization cycle for quality control. The clones were compared on the basis of the total metal amounts (µg) found in the annual twigs (Figure 3).

A flask was placed under each container in order to collect leachates. Leachates were collected following water saturation of the substrate in the plant containers and at the end of the experiment, before harvesting. The total volume of leachates from each flask was measured and a sample of 50 mL was collected and filtered (paper filter, Whatman®, grade 1, φ 32cm). The metal content was analysed with ICP-MS after acidification with 1% nitric acid (Plasma Pure 67–70%, SCP Science) and filtration (0.2 µm). The amount of metal (µg) present in the leachates was calculated by multiplying the volume of leachate (l) by the determined metal concentrations (µg.l⁻¹). For selected containers, the amount of metal (µg) was also calculated in the same way by using the weight of the substrate (10 kg) and metal concentrations (mg.kg⁻¹). The ratio (amounts of metal in the leachates/amounts of metal in the substrate) was calculated. The amounts of metal in the leachates were also analysed for the non-planted containers (NP). A multivariate analysis of variance (MANOVA) (Palm, 2000) was performed on the metal content measured in the plant and in the leachates. An univariate analysis of variance (ANOVA) was carried out for each dependent variable and the results indicated the metals for which a significant difference between clones was obtained. Where significant differences were observed between the clones Tukey’s mean comparison method was used (Hsu, 1996). These analyses were performed using MINITAB Statistical Software v.16.2.2.

2.3 Comparison of physiological parameters and proteomic expression between the groups

2.3.1 Chlorophyll fluorescence analysis

Analyses were performed using a portable fluorometer (PAM 2100 Walz, Effeltrich, Germany) on leaves that were intact, mature and fully exposed to the sun. A dark adaptation is needed for the electron transport chains to reach the fully-oxidised level (i.e. photosystem II is open) (Maxwell and Johnson, 2000). Thus, the device measures the initial fluorescence (F_o) before excitation of the reaction centres of photosystem II (PSII) and the maximal fluorescence (F_m), after the application of a saturation light pulse (0.8 s), is emitted when all electron acceptors are closed. The ratio $(F_m - F_o)/F_m = F_v/F_m$ can then be calculated. This ratio represents the efficiency of the photosystems in the dark-adapted state, where F_v represents the maximum variable fluorescence emission (Maxwell and Johnson, 2000). For practical purposes, dark adaptation was obtained by taking the measurements at night. Fluorescence measurements were performed on 5 leaves on the 3 replicates per clone in July and August. Data were analysed by a one Way ANOVA followed, in case of significant difference (p -value < 0.05), by a post-hoc pairwise comparison using the Tukey's method (Hsu, 1996). These analyses were performed using MINITAB Statistical Software v.16.2.2.

2.3.2 Carbohydrate analysis

About 100 mg fresh leaf material, previously stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ prior to analysis, were crushed in liquid nitrogen and mixed with 1 mL of a water/ethanol mixture (20/80, v/v). After vortexing and shaking for 30 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ with an Eppendorf Thermomixer at 1400 rpm, samples were centrifuged at 17000 g, at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, for 10 min. The supernatant was collected and the pellet was extracted again with 0.5 mL of the water/ethanol mixture (20/80, v/v). The resulting supernatant was pooled with the first one and the final extract dried at reduced pressure (Speedvac) before being resuspended in 1 mL milli-Q water and filtered through $0.45\text{ }\mu\text{m}$ PVDF-filters. The samples were analysed using High Performance Anion Exchange Chromatography coupled with a Pulsed Amperometric Detector (HPAEC-PAD) according to the method of Evers *et al.* (2010) with slight modifications. HPAEC-PAD analyses for carbohydrates were conducted on a Dionex ICS2500-BioLC (Sunnyvale, USA), with an AS-50 autosampler, a GS-50 gradient pump, an EG-50 eluent generator and an ED-50 Detector. The mobile phase, with a flow-rate of $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, was on-line generated with KOH. The hydroxide concentration was programmed as follows: 9.5 mM for 17 min, 9.5-100 mM for 1 min, 100 mM for 10 min, 100-9.5 mM for 2 min and column equilibration at 9.5 mM for 3 min. The analytical column was a Dionex CarboPac PA-20 (3 mm x 150 mm), maintained at $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Carbohydrates were quantified using nine-point calibration curves with custom-made external standard solutions, ranging from 1 to $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. After 10 injections, a check standard solution was used to validate the calibration of the system (Guignard *et al.*, 2005). A One Way ANOVA was applied to the carbohydrate content. Where significant differences were observed between clones, Tukey's method for mean comparison was used.

2.3.3 Protein sample preparation, labelling and 2-DE

After grinding about 500 mg of fresh leaves, previously stored at -80 °C prior to analysis, in liquid nitrogen, pigments and small molecules were eliminated from the sample by washing in organic solvents. Briefly, the powder was resuspended in 1 mL cold 10% trichloroacetic acid (TCA) in acetone with 0.07% DTT, kept in the freezer for 1 hour and then centrifuged at 10,000 g for 5 min. After discarding the supernatant, the pellet was washed twice with cold acetone and subsequently allowed to dry at room temperature overnight before being resuspended in 0.6 mL SDS buffer (30% sucrose, 2% SDS, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 5% 2-mercaptoethanol) and 0.6 mL phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25/24/1, Roth). This step, typically applied to eliminate proteins in nucleotide isolation, was used here instead of the more frequently used phenol-extraction. This procedure was chosen because, during preliminary optimization, the gel images had been distorted by smearing in the higher molecular mass range. Contrary to when the objective is to isolate nucleotides, in the current protocol, the upper, nucleotide containing, phase was discarded and the lower phase together with the interphase used for further protein extraction. Protein quantification of the upper phase indicated that the loss of proteins in this phase was below the detection limit of the 2D Quant kit (GE Healthcare). The two lower phases were used to perform a hot-SDS extraction, as previously used for oak and other plant tissues (Delaplace *et al.*, 2009; Sergeant *et al.*, 2011). Briefly, 150 mg PVPP (polyvinylpolypyrrolidone, Sigma, Bornem, Belgium) and 3 mL of SDS-buffer (5% sucrose, 4% SDS, 20 mM sodium hydrogen phosphate pH 7 and 0.3% DTT) preheated at 65 °C were added to the sample. This mixture was incubated in the oven at 65 °C for 30 min with a brief vortex step every 5 min and was subsequently put on ice for 15 min. After centrifugation at 19,000 g and 4 °C for 15 min, the supernatant was recovered and centrifuged again (same conditions) to eliminate all traces of PVPP. Proteins were further purified by TCA/acetone precipitation and finally solubilised in labelling buffer (30 nM Tris pH 8.0, 7 M urea, 2 M thiourea, 2% w/v CHAPS). After adjusting the pH of the extracts to 8.5, the protein content was quantified using the 2D-Quant Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) with BSA as standard. All protein extracts and a pooled internal standard were labelled with CyDyes™ (GE Healthcare) prior to electrophoresis. For labelling, a volume of sample corresponding to 30 µg was used and the dyes were swapped to avoid the effects of preferential labelling on the statistical outcome. Ninety micrograms of proteins (two samples of 30 µg each and 30 µg of the internal standard), the volume adjusted to 120 µl with lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 0.5% (w/v) CHAPS) and 0.72 µl of Destreak Reagent, 2.4 µl of IPG buffer 3–10 NL (GE Healthcare) added, were loaded by cup loading onto 24 cm 3–10 NL IPG strips (GE Healthcare). Isoelectric focusing was performed using an IPGphor IEF unit (GE Healthcare) with the following protocol: 150 V for 2 h, gradient to 1,000 V for 4 h, 1,000 V for 5 h, gradient to 10,000 V for 5 h, 10,000 V for 7 h until approximately 95,000 Vh were reached at 20 °C with a maximum current setting of 75 µA per strip. After equilibration, reduction and alkylation of cysteines using respectively DTT and iodoacetamide,

the strips were applied onto precast gels (GelCompany, Tübingen, Germany) using the buffer kits according to the manufacturer's instructions.

2.3.4 Image capture and analysis

As described by [Renaut *et al.*, 2006](#), images for the different CyDyes™ were acquired using a 9400 Typhoon Variable Mode Imager (GE Healthcare) at a resolution of 100 µm using the excitation and detection wavelengths specified by the manufacturer. Images were analysed using the Decyder v7.0 software (GE Healthcare). Statistical analysis of the differentially expressed proteins was carried out with the same software package. Only those spots with a ratio between high biomass producers and low biomass producers of ≥ 1.5 or ≤ -1.5 (calculated as $-1/\text{ratio}$ when the ratio was <1) and a t-test score of <0.05 were considered as being significantly different. Spots that changed significantly in intensity were excised from a non-charged gel loaded with 90 µg of protein, and digested using the fully automated Ettan Spot Handling Workstation (GE Healthcare). After digestion, the dried peptide extracts were resuspended and spotted on stainless steel MALDI target plates, mixed with a matrix solution (alpha cyanohydroxycinnamic acid in 50% ACN/0.1% TFA) and allowed to dry. All spectra, 1 MS and 10 MS/MS spectra of the highest precursors, were acquired using a 5800 MALDI TOF/TOF (AB Sciex), calibrated using the 4700 peptide mass calibration kit. For MS, 1500 laser shots were accumulated, while 3000 spectra were accumulated for MS/MS spectra. Using an in-house MASCOT-server on a ProteinPilot platform (ABSciex), all spectra from one spot were submitted in a single search, PMF and MS/MS, against the NCBI database (limited to the taxonomy *Viridiplantae*, downloaded 04/06/2012 containing 1078293 sequences) and the EST *Viridiplantae* database (75859188 sequences downloaded, autumn 2010). Proteins were considered as being significantly identified when two individual non-identical peptides surpassed the threshold for identification or when one peptide resulted in a protein e-value of <0.005 . All identifications were manually validated and extra data was acquired when insignificant identifications were obtained (indicated in red in Supplemental Table 5). For some spots, manual sequence determinations were performed and the found sequences used for cross-species identification with FASTS ([Mackey *et al.*, 2002](#)).

3. Results

3.1 Substrate analysis

The substrate had a relatively neutral – lightly alkaline pH (Table 1). The organic matter content was relatively high as compared to a standard agricultural soil (10 g OM.kg⁻¹) or with humus (500 g OM.kg⁻¹). The C/N ratio was close to 50. These results define a poorly weakly differentiated and poorly degraded organic fraction, mostly composed of organic carbon. The Ca content was also found to be relatively high compared to a standard agricultural soil (5 g Ca.kg⁻¹). A difference was found between available and total metal content (Table 2). Some elements were poorly available (Cr, Fe), while for others (Cd, Pb) the available fraction represented more than 50% of the total metal content.

Table 1: Total and available metal content (mg.kg⁻¹ dried matter) in the substrate. The percentages of the elements that were available to the plants are indicated in brackets.

	Cd	Cu	Zn	Ni	Pb	Co	As	Cr	Mn	Fe
Total	3.2	82.7	1200	40	333	20.2	20.5	68	640	27100
Available	1.83 (57%)	33.7 (41%)	451 (38%)	3.2 (8%)	184 (55%)	1.7 (8%)	0.49 (2%)	0.4 (0.6%)	114 (18%)	760 (0.03%)

Table 2: Agronomic potential of the substrate. The bioavailability percentages of elements are shown in brackets. Values are expressed in g.kg⁻¹ of dried matter

	K ₂ O	CaO	MgO	Na ₂ O	P ₂ O ₅	N	C _{org}	OM	pH
	(g.kg ⁻¹)	(g.kg ⁻¹)	(g.kg ⁻¹)	(g.kg ⁻¹)	(g.kg ⁻¹)	(g.kg ⁻¹)	(g.kg ⁻¹)	(g.kg ⁻¹)	(H ₂ O)
Total	3.9	73.9	5.4	0.7	3.2	5.3	261.8	342.2	7.4
Available	0.5 (11.4%)	67.2 (91%)	0.5 (8.6%)	0.08 (11.4%)	0.09 (2.8%)	-	-	-	-

3.2 Annual biomass production and selection of biomass producer groups

Results of the ANOVA showed that the level of biomass production varied significantly between the 26 clones (Figure 2). The Gupta test highlighted clones 108, 50, 46 and 111 as the “high biomass producers” (HBPs). These four clones formed the first group. A second group of “low biomass producers” (LBPs) was also selected (clones 261, 260, 48 and 253). The following analyses were performed on these two distinct groups of willow clones.

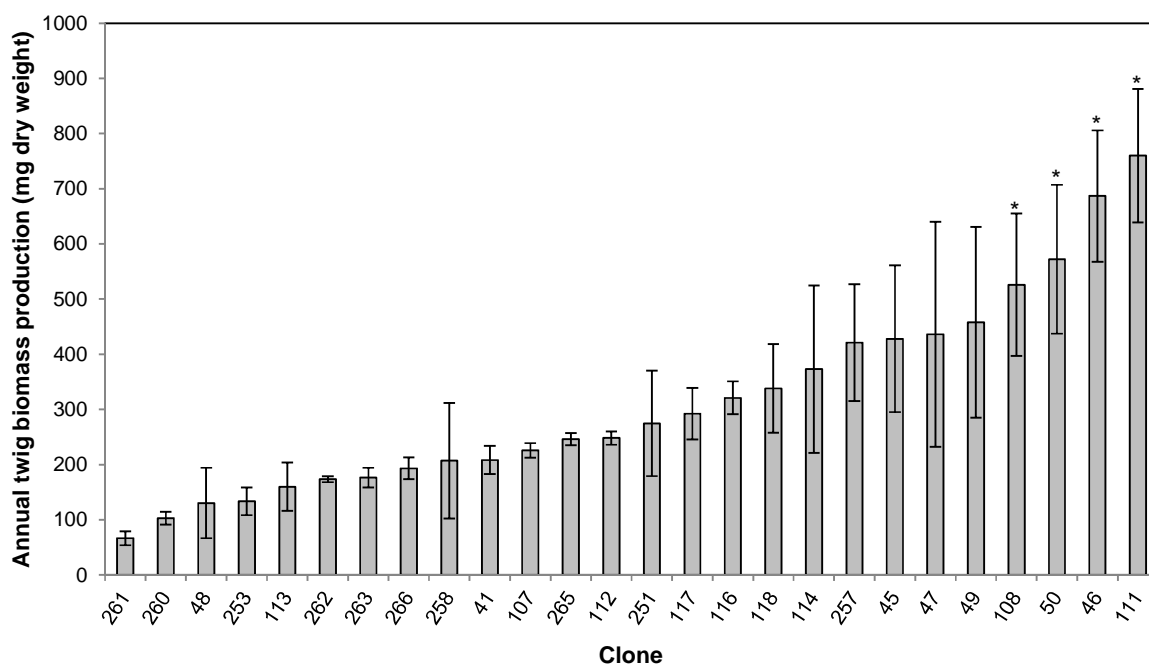


Figure 2: Mean annual twig biomass production of the clones (n=3), expressed in mg of dried matter of twigs. Bars represent standard error of mean (SE). Asterisks show the high biomass producers identified by Gupta's multiple mean comparison test.

3.3 Metal uptake by annual twigs

Significant differences were found between the clones in terms of the Cu and Fe content measured in twigs ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight) (results not shown). However, when Cu and Fe uptake (μg) was calculated by multiplying the measured metal content ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight) by biomass production (g dry weight), no significant differences were found between the clones (Figure 3). Clones 108 and 46 accumulated significantly more Mn but the distinction between the HBP and the LBP groups was not significant (Figure 3). In regard to Cd, Zn and Ni, the low biomass producer group was characterized by a low total uptake compared to the high biomass producer group. Clone 111 (highest biomass producer) accumulated systematically more Cd, Zn, Ni than the other clones. Clones 108, 50 and 46 did not show a significantly different accumulation, and these clones thus formed a subgroup between the two extremes. Likewise for Co, clone 111 was also highlighted as the highest accumulator. However, no further significant differences were found between the other clones. While for the above mentioned elements, biomass production was found to be the principle determinant in the total uptake, this was not the case for Pb. The amount of lead uptake differed significantly between the two groups but in the opposite direction: the LBP group accumulated significantly more Pb compared to the HBP group. The As and Cr content was found to be below the quantification limit. The amount of metal in the leachates was low, in the order of the ‰. No significant differential lixiviation could be found between the clones. Similarly, the metal leachate rate of the NP containers did not differ from that of the planted containers.

3.4 Chlorophyll fluorescence

The HBPs displayed significantly higher F_o and F_m values than the LBPs. However, and despite the fact that the F_v values were also significantly different between the two groups, F_v/F_m values were found not to be significantly different between the two groups (Table 3). A similar trend was observed for the measurements performed in July and August (results not shown).

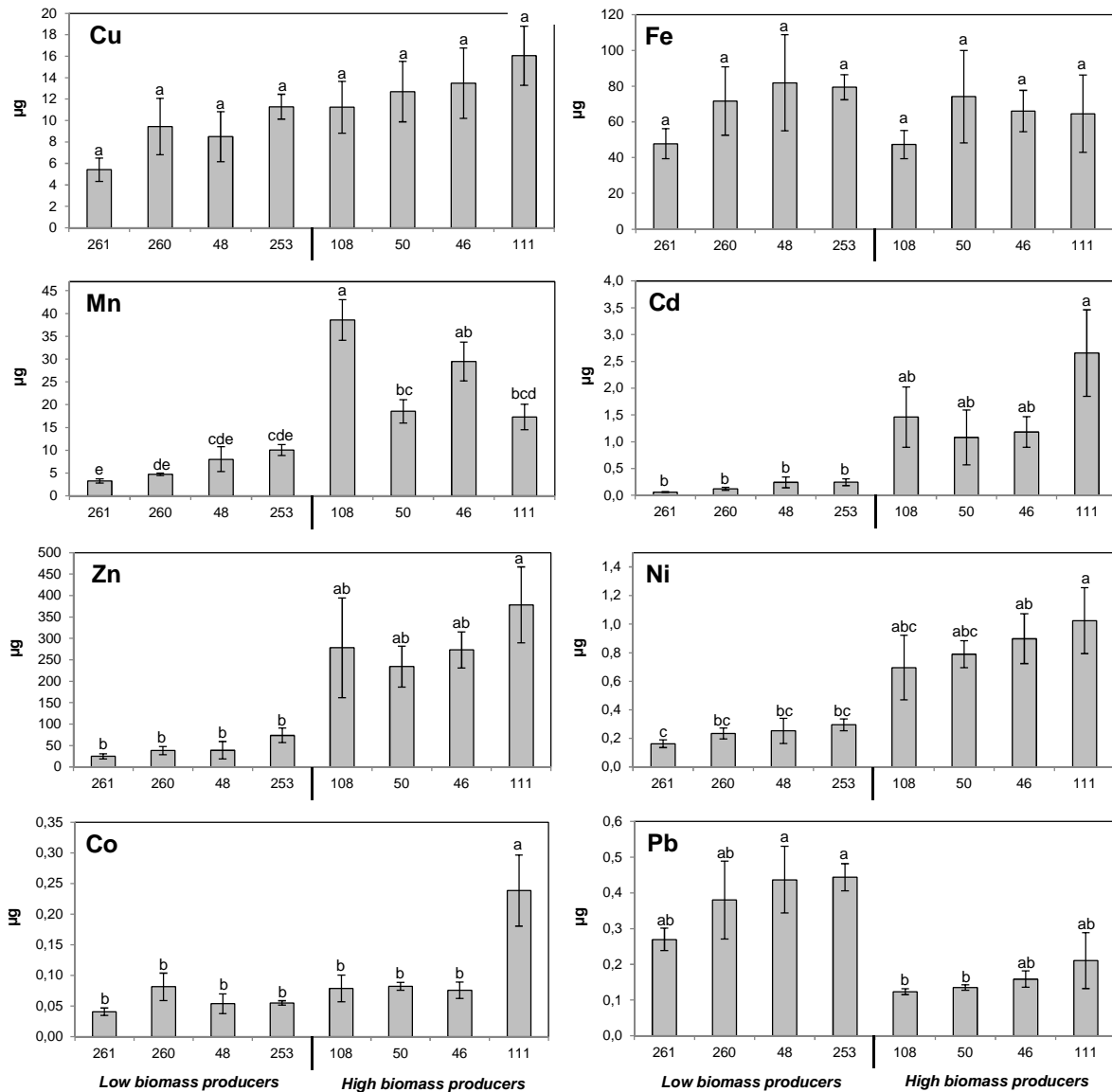


Figure 3: Total amount of metal (μg) accumulated in the annual twigs of the low and high biomass producers ($n=3$). Letters represent the Tukey test results. Means that do not share the same letter are significantly different ($p<0.05$). Bars represent standard error of mean (SE).

Table 3: Chlorophyll fluorescence parameters in low and high biomass producers (mean \pm standard error of mean (SE)) in July 2010. F_0 : minimal chlorophyll fluorescence yield obtained with dark-adapted leaves; F_m : maximal chlorophyll fluorescence yield obtained with dark-adapted leaves; F_v : maximum variable fluorescence emission; F_v/F_m : maximal PSII efficiency. Letters represent the Tukey test results comparing the groups. Means that do not share the same letter are significantly different.

	Ecotype	F_0		F_m		F_v		F_v/F_m					
Low biomass producers	261	0.1320	\pm 0.0047	a	0.5571	\pm 0.0168	a	0.4251	\pm 0.0170	a	0.7606	\pm 0.0111	a
	260	0.1279	\pm 0.0041	a	0.5622	\pm 0.0128	a	0.4343	\pm 0.0100	a	0.7726	\pm 0.0046	a
	48	0.1216	\pm 0.0023	a	0.5445	\pm 0.0106	a	0.4229	\pm 0.0088	a	0.7767	\pm 0.0026	a
	253	0.1250	\pm 0.0042	a	0.5661	\pm 0.0153	a	0.4411	\pm 0.0117	a	0.7796	\pm 0.0035	a
High biomass producers	108	0.1567	\pm 0.0041	b	0.7271	\pm 0.0105	b	0.5704	\pm 0.0078	b	0.7845	\pm 0.0038	a
	50	0.1695	\pm 0.0054	b	0.7519	\pm 0.0137	b	0.5824	\pm 0.0122	b	0.7744	\pm 0.0063	a
	46	0.1651	\pm 0.0035	b	0.7453	\pm 0.0112	b	0.5802	\pm 0.0100	b	0.7785	\pm 0.0043	a
	111	0.1692	\pm 0.0062	b	0.7201	\pm 0.0146	b	0.5509	\pm 0.0113	b	0.7655	\pm 0.0063	a

3.5 Carbohydrate content

The main carbohydrates quantified in the leaves of the different clones were glucose, fructose, sucrose and galactose (Supplemental Figure 5). For sucrose, no significant differences could be detected between the clones. Furthermore, no significant difference was found between the groups for the concentrations of the other sugars. Clone 46 showed a significantly higher accumulation of glucose, fructose and galactose compared to the other HBPs. The other high biomass producers did not seem to accumulate more of these sugars compared to the low biomass producers.

3.6 Proteomics

Eighty-five proteomic spots appeared to be differentially expressed between the high and low biomass producers (fold change of <-1.5 or >1.5 and t-test $p < 0.05$) (Supplemental Figure 6). A principal component analysis (PCA) using the gel images enabled a good segregation of the low and high biomass producers (Figure 4). The PC1 axis explains 74.8% of the total variability. Low biomass producers clustered more closely together than did the high biomass producers; clone 111 was relatively separated from the others in the HBP group. These 85 spots were excised from the gel and used for protein identification, which resulted in the significant identification of proteins in 66 spots (Supplemental Table 5). After exclusion of those spots in which more than one protein was identified, 39 spots could be used for biological interpretation (Table 4). Of these 39 spots, 11 spots showed a significant increase in abundance in the HBPs in relation to the following functions: proteolysis mechanisms (2), protein folding (1), pathogenesis-related proteins (1), photosynthesis (3), carbon metabolism (1), chloroplastic protein translation (1), Mn binding and nutrient reservoir activity (2). Most of the differentially expressed proteins (28) were, however, found to be more abundant in low biomass producers in relation to the following functions: proteolysis mechanisms (2), protein folding (1), photosynthesis (9), electron transport (1), carbon metabolism (1), glutamine biosynthesis (1), ATP synthesis and proton transport (2), oxidative stress response (1), ion transport in defence response (2), Mn binding and nutrient reservoir activity (6) and miscellaneous (2).

Table 4 (Part I): Spots that change significantly when comparing the proteome of the high- versus the low-biomass producing clones. The data resulting in these identifications is shown in Supplemental Table 5.

Spot Nr ^{a)}	Function/protein name ^{b)}	NCBI Accession ^{c)}	t-test ^{e)}	Av. Ratio ^{f)}
Proteolysis				
707	Kunitz trypsin inhibitor (<i>Populus balsamifera</i>)	291327421	0.025	3.5
767	Kunitz trypsin inhibitor 4 (<i>Populus balsamifera</i>)	226232177	0.03	21.06
621	Putative cysteine protease (<i>Ricinus communis</i>)	255538210	0.038	-1.68
340	Putative aspartic proteinase nepenthesin-2 precursor (<i>Ricinus communis</i>)	255548662	0.021	-2.05
Protein folding				
648	Chaperonin (<i>Zea mays</i>) mitochondrial	195623400	0.012	-2.13
649	Chaperonin (<i>Zea mays</i>) mitochondrial	195623400	0.046	1.9
Pathogenesis-related proteins				
647	Partial pathogenesis-related thaumatin (<i>Populus deltoides</i>)	270271313	0.029	2.7
Photosynthesis				
412	Chloroplast PsbO4 precursor (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	384038819	0.033	1.5
636	Chloroplast light harvesting chlorophyll a/b binding protein (<i>Populus euphratica</i>)	158523323	0.03	1.77
691	Chlorophyll a-b binding protein 3, chloroplastic (LHCII type I CAB-3) (LHCP)	158523323	0.00085	3.53
445	Chloroplast PsbO4 precursor (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	384038819	0.017	-2.46
449	Chloroplast PsbO4 precursor (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	384038819	0.046	-2.49
490	Chloroplast PsbO4 precursor (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	384038819	0.019	-1.7
491	Chloroplast PsbO4 precursor (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	384038819	0.023	-1.54
499	Predicted oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic (<i>Vitis vinifera</i>)	225468761	0.041	-1.62
495	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplast precursor (OEE1)	302595735	0.03	-1.82
527	33 kDa precursor protein of the oxygen-evolving complex (<i>Salicornia europaea</i>)	197691939	0.022	-1.94
358	Photosystem II stability/assembly factor HCF136, chloroplast	255559812	0.0018	-1.94
870	Photosystem I reaction centre subunit IV A (<i>Medicago truncatula</i>)	357510347	0.049	-1.78
Electron transport				
1007	Plastocyanin a (<i>Populus nigra</i>)	929813	0.0083	-1.57
Carbon metabolism				
302	Phosphoribulokinase (<i>Pisum sativum</i>)	1885326	0.0059	1.91
396	Malate dehydrogenase (<i>Glycine max</i>)	3193222	0.016	-1.96
Glutamine biosynthesis				
311	Glutamine synthetase (<i>Nicotiana tabacum</i>)	1419094	0.034	-2.32
ATP synthesis coupled H transport				
155	Chloroplast ATP synthase beta chain (<i>Isotachis lyallii</i>)	49182424	0.002	-1.92
189	Mitochondrial beta subunit of F1 ATP synthase (<i>Populus trichocarpa</i>)	224111564	0.0043	-2.25

^{a)} Spot number.

^{b)} Function of the protein obtained using MASCOT-server on a ProteinPilot platform (ABSciex) against the NCBI *Viridiplantae* database and the EST *viridiplantae* database.

^{c)} Accession number from the NCBI nr database, where a protein has been identified based on the EST database or where the identified protein has a trivial name, the found sequence was blasted and the protein with the highest homology is given.

^{d)} P-value of the t-test for the biomass producer group factor ($p < 0.05$, t-test).

^{e)} Average ratio of the spot intensity (high biomass producers/low biomass producers). Positive ratio values are given as such, while negative values are given according to the following formula: given value = $-1/\text{average ratio}$

Table 4 (Part II) : Spots that change significantly when comparing the proteome of the high- versus the low-biomass producing clones. The data resulting in these identifications is shown in Supplemental Table 5.

Spot Nr ^{a)}	Function/protein name ^{b)}	NCBI Accession ^{c)}	t-test ^{e)}	Av. Ratio ^{f)}
Translation				
706	Predicted 30S ribosomal protein 2, chloroplastic-like (<i>Glycine max</i>)	356557128	0.038	1.75
Response to oxidative stress				
883	Copper/zinc-superoxide dismutase (<i>Oryza sativa Japonica Group</i>)	218226	0.014	-1.86
Ion transport, defence response (bacterium, stress)				
549	Porin/voltage-dependent anion-selective channel protein (<i>Populus trichocarpa</i>)	224071317	0.0029	-1.79
500	Porin/voltage-dependent anion-selective channel protein (<i>Populus trichocarpa</i>)	224141349	0.0018	-2.46
Mn binding				
800	Germin-like protein (<i>Chimonanthus praecox</i>)	157058854	0.008	1.82
808	Germin-like protein (<i>Chimonanthus praecox</i>)	157058854	0.009	1.55
522	Rhcadhesin receptor Germin-like protein; Flags: Precursor	18203442	0.0014	-3.33
623	Putative auxin-binding protein ABP19a precursor (<i>Ricinus communis</i>)	255560629	0.047	-2.47
666	Putative auxin-binding protein ABP19a precursor (<i>Ricinus communis</i>)	255560629	0.025	-2.53
668	Putative auxin-binding protein ABP19a precursor (<i>Ricinus communis</i>)	255560629	0.03	-2.18
688	Putative auxin-binding protein ABP19a precursor (<i>Ricinus communis</i>)	255560629	0.013	-2.59
699	Putative auxin-binding protein ABP19a precursor (<i>Ricinus communis</i>)	255560629	0.041	-1.58
Miscellaneous				
964	Light-inducible protein ATLS1 (<i>Elaeis guineensis</i>)	192910730	0.043	-1.5
442	Putative SHOOT1 protein (<i>Oryza sativa Japonica Group</i>)	50509325	0.0081	-2.33

^{a)}Spot number.

^{b)}Function of the protein obtained using MASCOT-server on a ProteinPilot platform (ABSciex) against the NCBI *Viridiplantae* database and the EST viridiplantae database.

^{c)}Accession number from the NCBI database, where a protein has been identified based on the EST database or where the identified protein has a trivial name, the found sequence was blasted and the protein with the highest homology is given.

^{d)}P-value of the t-test for the biomass producer group factor ($p < 0.05$, t-test).

^{e)}Average ratio of the spot intensity (high biomass producers/low biomass producers). Positive ratio values are given as such, while negative values are given according to the following formula: given value = $-1/\text{average ratio}$

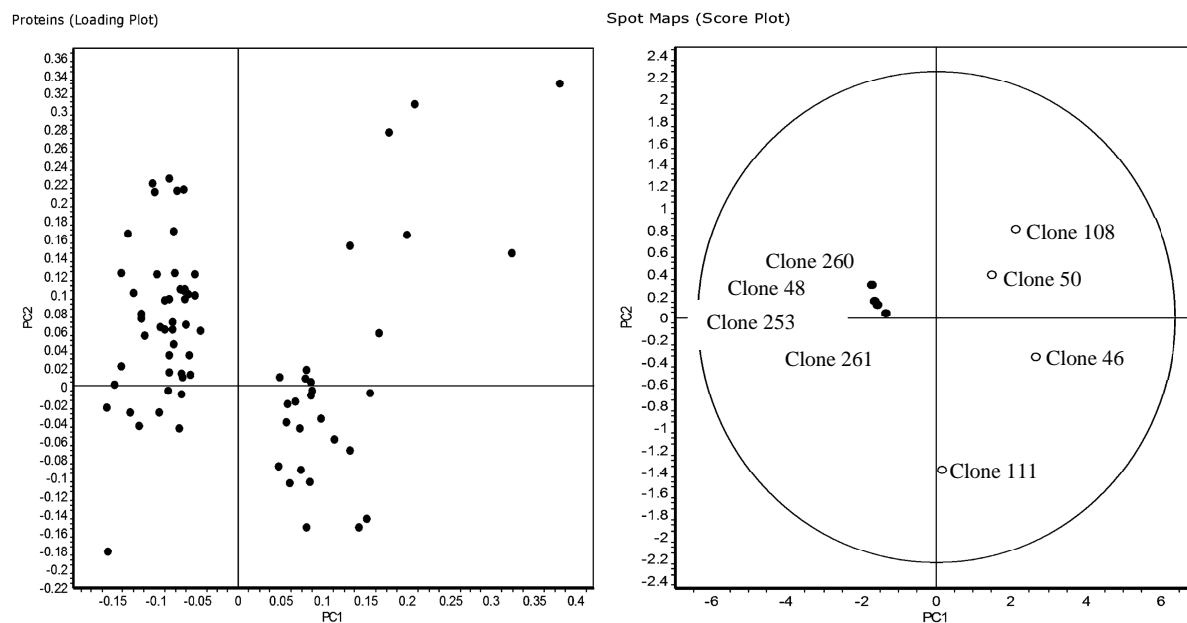


Figure 4: PCA analysis of differentially expressed protein spots between the two biomass producer groups ($p < 0.05$, t-test). The left-hand panel shows the distribution of the proteins according to the two principal components (PC1 (74.8%) and PC2 (9.7%), explaining a cumulated 84.5% of all the variations). The right-hand panel shows the PCA results based on the gel images after 2D electrophoresis. Black circles indicate low biomass producers. White circles indicate high biomass producers.

4. Discussion

For the present study, 26 different willow clones (*Salix fragilis* x *alba*) were exposed to a mixture of heavy metals in dredging sludge. The clones were selected with the aim of representing a large geographical zone in Belgium. The purpose of this study was to compare the physiological and proteomic responses of the different clones once planted in contaminated substrate. Mineral analysis of the used substrate showed high concentrations of Zn and Pb (respectively 1200 and 333 mg.kg⁻¹) and differences in the biological availability of the different metals ranging from less than 1% (Cr, Fe) to more than 50% (Cd, Pb) (Table 1). A general low mobility of the metals was found to be linked to the alkaline pH of the substrate. The high content of organic matter in the substrate as well as the relatively high concentrations of Ca might have played a role in the low mobility of the different metals.

The idea of using high biomass producers such as willow or poplar as vegetative cover on polluted soils emerged from the fact that high total accumulation of metals can be attained while the concentrations in the plant tissues remain relatively low (Dickinson, 2000; Meers *et al.*, 2005, 2007; Rosselli *et al.*, 2003). Previous studies have indicated that when aiming for phytoremediation, total biomass production is one of the main criteria used in selecting plants. In the present study, Gupta's multiple comparison represented the most appropriate test for statistical analysis of the biomass production of the plants. This test allows the discrimination of clones that produce significantly more biomass than others (Gupta, 1965; Dagnelie, 2011). After applying the Gupta comparison test, 4 clones (108, 50, 48 and 111) were categorized within the "high biomass producers" group (HBPs) (Figure 2). For comparison, 4 clones were selected to form a second group of "low biomass producers" (LBPs) (clones 261, 260, 48 and 253). It must be emphasized that the clones were ranked regarding their annual biomass production; therefore the description of the high and low biomass producer groups is relative and does not depend on a comparison to a "standard willow biomass". Three parameters were measured in the leaves of our two groups: chlorophyll fluorescence, carbohydrate content, and proteomic profile. Furthermore, the differences in metal uptake in annual twigs in the two groups were compared.

Cu and Fe contents in the annual twigs were found to be higher in the LBP than in the HBP group (results not shown). However, when metal uptake (μg) was calculated by multiplying the measured metal content ($\mu\text{g.g}^{-1}$ dry weight) by biomass production (g dry weight), the uptake of these metals was found not to differ between the two groups. On the other hand, the total Cd, Zn, Ni uptake was greater in the HBPs in comparison with the LBPs. When statistical analysis was performed on metal accumulation in the two groups, the LBPs were found to cluster separately from the HBPs based on the low total accumulation of these three elements. By contrast, HBP clone 111 accumulated systematically high level of most of the metals, and was statistically separated from clones 108, 50 and 46, which formed a "subgroup" between the two extremes. Thus, our results showed that elevated biomass production led to an increase in the total uptake of Cd, Zn and Ni in plants, but that,

nevertheless, the metal content in the annual twigs remained low. This kind of result has been previously obtained (Greger and Landberg, 2001; Ekvall and Greger, 2003) and has been explained as a dilution effect. In the present study, for Zn and Ni, these results seemed to be solely determined by the produced biomass, while for Cd, a different metal accumulation pattern seemed to contribute to the high total amount of accumulated element. On the other hand, Pb content in twig tissues was found to be so high in the LBPs ($3.93 \mu\text{g Pb}\cdot\text{g}^{-1}$ against $0.26 \mu\text{g/g}^{-1}$ in the HBPs) that the dilution effect was not seen and the total uptake of this metal was higher in the LBPs. The Pb content in tissues of the annual twigs was the most notable observation here, but similar high Pb concentrations have been previously observed in *Salix viminalis* grown on dredging sludges (Meers *et al.*, 2005). Numerous studies have concluded that, for successful phytoremediation, it is generally beneficial to select plants that show high biomass production combined with a limited accumulation of metals. In the present study, this was shown to be the case for most of the elements, but not for Pb.

At the proteomic level, the LBPs showed a significantly higher abundance of two proteins linked to oxidative stress responses, in comparison with the HBPs: Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) (spot 883) and glutamine synthetase (spot 311). An excess of metals is known to induce both oxidative stress and defence reactions (Bertrand and Poirier, 2005). Cu/Zn SOD is a key enzyme in antioxidant defence and it maintains oxidative homeostasis by catalysing the reduction of superoxide anions into hydrogen peroxide. Similarly, studies have shown SOD upregulation in plants exposed to metals and abiotic stress (Bertrand and Poirier, 2005; Bhaduri and Fulekar, 2012; Hossain *et al.*, 2012a). Glutamine synthetase is an enzyme that plays a role in nitrogen assimilation from glutamate and thus in the biosynthesis of glutamine. This process is one way to prevent GSH (glutathione) depletion by metals and as such to limit the generation of reactive oxygen species (ROS) (Jozefczak *et al.*, 2012). The increased expression of glutamine synthetase has also been demonstrated in the presence of Cd (Semane *et al.*, 2010). In the present study, the increased abundance of these two enzymes, Cu/Zn SOD and glutamine synthetase, in the leaves of LBPs suggests that these plants were having problems coping with the increased oxidative pressure exerted by the presence of high concentrations of metals, and that Pb could be a major contributor to this pressure. Pb disturbs proteomic activity, especially that of enzymes containing sulphhydryl groups, and it is known to induce antioxidant mechanisms (Sharma and Dubey, 2005; Pourrut *et al.*, 2011). This results in the inhibition of growth and of photosynthesis as well as in deviations in mineral nutrition and water balance (Jiang *et al.*, 2010; Pourrut *et al.*, 2011; Shahid *et al.*, 2012). Our results corroborate previous findings that metals induce ROS in LBPs and that these clones are able to control protein synthesis in response to stress (Semane *et al.*, 2010; Villiers *et al.*, 2011; Hossain *et al.*, 2012b).

Chlorophyll fluorescence is commonly used to measure the impact of stress on plant metabolism (Lazar, 1999; Linger *et al.*, 2005). The parameter F_0 (minimal fluorescence) is the basal emission from excited chlorophyll molecules of the light harvesting antenna in photosystem II (PSII), which occurs before the excitation of the reaction centres (RCII). This energy transfer is one of the

loss processes to reach equilibrium and it leads to fluorescence emission (Lazar, 1999; Mallick and Mohn, 2003). Maximal fluorescence (F_m) is the fluorescence emitted when all primary quinone electron acceptors in PSII (Q_A) are reduced. F_v/F_m is the efficiency of the photochemical reaction of PSII in the dark-adapted state and it generally decreases in stress conditions (Maxwell and Johnson, 2000). In the present study, no difference was observed in the F_v/F_m ratio between our two groups (Table 3). The light absorbed by PSII was used with equal efficiency in the photochemistry of all the plants in the two groups and, thus, we can conclude that both HBPs and LBPs have the same photochemical capacity of PSII (Maxwell and Johnson, 2000; Baczek *et al.*, 2011). However, in the present study, significantly higher F_o and F_m values, but also a significantly higher variable fluorescence (F_v), were determined for the HBP group compared to the LBP group. Furthermore, our proteomic analyses revealed that 2 light harvesting chlorophyll a/b binding proteins (LHCPs) (spots 636, 691) were more abundant in the HBPs. LHCPs constitute one of the most abundant chloroplastic pigment-protein complexes in plants that can be linked to photosystem I (LHCI) and II (LHCII). The main function of LHCPs is the collection of light energy and its optimal transfer to the photosynthetic reaction centres (Horton *et al.*, 1996; Krüger *et al.*, 2011; Belgio *et al.*, 2012; Xia *et al.*, 2012). Nevertheless, in general, stress-induced changes are linked to decreases in F_m values and to a decline of F_v/F_m . However, in the current study F_o and F_m values varied in the same direction when comparing LBPs and HBPs, so that, ultimately, no significant changes in F_v/F_m were observed between the two groups. Based on the literature, there is no clear link between light harvesting chlorophyll (LHC) abundance, F_o and F_m . In the present study, the higher F_o and F_m values found in HBPs could have resulted from a higher abundance of chloroplasts and thus of LHCPs (Linger *et al.*, 2005). Moreover, it is notable that 7 of the 9 spots in which proteins with a functional relationship with photosynthesis was identified (spots 445, 449, 490, 491, 495, 499, 527) contain the same protein, i.e. 33kDa oxygen-evolving enhancer protein, and were of higher abundance in the LBPs. PSII is a multi-subunit protein complex schematically composed of RC, LHCII and extrinsic oxygen-evolving complex (OEC). The function of PSII is to harvest solar energy used for water oxidation. This reaction takes place in the OEC (Wales *et al.*, 1989; Yamamoto, 2001; Pérez-Bueno *et al.*, 2011). Three extrinsic proteins, PsbO, PsbP and PsbQ, constitute the subunits of the OEC, which are also known as OEC33, OEC24 and OEC18, respective to their molecular masses. OEC33 plays a role in oxygen evolution and in stabilizing the catalytic Mn cluster. It helps the functional binding to PSII of OEC18 and 24, involved in the retention of Ca and Cl ions, essential cofactors for oxygen evolution (Seidler, 1996; Henmi *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2011; Perez-Bueno *et al.*, 2011). PSII is the primary site of stress-related damage and has previously been shown to be affected when plants are exposed to various abiotic stresses such as excess light, heat and metals such as Cd, Zn and Pb (Seregin and Ivanov, 2001; Bertrand and Poirier, 2005; Sharma and Dubey, 2005; Yamamoto *et al.*, 2008; Perez-Bueno *et al.*, 2011). Indeed, it has been shown that, in fact, Zn and Pb are able to inhibit oxygen evolution by substituting Ca^{2+} , Cl^- and Mn^{2+} and by dissociating the OEC (Miles *et al.*, 1972; Rashid and Popovic,

1990; Rashid *et al.*, 1994; Seidler, 1996; Bertrand and Poirier, 2005; Sharma and Dubey, 2005). Leuschner and Bricker (1996) also demonstrated that damage to the Mn cluster alters the binding affinity of the 33 kDa extrinsic protein to photosystem II. Variable fluorescence F_v of tomato, spinach and pea has also been compared in the presence of Pb (Miles *et al.*, 1972; Parys *et al.*, 1998). The authors showed that Pb caused a decrease in F_v although the ratio F_v / F_m was not greatly affected. These results were explained by a clear decrease in activity on the oxidising side of PSII, i.e. the side where OEC33 proteins are located. A decrease in F_v is also mentioned in Horvath *et al.* (1996) for plants exposed to Cd. In that study, the observed variation in these parameters was linked to a destabilization of the assembly of photosystem II and particularly the inhibition of the oxygen evolving reactions of PSII. Under stresses such as excess of light and heat, it has also been shown that most damage is caused by ROS in the reaction centre-binding D1 protein of PSII. The damaged D1 protein is subsequently degraded. OEC33 would protect the D1 protein from the action of ROS and aid in maintaining the structure of the PSII when D1 protein is degraded. Concurrently with the degradation of the D1 protein, the OEC subunits are liberated from PSII (Yamamoto, 2001; Henmi *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2011; Perez-Bueno *et al.*, 2011). Lead probably has an impact on the fluorescence parameters in LBPs. It would not be surprising if this impact were enhanced by a combination of the effects of the different metals in LBPs. The fluorescence changes observed in the present study are in agreement with those described in the literature. The decrease in F_v is linked to the inability of the plant to incorporate the functional protein complexes of PSII and is thus also linked to the destabilization of the complex (Horvath *et al.*, 1996). This alteration in the assembly of PSII might have resulted in the increased abundance of the OEC subunit in our case.

In addition, in the present study, an electron transport-related protein (spot 1007) was also found to be more abundant in LBPs. Similarly, malate dehydrogenase (spot 396) and the mitochondrial beta subunit of F1 ATP synthase (spot 189) were also found to be more abundant in LBPs. Malate dehydrogenase is a key enzyme in the citric acid cycle which catalyses the oxidation of malate into oxaloacetate. Mitochondrial ATP synthase plays a role in ATP synthesis coupled with proton transport in the TCA cycle. Other studies have shown that exposure to Cd results in increased levels of malate dehydrogenase at the protein and transcript level (Sävenstrand and Strid, 2004; Villiers *et al.*, 2011). Mitochondria are primary generators of ROS. Thus, mitochondrial components involved in the TCA cycle and in ATP synthesis are highly susceptible to oxidative damage, which could hinder normal electron flow to oxygen (Qin *et al.*, 2009).

In the present study, leaf carbohydrate content was found not to differ significantly between the two groups. Clone 46 showed systematically a higher glucose, fructose and galactose content. However, enzymes involved in sugar metabolism were differentially expressed in the HBPs and LBPs. Phosphoribulokinase (spot 302), a Calvin cycle enzyme associated with chloroplasts, catalyses the synthesis of ribulose 1,5-bisphosphate, the 5C sugar-phosphate substrate for CO₂ fixation, requiring ATP from the chloroplast ATP synthase (Salvucci *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2009). Our analyses

showed more abundant phosphoribulokinase in HBPs but a 1.92 fold lower abundance of chloroplastic ATP synthase beta chain (spot 155) compared with the LBPs.

Another proteomic response, which could be linked to increasing ROS generation in LBPs, is the presence of proteins involved (i) in response to biotic and abiotic stresses (Kunitz trypsin inhibitor proteins (707, 767), pathogenesis-related thaumatin (647), porin/voltage-dependent anion-selective channel protein (VDAC) (spots 500, 549)) (Neiman *et al.* 2009; Qin *et al.*, 2009; Zhao and Su, 2010) (ii) but also in senescence or programmed cell death (PCD) (cysteine protease (621) and aspartic proteinase (spot 340)) (Eason *et al.*, 2002; Semane *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2012). Unlike Kunitz trypsin inhibitor proteins and pathogenesis-related thaumatin, cysteine proteases, aspartic proteinases and porin/voltage-dependent anion-selective channel proteins (VDACs) have been found to be more abundant in LBPs than in HBPs. The cysteine proteases and aspartic proteinases have also been found to become upregulated in response to oxidative stress linked, for example, to Cd exposure (Kieffer *et al.*, 2008; Semane *et al.*, 2010). When metals induce oxidative stress, programmed cell death related proteins may become upregulated (Sävenstrand and Strid, 2004; Kovalchuk *et al.*, 2005). Germin-like proteins (spots 800, 808) and auxin-binding protein ABP19a (spots 623, 666, 668, 688, 699), also a germin-like protein (Bernier and Berna, 2001; Woo *et al.*, 2002), have been shown to be differentially accumulated in LBPs and HBPs. Most of these proteins have been found to be more abundant in LBPs than in HBPs. Kovalchuk *et al.* (2005) found that two different germin-like protein genes were upregulated in the presence of Cd. A wide number of functions have been attributed to these proteins, which are thought to have a superoxide dismutase and sometimes oxalate oxidase activity (an enzyme that degrades oxalate into CO₂ and H₂O₂) (Bernier and Berna, 2001; Patniak and Khurana, 2001). According to the Uniprot Database and to Patniak and Khurana (2001), these proteins might also be induced in response to the presence of ROS. These results corroborate the presence of ROS in the LBP which is translated by stress proteins such as antioxidant enzymes but also by proteases. Nevertheless, the LBP plants were able to control protein synthesis to cope with cellular damages, to limit the impact of ROS formation and to maintain cellular functions. Lastly, we can hypothesize that the plant costs allocated to defence and replacement mechanisms were different between the LBP and the HBP. The metabolic disturbance could have led to a lower production of biomass without affecting the plant survival in the LBP (Jiang *et al.*, 2010; Semane *et al.*, 2010; Villiers *et al.*, 2011; Hossain *et al.*, 2012a).

5. Conclusion

The current study compared the biomass produced by 26 clones, *Salix fragilis x alba*, growing on polluted substrate. Statistical evaluation, using a Gupta's test of the biomass produced by the different clones, resulted in the delineation of two groups. One group of four clones producing a high biomass (HBP) and a mirror-group of four clones producing a low-biomass (LBP), these groups were used in a more detailed physiological and proteomics study. Although the HBPs and LBPs were grown in the

same substrate, the two groups showed notable differences, especially in terms of their metal uptake and proteomic response. HBP clones accumulated more Cd, Zn, Ni and Mn in their annual twigs but, due to the so-called dilution effect, succeeded in keeping the absolute concentrations of these elements low. In contrast, lead concentrations in the twigs of the LBPs plants were that high that in spite of a lower biomass production the total amount of extracted Pb was higher compared to HBPs. Thus, our results show that high biomass production is not always linked to elevated metal extraction. . Based on PCA-analysis, differences were also noticed in the proteomic response and, the different clones clustered as previously observed with the twig metal content. Both groups showed an increased abundance of proteins that are generally induced in the presence of ROS. In the LBP clones specific proteins involved in antioxidant defence mechanisms were in higher abundance, while not in the HBP plants. From this, we can hypothesize that the higher concentrations of metals in the twigs of the LBPs resulted in the occurrence of a stress *via* a more pronounced oxidative stress response. This hypothesis is supported by the fact that Pb was one the metals found to be highly accumulated in the LBPs. Nevertheless, the LBPs were capable of maintaining cellular activity. Furthermore, lower F_o , F_m and F_v values linked to an abundance of the extrinsic protein OEC33 could be explained as an effect of the high concentration of Pb. Although the combined effect of the elements is probably more important than the response to one specific element. Nevertheless, the fluorescence parameters varied such that no F_v/F_m changes were observed between the groups. Thus, within the two groups, the light absorbed by PSII was used with equal efficiency in the photochemistry of all the plants. Overall, these results showed that the group of low biomass producers are able to cope with the metal stress.

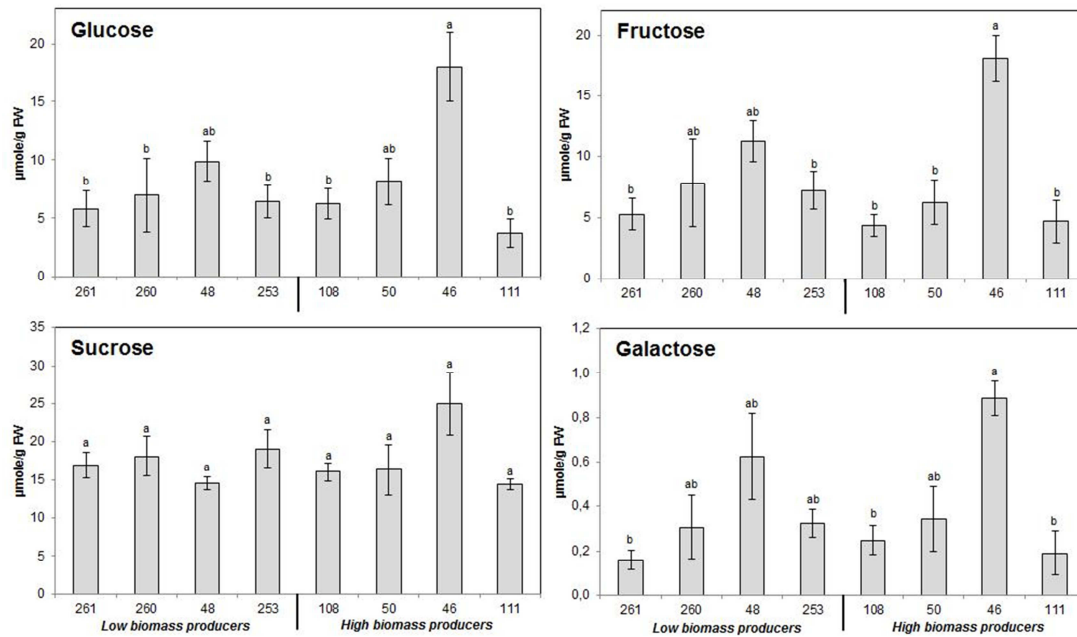
The most notable observation in the present study was the unexpected high concentration of Pb in the low biomass producers. Further research is needed to unravel whether the events described here were mainly due to high contents of Pb in the LBPs or rather the result of the effects of the mixture of metals to which the plants were exposed. Given the polymetallic constraint that is generally observed in real-life polluted soils, the detection of one metal as the main limiting factor for growth could be important in improving the selection of plant material for phytoremediative initiatives.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge financial support from the project Ecolirimed, co-financed by the Fonds Européen de Développement Régional as part of the program Interreg IV A 'Grande Région'. This study was also supported by the National Research Fund, Luxembourg as part of the project ENERREM-CORE call 2008. We thank Paul-Henry Fally and Yves Libert (Direction des recherches hydrauliques (DGO2), Service Publique de Wallonie) for supplying the dredging sludge, the Unité de Génie biologique of the Centre wallon de Recherches agronomiques (Belgium) for supplying the willow plants and the Unité de Statistique, Informatique et Mathématique appliquées of Gembloux Agro-Bio Tech (Université de Liège, Belgium). We also thank BEAGx (GxABT, ULg) for elemental analysis of the soil. We acknowledge Dr Lucien Hoffmann from the CRP Gabriel Lippmann for his

careful reading of the manuscript, Johanna Ziebel for the elemental analyses, Laurent Solinhac for his continuous help and Sébastien Planchon for his support during the proteomics experiments. The authors declare no financial/commercial conflicts of interest.

Carbohydrate content results are given as Supplemental Figure 5.



Supplemental Figure 5: Glucose, fructose, sucrose and galactose content in leaves of the low and high biomass producers ($\mu\text{mole.g}^{-1}$ of fresh matter). (n=3). Letters represent the Tukey test results. Means that do not share the same letter are significantly different ($p < 0.05$). Bars represent standard error of mean (SE).

Conclusion du point III

Dans notre première expérience, les clones de saules ont pu croître dans le même substrat contaminé aux métaux mais ils ont produit différentes quantités de biomasse (cf. point I). Deux groupes de saules ont pu être déterminés : les forts producteurs de biomasse (HBP pour high biomass producers) et les faibles producteurs de biomasse (LBP pour low biomass producers). L'objectif de ce troisième point était de comparer la tolérance en utilisant des approches physiologique (fluorescence chlorophyllienne (F_o , F_m et F_v/F_m), des teneurs foliaires en sucres) et protéomique (expression de protéines) entre ces deux groupes.

Nos résultats indiquent que les teneurs en plomb sont importantes chez les LBP. Nous pouvons également constater que, pour les LBP, les teneurs en cuivre, fer et zinc sont relativement proches des teneurs phytotoxiques indiquées dans la littérature (cf. Discussion du point I). Les mesures physiologiques n'indiqueraient toutefois pas une moindre tolérance aux métaux des LBP par rapport aux HBP. Les deux groupes induisent des protéines impliquées dans le système de défense antioxydatif. Cependant, celles-ci sont plus abondantes chez les LBP. L'analyse des protéines indique une possible altération de l'assemblage du photosystème II chez ces derniers. Cependant, ceci n'aurait pas plus de répercussions sur l'efficacité photochimique des LBP par rapport à celle des HBP. Les LBP sont donc autant tolérants que les HBP bien que les LBP aient investi davantage d'énergie dans les mécanismes de tolérance. Cet investissement plus important pourrait être une cause de la distinction des quantités de biomasse produites. L'absence de situation contrôle ne nous permet pas de confirmer cette hypothèse au terme des deux premiers essais. Toutefois, les résultats obtenus lors du dernier essai avec un témoin, abondent dans ce sens (point IV). Enfin, dans ce point III, nous avons pu constater que, bien que les teneurs en métaux dans les tiges soient faibles chez les HBP (cf. point I), grâce à la production élevée de biomasse, la quantité extraite est plus importante par rapport aux LBP pour le cadmium, le zinc et le nickel.

IV. Tolérance d'un phytoextracteur potentiel dans un contexte de phytoremédiation.

Lors du criblage de 2010, un clone, le clone 47 (*Salix aurita*), a été mis en évidence car il présentait un rendement de biomasse proche des forts producteurs et les teneurs les plus importantes pour la plupart des métaux. D'un point de vue phytoremédiation, ce clone paraît être le meilleur candidat parmi ceux testés. Toutefois, présente-t-il des symptômes de stress par rapport à un clone ayant produit la même biomasse mais qui accumule des teneurs en métaux moins importantes (clone 45, *S. fragilis*) ? L'objectif du point IV est de présenter les résultats de cette étude comparative des réponses physiologiques et protéomique de ces deux clones après les avoir plantés dans un substrat artificiellement contaminé aux métaux (Figure III). Ce point est présenté sous forme d'article : « *A multiple-level study of metal tolerance in Salix fragilis and Salix aurita clones* ».

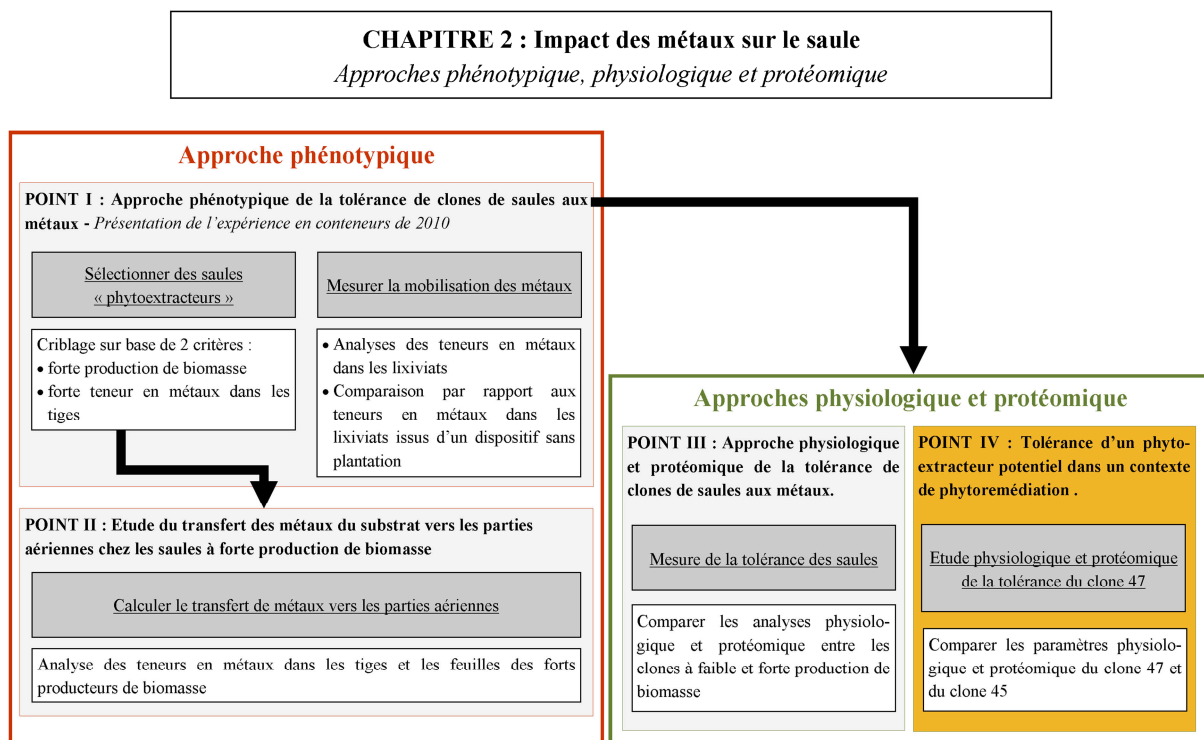


Figure III : Objectifs du point IV (fond orange).

Article :

A multiple-level study of metal tolerance in Salix fragilis and Salix aurita clones.

Aricia Evlard^{a*}, Kjell Sergeant^b, Bruno Printz^b, Jenny Renaut^b, Cedric Guignard^b, Bruno Campanella^a, Roger Paul^a, Jean-Francois Hausman^b,

^aLaboratoire de Toxicologie environnementale, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liège, 2, passage des Déportés, B-5030 Gembloux, Belgium

^b Centre de Recherche Public — Gabriel Lippmann, Department of Environment and Agrobiotechnologies, 41, rue du Brill, L-4422 Belvaux, Luxembourg

A soumettre.

A multiple-level study of metal tolerance in *Salix fragilis* and *Salix aurita* clones.

Aricia Evlard^{a*}, Kjell Sergeant^{*b}, Bruno Printz^b, Cédric Guignard^b, Jenny Renaut^b, Bruno Campanella^a, Roger Paul^a, Jean-Francois Hausman^b

^aLaboratoire de Toxicologie environnementale, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liège, 2, passage des Déportés, B-5030 Gembloux, Belgium

^b Centre de Recherche Public — Gabriel Lippmann, Department of Environment and Agrobiotechnologies, 41, rue du Brill, L-4422 Belvaux, Luxembourg

Kjell Sergeant: sergeant@lippmann.lu

Bruno Printz: printz@lippmann.lu

Jenny Renaut: renaut@lippmann.lu

Cedric Guignard: guignard@lippmann.lu

Bruno Campanella : Bruno.Campanella@ulg.ac.be

Roger Paul : roger.paul@ulg.ac.be

Jean-Francois Hausman: hausman@lippmann.lu

*Equal contributors

Corresponding author : Aricia Evlard

Tel.: +32 81 622 494; fax: +32 81 600 727

E-mail address: aevlard@gmail.com

Abbreviations

reactive oxygen species (ROS); superoxide dismutase (SOD); peroxidase (POD) ; catalase (CAT); of two-dimensional electrophoresis coupled with multiplexing fluorescent probes (2-DiGE); inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS); initial fluorescence (F_o); photosystem II (PSII); maximal fluorescence (F_m) ; $(F_m - F_o)/F_m = F_v/F_m$ efficiency of the photosystem;

Key-words: willow, metal trace elements, abiotic stress, proteomics, fluorescence, pigment

Abstract

A comparison between a clone of *Salix fragilis* and a clone of *S. aurita* grown on control soil and soil with additional Zn, Cu, Cd and Ni level was performed. *S. fragilis* produced significantly less biomass of both twigs and leaves, when exposed to the polluted substrate whereas the production of *S. aurita* was not significantly influenced by metals. A higher concentration of Zn and Ni was found in the twigs and leaves of plants grown in metal-amended soil in both clones compared to the control substrate. The same observation was obtained for Cd but only in the twigs. Although higher concentrations of Cu were present in the contaminated soil, the concentration in all parts of the plant was lower in plants exposed to the metal in polluted soil in comparison to the control plants. However, *S. fragilis* accumulated more Zn, Ni and Cu than *S. aurita* whereas the inverse was the case for Cd. Surprisingly, in both conditions, the non-added Mn was accumulated by *S. aurita* rather than *S. fragilis* and *S. aurita* accumulated Mn in the stems of the metal treated plants compared to the control plants while the reverse situation could be observed for the leaves.

Although *S. aurita* did not show a biomass production decrease in presence of metals, the overall view of the physiological results (F_v/F_m , pigment concentrations, electrolyte leakage) indicated that metals had a more severe impact on this clone. The response at the proteome level confirmed these observations. Nevertheless, carbohydrates were also more accumulated in this clone. Growth reduction in *S. fragilis* suggests a tolerance strategy in order to maintain cellular homeostasis. Sugar accumulation in *S. aurita* could imply a different strategy of metal tolerance as confirmed by increased cellular damage.

1. Introduction

When they occur in excess in soils, metals become toxic as they can disturb plant physiology and thus affect plant development (Bertrand and Poirier, 2005; Hasan *et al.*, 2009). Indirect metal toxicity lies mainly in the increased generation of reactive oxygen species (ROS) ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 ; HO^{\bullet}), inducing oxidative stress. Generally, ROS levels are maintained below toxic levels in cells because of the activity of antioxidative defense mechanisms, which are enzymatic (superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT)) or non-enzymatic (glutathione, carotenoids and ascorbate) (Apel and Hirt, 2004). Nevertheless, metals can disrupt the activity of enzymes containing free cysteine residues as they can bind thiol groups. Some of the enzymes known to be inhibited in this way are involved in defense mechanisms; therefore this interaction leads to further disturbance of the oxidative balance (Hossain *et al.*, 2012a; Bhaduri and Fulekar, 2012).

Metals can also interact directly with proteins and lipids of membranes causing membrane damage and thus the loss of cellular electrolytes (Hall, 2002; Kieffer *et al.*, 2008; Hasan *et al.*, 2009; Bhaduri and Fulekar, 2012; Maleva *et al.*, 2012). Moreover, when the cellular mineral balance is disrupted, excess metals are able to replace essential metals in pigments and enzymes, which can alter their function. The pigment synthesis can be disturbed and their concentrations reduced in the presence of metals, leading to a lower photosynthetic efficiency (Maleva *et al.*, 2012; Osorio *et al.*, 2012). It has also been observed that carbohydrate metabolism is affected by metal exposure as is the case for different abiotic stresses. Several carbohydrates can accumulate, suggesting a role in osmotic adjustments and/or protection of cell constituents (Cheng *et al.*, 2002; Kieffer *et al.*, 2009a; Maleva *et al.*, 2012; Osorio *et al.*, 2012). Consequently, the disruption of the physiological and biochemical processes in cells reduces plant growth or can even lead to plant death (Maleva *et al.*, 2012; Bhaduri and Fulekar, 2012). Because the effects of metals on plants are diverse, several physiological parameters (photosystem efficiency, sugar and pigment concentrations, electrolyte leakage) are used to evaluate metal-induced cellular damage. The chlorophyll fluorescence ratio (F_v/F_m) estimates the photochemical efficiency of the PSII as this ratio generally decreases when the photosynthetic apparatus functioning is impaired (Maxwell and Johnson, 2000). In parallel, a proteomic approach can contribute to a better understanding of the impact of metals. The techniques of two-dimensional electrophoresis coupled with multiplexing fluorescent probes (2-DiGE) and mass spectrometry have been increasingly used to unravel the consequences of environmental constraints on plant physiology (Ahsan *et al.*, 2009; Duquesnoy *et al.*, 2009; Kieffer *et al.*, 2008; 2009a,b; Villiers *et al.*, 2011). The strategies developed by plants to tolerate or to accumulate high amounts of metal have been studied to use plants for phytoremediation purposes, especially in phytoextraction. According to Baum *et al.* (2006), the ideal plant to promote for phytoextraction would present (1) high biomass production with moderate concentrations of metals in the plant tissues, (2) high metal concentrations in the tissue combined with a moderately high biomass production, or (3) combinations of both. Depending on the foreseen use of the produced biomass, like, for example, incineration for energy production or biomining, different

plant species become applicable. *Salix* trees are fast growing and high biomass producing plants able to tolerate diverse environmental conditions. Furthermore, some *Salix* species are able to accumulate relatively high concentrations of metal; therefore the genus has been intensively investigated in the context of phytoremediation (Marmioli *et al.*, 2011). Nevertheless, although the accumulation abilities of *Salix* species have been greatly studied, allowing the selection of good candidates for phytoremediation, few studies have been conducted to increase the understanding of the metal stress responses induced in these “candidates”.

Based on a previous study (Evlard *et al.*, 2013 in manuscript), two willow clones (*Salix fragilis* and *Salix aurita*) were classified as candidates for phytoremediation purposes. These clones showed the same biomass production in contaminated substrate whereas metal accumulation was different between them. For this reason, they were selected for a detailed study. The aim of the present study was to evaluate the effects of metals exposure (an excess of Cd, Zn, Cu and Ni) on these two willow clones growing in an artificially contaminated soil. Physiological and morphological parameters were recorded on these clones growing on control and polluted soil, and the proteome level responses are explained based on these observations.

2. Material and methods

2.1 Plant material and growth conditions

A *Salix fragilis* clone (Sf) and a *Salix aurita* clone (Sa) were chosen from a previous screening. These clones showed a similar biomass production but presented different metal concentrations in their annual twigs. Rooted cuttings of each clone were placed outdoors in 10 L containers filled up with a contaminated or non-contaminated (control) substrate. The substrate used was composed of soil sampled from farm land, sand (0-2 mm granule size) and peat (V:V, 2:1:1). To contaminate the substrate, a mixture of metals (Cd, Cu, Zn and Ni as chloride salts) was added. The control and the contaminated soil were allowed to mature for three years outdoors.

The total content of Ca, Mg, Na, K, Fe, Mn and metal trace elements (Al, Cd, Cu, Ni, Mo, Zn) (after *aqua regia* digestion) of the soils was determined using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Perkin Elmer Elan DRC-e). 10 ml *aqua regia* was added to 100 to 250 mg of dried sample, acid digestion was performed in Teflon tubes in a microwave oven (Anton Paar Multiwave 3000) by increasing the temperature and pressure up to 200 °C and 30 bars. At the end of the procedure, the samples were diluted with ultrapure water up to 25 mL and were maintained at 4 °C prior to analysis. For each of the soils a triplicate analysis was done and the mean values are presented in Table 1. Blank samples and certified reference material were included at each mineralization cycle for quality control. Ten rooted cuttings of each *Salix* clone were planted in the contaminated substrate and another ten in the control substrate. The 40 containers were put outside and randomly placed in racks. During the growth period, the substrates were watered to compensate the water loss until soil saturation.

Table 1: Metal content and pH in control and contaminated substrate.

Treatment	Content ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight)										
	Cd	Zn	Cu	Ni	Fe	Mn	Na	Mg	K	Ca	pH
Control	0,14	43,6	14,8	8,2	7964	272	2821	2196	8081	8036	6.9
Contaminated	4,44	1351	883,8	96,1	6373	215	2495	1835	6953	6520	6.4

At the planting time, for each treatment (control and contaminated substrate) and for each clone, the plants were randomly divided into 2 sets of 5 replicates. The first set was used to measure chlorophyll fluorescence, biomass production and metal accumulation. The second set was used to determine electrolyte leakage, sugar and pigment content and to collect samples for the proteomic study.

2.2 Biomass measurement and metal analysis

After a 100 day growing period, the annual twigs and leaves were collected from the plants, washed twice with double distilled water to remove surface dust, dried at 60°C in the oven until a constant mass and weight was attained. Significance was calculated with a two-way ANOVA with treatment and clone as the factors. Leaf and annual twig biomass production were used as the variables. These analyses were performed on MINITAB Statistical Software v.16.2.2.

Metal contents (Cd, Zn, Cu, Ni) were analysed using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Perkin Elmer Elan DRC-e). An aliquot of 100 to 250 mg of dried sample was digested in 7 mL HNO₃ (Plasma Pure 67–70%, SCP Science) and 3 mL H₂O₂ (30%, trace metal analysis, Fisher Scientific). Acid digestion was performed in Teflon tubes in a microwave oven (Anton Paar Multiwave 3000) by increasing the temperature and pressure up to 200°C and 30 bars. At the end of the procedure, samples were diluted with H₂O up to 25 mL and kept at 4°C prior to analysis. Blank samples and certified reference material were included at each mineralization cycle for quality control. Significance was calculated with a one-way ANOVA with the clone as the factor. Metal contents (Cd, Zn, Cu, Ni) in the leaves and annual twigs were used as the responses. A one-way ANOVA was also performed with the organ (leaf/twig) as the factor for each clone. These analyses were performed on MINITAB Statistical Software v.16.2.2.

2.3 Chlorophyll fluorescence

Analyses were performed with a portable fluorometer (PAM 2100 Walz, Effeltrich, Germany) after 30 min of dark adaptation on leaves that were intact, matured and fully exposed to the sun. A dark adaptation allowed the electron chain transporters to reach their fully oxidised level (in this case, the photosystems are open) and thus, to measure the initial fluorescence (F_o). The excitation of the reaction centers of the photosystem II (PSII) is reached after the application of a saturation light pulse (0.8s) and the measure of maximal fluorescence (F_m), the maximal emitted fluorescence when all Q_A are reduced, can be taken. The ratio $(F_m - F_o)/F_m = F_v/F_m$ which represents the efficiency of the photosystem in the dark-adapted state was calculated (Maxwell and Johnson, 2000). Fluorescence

measurements were taken on 4 leaves on the 5 replicates of each clone for each treatment. Significance was calculated with a two-way ANOVA with treatment and the clone as factors. The ratio F_v/F_m was used as the response. These analyses were performed on MINITAB Statistical Software v.16.2.2.

2.4 Electrolyte leakage

For each clone, 6 intact, matured leaves, fully exposed to the sun, were cut from each of the control and treated plants and rinsed briefly in milli-Q water. A foliar disc (ϕ 0.6 cm) was cut per leaf. The 6 discs were put in a tube containing 12 mL of milli-Q water. Conductivity was measured with a HI 9033 Multi-range (Hanna instruments). The 20 tubes were shaken for 60 min and the conductivity was measured (T1). The tubes were then autoclaved and, after cooling to room temperature, the maximal conductivity was measured (T2). The electrolyte leakage in per cent was calculated as follows: $(T1/T2) \times 100$. Significance was calculated with a two-way ANOVA with treatment and clone as factors. The electrolyte leakage in per cent was used as the response. These analyses were performed on MINITAB Statistical Software v.16.2.2.

2.5 Leaf sampling for carbohydrate, salicin and pigment contents analysis

For each sampling, approximately 5-6 leaves were collected and pooled together to form 1 replicate. A total of 5 replicates by genotype and condition were sampled. After collection, fresh material was washed with distilled water, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Prior to analysis, the leaves were crushed in liquid nitrogen and the resulting powder was divided into 2 samples, 1 for carbohydrate and salicin quantification, and 1 for pigment analysis.

2.5.1 Carbohydrate and salicin extraction and analysis

Approximately 100 mg of powdered leaves were mixed with 1 ml of a water/ethanol solution (20/80, v/v). After vortexing and shaking with an Eppendorf Thermomixer (30 min, 4°C , 1400 rpm), the samples were centrifuged (17000 g, 4°C , 10 min). The supernatant was collected and the residue was extracted again with 0.5 ml of the water/ethanol mixture (20/80, v/v). The resulting supernatant was pooled with the first one and the final extract was dried at reduced pressure (Speedvac) before being resuspended in 1 ml double distilled water and filtered through $0.45 \mu\text{m}$ PVDF-filters.

The samples were analysed using High performance Anion Exchange Chromatography coupled with Pulsed Amperometric Detection HPAEC-PAD (Dionex ED 50A, Dionex Corp., Sunnyvale, USA) according to Evers *et al.* (2010) with slight modifications. HPAEC-PAD analyses for carbohydrates were conducted on a Dionex HPLC ICS2500-BioLC (Sunnyvale, USA), with an AS-50 autosampler, a GS-50 gradient pump and an EG-50 eluent generator. The mobile phase, with a flow-rate of $0.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, was generated on-line with KOH. The hydroxide concentration was programmed as follows: 9.5 mM for 25 min, 9.5-100 mM for 1 min, 100 mM for 14 min, 100-9.5 mM for 4 min and column equilibration at 9.5 mM for 5 min. The analytical column was a Dionex CarboPac PA-20 (3 mm x 150

mm) kept at 35°C. Carbohydrates were quantified using nine-point calibration curves with custom-made external standard solutions, ranging from 1 to 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. After 10 injections, a check standard solution was used to validate the calibration of the system (Oufir *et al.*, 2008). Significance was calculated with a two-way ANOVA with treatment and clone as factors. Carbohydrate contents (fructose, glucose, galactose, sucrose) and salicin were used as the responses. These analyses were performed on MINITAB Statistical Software v.16.2.2.

2.5.2 Pigment extraction and analysis

Approximately 100 mg of frozen powder was mixed with 1 mL acetone. After vortexing and shaking with an Eppendorf Thermomixer (30 min, 4°C, 1400 rpm), the samples were centrifuged (6000 g, 4°C, 15 min), the supernatant was collected and stored at -20°C, and the residue was extracted again with 0.5 mL of acetone. The resulting supernatant was pooled with the first one and the total extract filtered through a 0.22 μm Acrodisc GHP syringe filter prior to Waters Acquity UPLC[®] chromatography analysis. In order to compensate for technical variation during extraction, β -apo-8'-carotenal was added to the extraction mixture to a final concentration of 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Pigments were analysed and quantified using Waters Acquity UPLC[®] chromatography (Milford, MA, USA) coupled with a photodiode array detector (UPLC-PDA). Separation was attained using an Acquity UPLC[®] HSS T3 column (2.1 x 100 mm, 1.8 μm particle size, Waters) at a flow rate of 0.5 $\mu\text{l.min}^{-1}$ with an injection volume of 5 μL . The eluents were 50 mM ammonium acetate (A) and acetonitrile/dichloromethane/ methanol (75/10/10, v/v) (B) with the following gradient: 0 min, 70% B; 13 min 70% B; 18 min 95% B; 26 min, 100% B; 33 min 100% B; 34 min 70% B for a total run time of 36 min. The peaks of all compounds were detected at 450 nm. Calibration curves were obtained from custom-made standard solutions containing a mixture of pigments, each ranging from 0.125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ to 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Samples were analysed at a 1 to 2 dilution (in pure acetone) for chlorophyll A and chlorophyll B analyses and at a 1 to 10 dilution (in pure acetone) for neoxanthin, violaxanthin, antheraxanthin, zeaxanthin, lutein, b-cryptoxanthin, a-carotene, b-carotene. Significance was calculated with a two-way ANOVA with treatment and clone as factors. Pigment content was used as the variable. These analyses were performed on MINITAB Statistical Software v.16.2.2.

2.6 Proteomics

2.6.1 Protein sample preparation, labelling and 2-DE

Analyses performed on leaves from the different clones, 4 replicates were used for each clone x treatment. After grinding the plant material in liquid nitrogen, pigments and small molecules were eliminated from the sample by washing in organic solvents. Briefly, the powder was resuspended in 1 mL cold 10% trichloroacetic acid (TCA) in acetone with 0.07% w/t DTT, kept in the freezer for 1 hour and then centrifuged at 10,000 g for 5 min. After discarding the supernatant, the pellet was washed twice with cold acetone and allowed to dry at room temperature overnight before being resuspended in

0.5 mL SDS buffer (30% sucrose, 2% SDS, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 5% 2-mercaptoethanol) and 0.5 mL Tris-buffered phenol (pH 8.0). The sample was vortexed vigorously for 30 seconds, and shaken for 30 minutes before being centrifuged at 10000 g for 3 minutes. Three hundred microliters of the upper phenolic phase was taken and added to fresh tubes with 1.5 mL of cold 0.1M ammonium acetate in methanol. After an incubation of 30 minutes at -20°C the sample was centrifuged, the supernatant decanted and the pellet washed twice with the same cold ammonium acetate solution in methanol. After two more washes with 80% acetone in water the pellet was dried and resuspended in 200 µL of labelling buffer (30 mM Tris pH 8.0; 7 M urea; 2 M thiourea; 2% w/v CHAPS).

After adjusting the pH of the extracts to 8.5, the protein content was quantified using the 2D-Quant Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) with BSA as standard. All protein extracts and a pooled internal standard were labelled with CyDyes™ (GE Healthcare) prior to electrophoresis. For labelling, a volume of sample corresponding to 40 µg was used and the dyes were swapped to avoid the effects of preferential labelling on the statistical outcome. One hundred and twenty micrograms of proteins (two samples of 40 µg each and 40 µg of the internal standard), the volume adjusted to 120 µL with lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 0.5% (w/v) CHAPS) and 0.72 µL of Destreak Reagent, 2.4 µL of IPG buffer 3–10 NL (GE Healthcare) added, were loaded by cup loading onto 24 cm 3–10 NL IPG strips (GE Healthcare). Isoelectric focusing was performed using an IPGphor IEF unit (GE Healthcare) with the following protocol: 150 V for 2 h, gradient to 1,000 V for 4 h, 1,000 V for 5 h, gradient to 10,000 V for 5 h, 10,000 V for 7 h until approximately 95,000 Vh were reached at 20 °C with a maximum current setting of 75 µA per strip. After equilibration, reduction and alkylation of cysteines using DTT and iodoacetamide respectively, the strips were applied to precast gels (GelCompany, Tübingen, Germany) using the buffer kits according to the manufacturer's instructions.

2.6.2 Image capture and analysis

As described by [Renaut *et al.* \(2006\)](#), images for the different CyDyes™ were acquired using a 9400 Typhoon Variable Mode Imager (GE Healthcare) at a resolution of 100 µm using the excitation and detection wavelengths specified by the manufacturer. The images were analysed using the Decyder v7.0 software (GE Healthcare). Statistical analysis of the differentially expressed proteins was carried out with the same software package. The fold change was calculated as the ratio between the average spot intensity in control versus treated samples. If the ratio is >1, lower spot intensity in treated samples, the fold change equals the ratio and if the ratio is <1, the spot intensity in the treated samples is higher than those of the controls, the reported fold change is equal to (1/ratio). Three statistical comparisons were made; in the first two the intensity of spots between treated and control were analysed for each clone; treated Sf/control Sf and treated Sa/control Sa. A third comparison was made with treated Sf&Sa/control Sf&Sa. Spots were considered as spots of interest, as significantly different between the compared conditions, when the fold change was <-1.5 or >1.5 and when the t-test gave a score $p \leq 0.01$.

Spots of interest were picked from the gels, and digested using the fully automated Ettan Spot Handling Workstation (GE Healthcare). After tryptic digestion, the dried peptide extracts were resuspended and spotted on stainless steel MALDI target plates, mixed with an alpha cyanohydroxycinnamic acid solution (500 mg in 1 mL 50% ACN/0.1% TFA) and allowed to dry. Mass spectrometry was done using a 5800 MALDI TOF/TOF (AB Sciex), calibrated in MS using the 4700 peptide mass calibration kit and in MS/MS using Glu-fibrinopeptide fragments as references. For each spot 1 MS spectrum was acquired and the 10 highest peaks selected for MS/MS analysis, excluding known contaminants and trypsin autocleavage products. For MS, 1500 laser shots were accumulated, while 3000 spectra were accumulated for MS/MS spectra. Using an in-house MASCOT-server on a ProteinPilot platform (ABSciex), all spectra from one spot were submitted in a single search, PMF and MS/MS, against the NCBI database (limited to the taxonomy Viridiplantae, downloaded 04/06/2012 containing 1078293 sequences) and the EST Viridiplantae database (75859188 sequences downloaded, autumn 2010). Proteins were considered as being significantly identified when two individual non-identical peptides surpassed the threshold for identification or when one peptide resulted in a protein e-value of <0.005. All identifications were manually validated and extra data was acquired when insignificant identifications were obtained. For some spots, manual sequence determinations were performed and the sequences found used for cross-species identification with FASTS and MSBlast (Mackey *et al.*, 2002).

3. Results

3.1 Biomass production

The metal-treated *Salix fragilis* clone (Sf) showed a significant decrease in biomass production both of twigs and leaves (g dry weight), whereas the biomass production of the *Salix aurita* clone (Sa) did not differ significantly between the two conditions (Figure 1). When the biomass production between the clones was compared, it is noticeable that on contaminated soil both produce the same biomass while Sf has a higher biomass production on control soils. The highly similar biomass production of these two clones on polluted substrate was previously noted during a preliminary study, and was the reason for selecting these two clones (Evlard *et al.*, in manuscript).

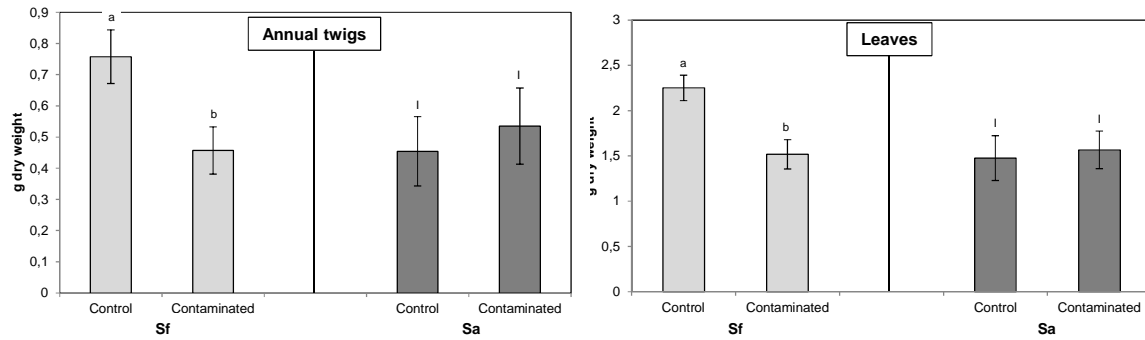


Figure 1: Biomass production (g dry weight) for the different clones of annual twigs (A) and leaves (B) of control and treated plants. Different letters and roman numerals indicate significant differences in biomass production between the two treatments for *S. fragilis* and *S. aurita* respectively (ANOVA $p < 0.05$). $n = 5$. Bars represent standard error of mean (SE).

3.2 Metal content in annual twigs

For the soil-added trace elements (Cd, Cu, Ni and Zn), a significantly different concentration of metals was found in both treated twigs and leaves, and this for both clones in comparison to control. The remarkable observation was that, despite the close to 60 times higher total Cu concentration in contaminated soil, the concentration of Cu found in the plant biomass for both clones was lower for plants grown on polluted soil (Table 2A and Table 1). The concentrations of Zn and Ni were higher in the treated plants while no significant changes in the Cd concentrations were observed (Table 2A). The content of Mn in Sa was also significantly influenced by the treatment; in twigs it was significantly higher when grown on polluted soils, in leaves on the contrary a 28% lower concentration of Mn was found. When the clones grown on control substrate were compared, higher concentrations of Cd and Mn are found in Sa. A significantly lower Cu concentration was found in annual twigs of Sa. The same analysis on the plants grown on polluted substrate confirmed these observations, but Cu and Ni were significantly lower in both leaves and twigs of Sa and furthermore Sa-tissues contained significantly less Zn than Sf after growth on polluted soil (Table 2B).

Table 2A : Metal content in twigs and leaves in control and treated plants (\pm standard error of mean). Different letters and roman numerals indicate significant differences in metal concentration between the two treatments for, *S. fragilis* and *S. aurita* respectively (ANOVA $p < 0.05$).

Concentration in twigs ($\mu\text{g.g}^{-1}$ dry weight)												
		Sf				Sa						
		Control		Contaminated		Control		Contaminated				
Cd	a	0.85	± 0.07	b	1.30	± 0.05	I	1.40	± 0.10	II	2.14	± 0.19
Zn	a	143.9	± 5.4	b	574.1	± 19.4	I	148.9	± 8.8	II	372.7	± 29.3
Cu	a	16.2	± 1.4	b	11.4	± 0.7	I	9.2	± 0.9	II	5.6	± 0.6
Ni	a	1.1	± 0.1	b	12.8	± 0.3	I	1.5	± 0.2	II	6.1	± 0.7
Fe	a	193.9	± 11	a	208.7	± 21.9	I	299.7	± 45.3	II	254.5	± 30.1
Mn	a	18.5	± 0.8	a	17.1	± 2	I	38.4	± 3.6	II	49.4	± 2.7

Concentration in leaves ($\mu\text{g.g}^{-1}$ dry weight)												
		Sf				Sa						
		Control		Contaminated		Control		Contaminated				
Cd	a	1.40	± 0.08	a	1.58	± 0.08	I	2.22	± 0.23	I	1.78	± 0.10
Zn	a	314	± 135	b	931.9	± 47.5	I	276	± 15	II	444	± 42
Cu	a	7.2	± 0.2	b	5.9	± 0.4	I	7.7	± 0.6	II	4.6	± 0.2
Ni	a	6.5	± 5	b	28.9	± 1.4	I	2.1	± 0.3	II	12.7	± 1.3
Fe	a	349.5	± 26.1	a	314.9	± 13.7	I	421.7	± 20.5	I	377.4	± 43.5
Mn	a	35.8	± 1.9	a	30.5	± 2.5	I	281.5	± 26.0	II	204.5	± 11.4

Table 2B : Comparison of metal content in twigs and leaves between Sf and Sa clones in control and contaminated substrate (\pm standard error of mean). Different letters indicate significant differences in metal concentration between the two clones for each treatment (ANOVA $p < 0.05$).

Control					Contaminated							
Concentration in twigs $\mu\text{g.g}^{-1}$ dry weight					Concentration in twigs $\mu\text{g.g}^{-1}$ dry weight							
		Sf		Sa			Sf		Sa			
Cd	a	0,85	$\pm 0,07$	b	1,40	$\pm 0,10$	a	1,30	$\pm 0,05$	b	2,14	$\pm 0,19$
Zn	a	143,9	$\pm 5,4$	a	148,9	$\pm 8,8$	a	574,1	$\pm 19,4$	b	372,7	$\pm 29,3$
Cu	a	16,2	$\pm 1,4$	b	9,2	$\pm 0,9$	a	11,4	$\pm 0,7$	b	5,6	$\pm 0,6$
Ni	a	1,1	$\pm 0,1$	a	1,5	$\pm 0,2$	a	12,8	$\pm 0,3$	b	6,1	$\pm 0,7$
Fe	a	193,9	± 11	a	299,7	$\pm 45,3$	a	208,7	$\pm 21,9$	a	254,5	$\pm 30,1$
Mn	a	18,5	$\pm 0,8$	b	38,4	$\pm 3,6$	a	17,1	$\pm 1,2$	b	49,4	$\pm 2,7$

Concentration in leaves $\mu\text{g.g}^{-1}$ dry weight					Concentration in leaves $\mu\text{g.g}^{-1}$ dry weight							
		Sf		Sa			Sf		Sa			
Cd	a	1,40	$\pm 0,08$	b	2,22	$\pm 0,23$	a	1,58	$\pm 0,08$	a	1,78	$\pm 0,10$
Zn	a	314	± 135	a	276	± 15	a	931,9	$\pm 47,5$	b	444	± 42
Cu	a	7,2	$\pm 0,2$	a	7,7	$\pm 0,6$	a	5,9	$\pm 0,4$	b	4,65	$\pm 0,18$
Ni	a	6,5	± 5	a	2,1	$\pm 0,3$	a	28,9	$\pm 1,4$	b	12,7	$\pm 1,3$
Fe	a	349,5	$\pm 26,1$	a	421,7	$\pm 20,5$	a	314,9	$\pm 13,7$	a	377,4	$\pm 43,5$
Mn	a	35,8	$\pm 1,9$	b	281,5	$\pm 26,0$	a	30,5	$\pm 2,5$	b	204,5	$\pm 11,4$

3.3 Chlorophyll fluorescence and electrolyte leakage

Both clones displayed significantly lower F_v/F_m values when grown in the presence of metals (Figure 2A). In control conditions Sa showed significantly higher values in comparison with Sf but the decrease of the ratio measured on the metal-exposed Sa leaves was more important. No significantly different F_v/F_m was observed between Sf and Sa in the metal treatment.

The electrolyte leakage increased when Sa grew in presence of metals (Figure 2B) but did not vary between the two treatments for Sf.

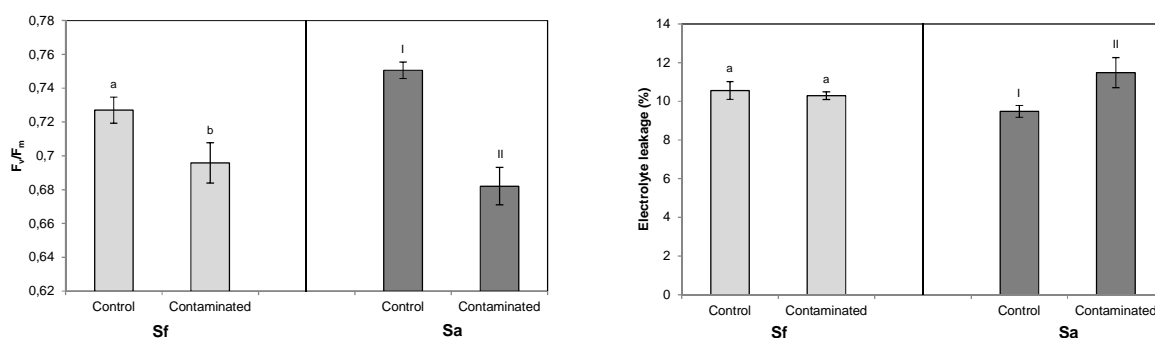


Figure 2A: Values of F_v/F_m ratio of control and treated plants. Different letters and roman numerals indicate significant differences in fluorescence ratio values between the two treatments for *S. fragilis* and *S. aurita* respectively (ANOVA $p < 0.05$). $n=5$. Bars represent standard error of mean (SE).

Figure 2B: Electrolyte leakage (%) of control and treated plants. Different letters and roman numerals indicate significant differences in electrolyte leakage between the two treatments for *S. fragilis* and *S. aurita* respectively (ANOVA $p < 0.05$). $n=5$. Bars represent standard error of mean (SE).

3.4 Carbohydrate and salicin contents

The main carbohydrates quantified in the leaves ($\mu\text{mol.g}^{-1}$ fresh weight) of the two clones were fructose, galactose, glucose and sucrose (Figure 3). The concentrations of these metabolites did not significantly differ between the clones in control conditions and no increased content of carbohydrate was recorded in Sf after growth on polluted soil. For Sa, the four carbohydrates accumulated to a higher concentration when the plants were grown on polluted substrate, and for fructose, glucose and galactose the increase was close to 3-fold as compared to controls. Salicin concentrations did not vary between the treatments for both clones (results not shown).

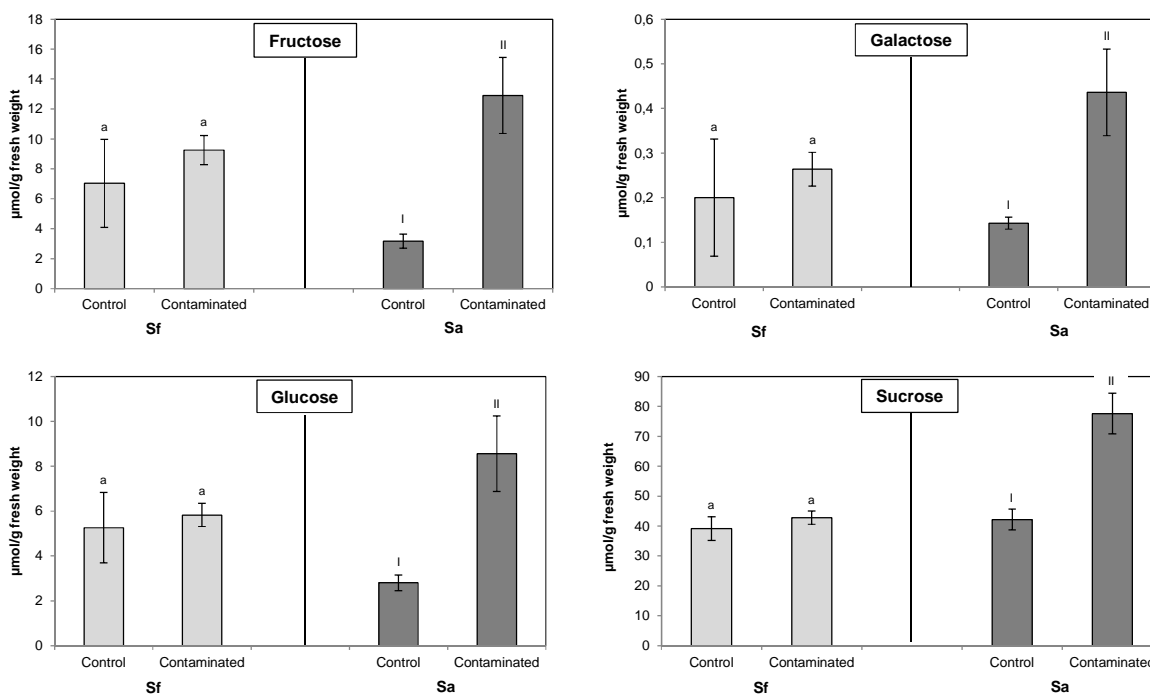


Figure 3: Carbohydrate content in $\mu\text{mol/g}$ fresh weight in leaves of control and treated plants. Different letters and roman numerals indicate significant differences in content of each carbohydrate between the two treatments for *S. fragilis* and *S. aurita* respectively (ANOVA $p < 0.05$). $n=5$. Bars represent standard error of mean (SE).

3.5 Pigment contents

Chlorophyll a and b are the most abundant pigments. Chlorophyll a content ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ fresh weight) significantly decreased in presence of metals for both clones. A decrease of a similar trend was measured for chlorophyll b, but this was not significant due to larger variation between the measurements (Figure 4). The ratio chlorophyll a/chlorophyll b did not change significantly (data not shown). Exposure to metals induced significant decreases in the content of violaxanthin, antheraxanthin and alpha-carotene in both clones. For the other pigments, the exposure to the metals induced significant pigment content changes only in one of the two clones (beta-carotene, neoxanthin) or did not have a significant effect on both clones (zeaxanthin, lutein, beta-cryptoxanthin) (Figure 5).

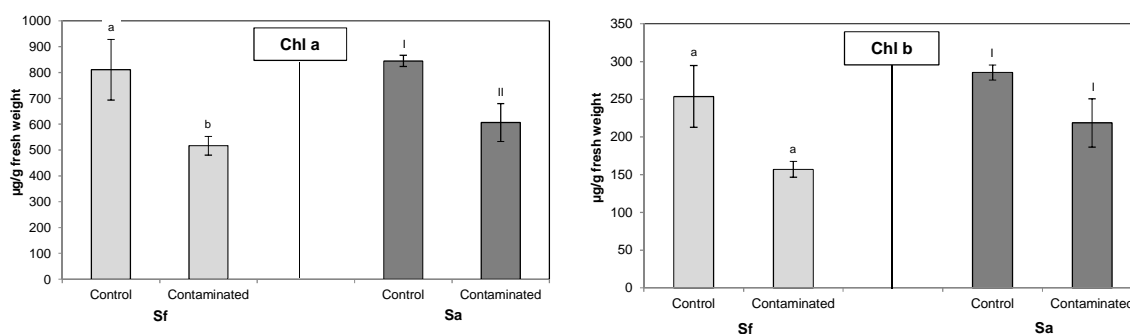


Figure 4: Chlorophyll a and chlorophyll b content in leaves of control and treated plants. Different letters and roman numerals indicate significant differences in chlorophyll a and b contents between the two treatments for *S. fragilis* and *S. aurita* respectively (ANOVA $p < 0.05$). $n=5$. Bars represent standard error of mean (SE).

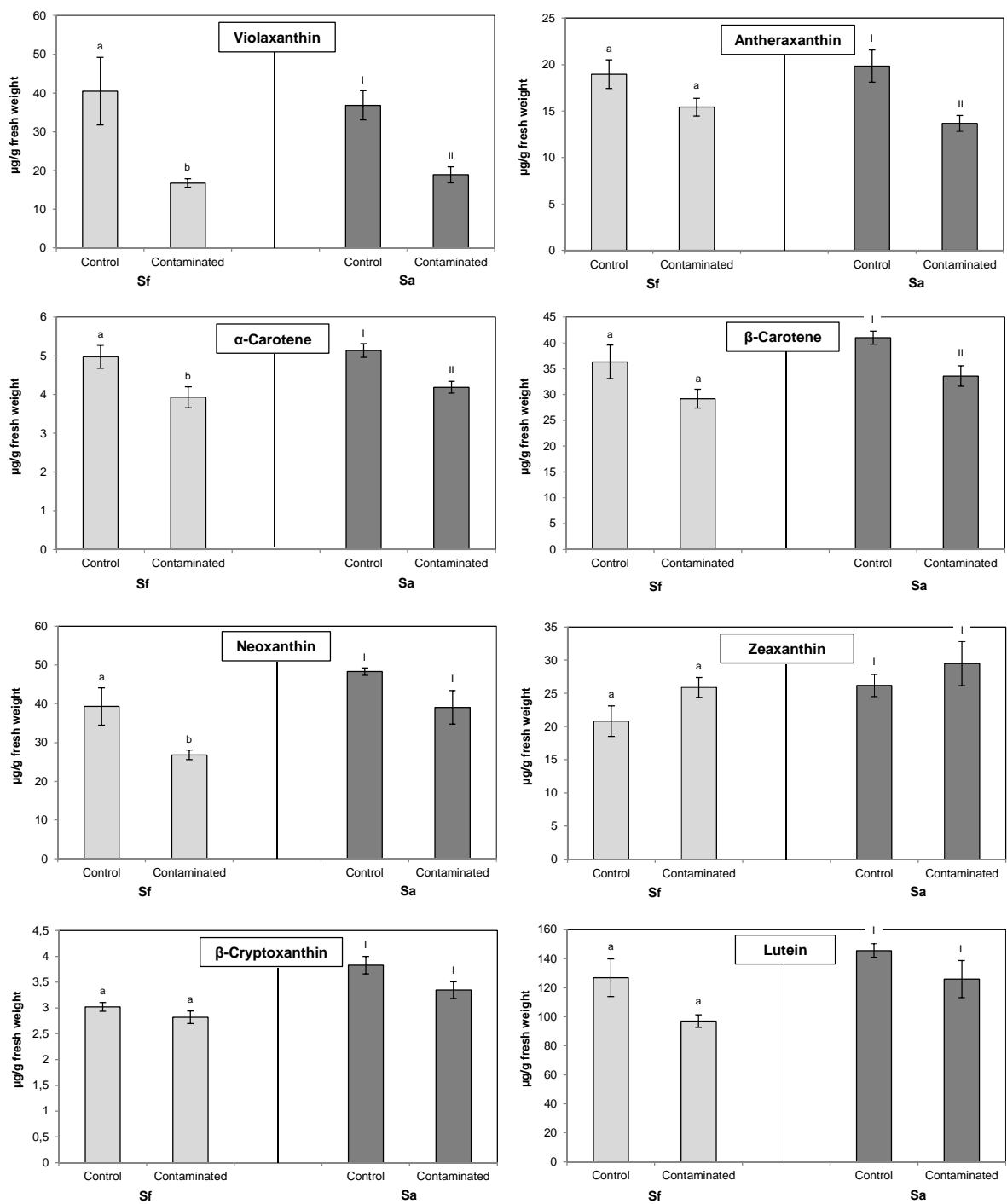


Figure 5: Pigment content in µg/g fresh weight in leaves of control and treated plants. Different letters and roman numerals indicate significant differences in content of each pigment between the two treatments for *S. fragilis* and *S. aurita* respectively (ANOVA $p < 0.05$). $n=5$. Bars represent standard error of mean (SE).

3.6 Proteomics

Seventy-two spots were excised from the gel and used for protein identification, which resulted in the significant identification of proteins in 56 spots (Supplemental Table 4). Of these 72 spots, 28 spots changed significantly in intensity for Sf exposed to metals; for Sa 44 spots changed in abundance after metal exposure (fold change <-1.5 or > 1.5 and t-test $p \leq 0.01$). Eight of these spots changed significantly in both clones. The comparison of all the treated samples *versus* all the control samples resulted in a significant change in 23 spots, of which only 8 changed significantly when the clones were pooled. After exclusion of those spots in which more than one protein was identified, 35 spots could be used for biological interpretation (Table 3). Half of the identified proteins are directly involved in sugar metabolism or photosynthesis. Most of the spots changed in the same direction in both clones between the treatments, although there was not always a significant difference for both clones. The groups of proteins involved in oxidoreduction, the antioxidant system and protein metabolism, changed only for Sa.

Table 3 (Part I) : Spots that changed significantly when comparing the proteome of the control-*versus* the treated clones. The data resulting in these identifications is shown in Supplemental Table 4.

Spot ^{a)} Function/protein name ^{b)}	NCBI access ^{c)}	EST Access	Sf		Sa		control/conta.		Clone	Treatment	Interaction
			T-test ^{d)}	Av. Ratio ^{e)}	T-test ^{d)}	Av. Ratio ^{e)}	T-test ^{d)}	Av. Ratio ^{e)}			
Photosynthesis											
623 Partial ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, chloroplast [<i>Potentilla reptans</i>]	340511874		7,10E-04	-1,89	4,90E-01	-1,06	3,10E-03	-1,41	8,90E-01	2,30E-04	1,20E-03
748 Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [<i>Pimelea humilis</i>]	297167025		7,60E-03	1,63	1,60E-01	-1,29	4,50E-01	1,16	1,40E-01	2,90E-01	3,30E-03
371 Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [<i>Tetrachondra hamiltonii</i>]	912530		2,10E-01	1,16	3,20E-03	-2,69	1,60E-01	-1,27	7,90E-05	6,80E-03	4,70E-04
654 Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [<i>Podocarpus longifoliolatus</i>]	13548800		8,60E-01	-1,05	2,80E-03	-1,51	4,90E-01	-1,15	1,70E-07	5,10E-02	9,20E-02
1857 Ribulose bisphosphate carboxylase small chain 8B precursor, chloroplastic	132118		3,00E-02	1,76	1,20E-04	1,73	1,70E-01	1,74	9,30E-09	1,30E-04	8,70E-01
1871 Ribulose bisphosphate carboxylase small chain 1B, chloroplast	224127464	gi255560434 refXP_002521232.1	1,60E-03	3,43	7,90E-03	1,58	1,70E-01	1,73	1,60E-09	2,60E-05	8,70E-03
1886 Ribulose bisphosphate carboxylase small chain 1B, chloroplast	224127464	gi255560434 refXP_002521232.1	9,20E-03	2,05	5,60E-04	1,65	2,80E-01	1,69	1,90E-10	6,90E-05	2,90E-01
1887 Putative ribulose bisphosphate carboxylase small chain 1B precursor, chloroplast [<i>Ricinus communis</i>]	224127464	gi255560434 refXP_002521232.1	1,10E-03	2,64	5,10E-03	1,53	3,70E-01	1,58	1,60E-12	9,90E-06	1,60E-02
902 Partial rubisco activase [<i>Zantedeschia aethiopica</i>]	13430332		6,70E-03	1,66	2,10E-01	1,13	8,70E-03	1,34	1,80E-02	1,60E-03	3,80E-02
982 Rubisco activase [<i>Zantedeschia aethiopica</i>]	13430336		4,70E-03	1,71	2,80E-02	1,47	2,00E-04	1,57	2,00E-01	2,70E-04	4,30E-01
984 Ribulose bisphosphate carboxylase / oxygenase activase 1, chloroplast	118489408	gi255566442 refXP_002524206.1	1,20E-02	2,12	2,80E-02	1,46	8,60E-04	1,79	2,70E-01	7,20E-04	1,30E-01
1069 Putative sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplast [<i>Ricinus communis</i>]	224098511	gi255579134 refXP_002530415.1	4,90E-02	1,62	3,10E-02	1,49	3,10E-03	1,56	1,30E-01	3,30E-03	7,80E-01
1073 Putative sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplast [<i>Ricinus communis</i>]	224098511	gi255579134 refXP_002530415.1	2,70E-01	1,25	8,40E-03	1,57	5,30E-02	1,43	8,80E-04	7,30E-03	2,40E-01
1377 Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic (OEE1). (33 kDa subunit of oxygen evolving system of photosystem II) (33 kDa thylakoid membrane protein (OEC 33 kDa subunit))	12644171		8,10E-05	1,67	6,70E-02	1,39	7,60E-04	1,51	1,50E-02	2,00E-04	3,00E-01
1532 Predicted chlorophyll a-b binding protein CP26, chloroplastic-like [<i>Glycine max</i>]	356535308		3,90E-01	1,28	3,50E-03	2,26	4,20E-02	1,54	5,20E-03	1,00E-02	1,80E-01
1571 Chlorophyll a/b-binding protein type III [<i>Lycoris aurea</i>]	116519121		5,50E-01	1,14	7,50E-03	1,93	2,90E-01	1,72	6,40E-06	2,70E-02	1,80E-01
1543 Carbonic anhydrase [<i>Populus tremula x Populus tremuloides</i>]	1354517		8,00E-03	2,26	3,20E-02	1,35	9,90E-04	1,72	2,30E-01	4,40E-04	3,40E-02
Antioxidant system											
1542 Putative glutathione-s-transferase theta (gst) [<i>Ricinus communis</i>]	255539098		5,60E-01	1,1	8,90E-03	1,63	1,70E-02	1,35	4,80E-01	1,20E-02	6,40E-02
1546 Phi class glutathione transferase (GSTF2) [<i>Populus trichocarpa</i>]	224065729	gi283135880 gb ADB11331.1	3,80E-01	-1,2	3,30E-03	2,14	1,30E-01	1,36	4,40E-01	3,80E-02	2,80E-03
1568 Dehydroascorbate reductase-like protein [<i>Solanum tuberosum</i>]	76573291		5,10E-01	-1,1	1,90E-03	2,01	1,90E-01	1,2	4,70E-05	1,10E-02	1,60E-03
1637 2-cys peroxiredoxin [<i>Populus trichocarpa</i>]	224091909		1,70E-01	1,3	9,00E-03	1,51	4,40E-03	1,4	2,60E-01	6,30E-03	5,50E-01
Response to Cd, nucleotide binding											
1265 Phenylcoumaran benzylic ether reductase 3 [<i>Populus trichocarpa</i>]	224105373		6,20E-03	-2,51	3,50E-01	-1,31	2,60E-01	-2,25	1,70E-05	1,50E-02	3,00E-01
1268 Phenylcoumaran benzylic ether reductase 3 [<i>Populus trichocarpa</i>]	224105373		1,90E-02	-2,23	4,50E-02	-1,51	9,50E-03	-1,93	4,20E-03	1,60E-03	2,80E-01

Table 3 (Part II) : Spots that changed significantly when comparing the proteome of the control-*versus* the treated clones. The data resulting in these identifications is shown in Supplemental Table 4.

Spot ^{a)}	Function/protein name ^{b)}	NCBI access ^{c)}	EST Access	Sf		Sa		control/conta.		Clone	Treatment	Interaction
				T-test ^{d)}	Av. Ratio ^{e)}	T-test ^{d)}	Av. Ratio ^{e)}	T-test ^{d)}	Av. Ratio ^{e)}			
Oxidoreduction												
628	Predicted succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial-like [<i>Brachypodium distachyon</i>]	326527549	gi 357111628 ref XP_003557614.1	9,60E-01	-1,01	3,70E-03	-1,61	2,90E-01	-1,18	5,60E-06	2,20E-02	1,90E-02
646	Predicted succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial-like [<i>Brachypodium distachyon</i>]	357111628		6,20E-01	-1,23	5,30E-04	-2,11	9,80E-02	-1,46	2,90E-04	9,90E-03	5,90E-02
Energy metabolism												
791	ATP synthase beta subunit [<i>Salix reticulata</i>]	7708632		1,20E-03	1,89	1,00E-03	1,46	4,80E-02	1,58	1,80E-08	4,00E-06	7,20E-02
Protein folding												
1563	Putative groes chaperonin [<i>Ricinus communis</i>]	118489858	gi 255550363 ref XP_002516232.1	7,20E-02	1,63	2,70E-03	1,8	1,30E-01	1,76	1,30E-06	1,40E-03	8,20E-01
Proteolysis												
612	Predicted ATP-dependent zinc metalloprotease (FTSH 2), chloroplastic-like	224128696	gi 225446693 ref XP_002282107.1	2,60E-01	-1,26	8,60E-03	1,76	4,50E-01	1,34	3,30E-05	1,20E-01	4,40E-03
613	Predicted ATP-dependent zinc metalloprotease (FTSH 2), chloroplastic-like	224128696	gi 225446693 ref XP_002282107.1	3,90E-01	-1,26	5,60E-03	1,68	5,70E-01	1,35	8,70E-06	2,10E-01	1,30E-02
604	Predicted ATP-dependent zinc metalloprotease (FTSH), chloroplastic [<i>Vitis vinifera</i>]	225459844		4,10E-01	-1,11	2,10E-03	1,5	2,10E-01	1,15	3,90E-01	1,20E-01	7,30E-03
ATP synthesis coupled proton transport												
625	V-type proton ATPase catalytic subunit A	224097420	gi 12585490 VATA_CITUNsp Q9SM09.1	3,20E-05	-1,87	6,40E-02	-1,28	1,30E-02	-1,62	3,70E-06	1,40E-05	1,20E-02
Miscellaneous												
1462	Putative ribonucleoprotein, chloroplast [<i>Ricinus communis</i>]	224069480	gi 255556984 ref XP_002519525.1	4,70E-02	1,72	6,60E-04	2,96	1,30E-03	2,41	3,20E-03	1,00E-04	1,60E-01
1536	Putative ribonucleoprotein, chloroplast [<i>Ricinus communis</i>]	224140195	gi 255556984 ref XP_002519525.1	1,50E-02	1,22	2,70E-03	1,73	7,10E-02	1,54	2,20E-07	7,20E-05	1,90E-02
1284	Putative SHOOT1 protein [<i>Oryza sativa Japonica</i> Group]	224073126	gi 50509325 dbj BAD30783.1	2,40E-03	1,81	7,30E-02	1,4	3,30E-02	1,66	3,10E-05	5,10E-04	2,50E-01

a) Spot number.

b) Function of the protein obtained using MASCOT-server on a ProteinPilot platform (ABSciex) against the NCBI *Viridiplantae* database and the EST *viridiplantae* database.

c) Accession number from the NCBI database, where a protein has been identified based on the EST database or where the identified protein has a trivial name, the found sequence was blasted and the protein with the highest homology is given.

d) P-value of the t-test for the treatment factor (p<0.01, t-test).

e) Average ratio of the spot intensity (control/contaminated). Positive ratio values are given as such, while negative values are given according to the following formula: given value= -1/average ratio. In bold, spots for which the t-test are significant. In grey, spots up-regulated in treated plants. In blue, spots which were down-regulated in treated plants.

Discussion

In this study, two *Salix* clones belonging to 2 different species, *S. fragilis* (Sf) and *S. aurita* (Sa) respectively, were chosen from a previous screening. These clones produced the same biomass when exposed to metal pollution in soil but accumulated widely different concentrations of metals in their aerial parts. In the current study, a side-by-side comparison of both clones grown on control and polluted soil was achieved. The two clones were compared based on different morphological and physiological parameters and a comparative proteomics study was performed.

Similarly to a previous study using a polluted dredging sludge (Evlard *et al.*, in manuscript), the equal biomass production between the two clones grown in contaminated conditions was confirmed. There are, however, differences in the response to pollution. The biomass production of Sa was not significantly influenced by the adverse growth conditions, neither in twigs nor in leaves in the present study. Contrary to this, Sf produced significantly less biomass, in both twigs and leaves, when exposed to the polluted substrate.

The concentration of the metals Zn and Ni increased in the plants grown on the Cd, Cu, Ni and Zn contaminated soil, as could be expected, however for Cd and Cu this was not always as obvious. Indeed, no enhanced accumulation of Cd was observed in the leaves of both clones after the treatment. More surprisingly the concentration of Cu in all analysed plant parts was lower in plants exposed to the metal polluted soil (Table 2). The pH of the soil was checked but found to be invariant, thus not explaining this observation. The concentration of Cu found in the plants is in general very low, for instance as compared to the values obtained by Punshon & Dickinson (1997) reporting values of 25-100 ppm for willows growing on non-polluted substrates. The presence of Cu in combination with high concentrations of other metals might result in the exclusion of Cu but no supporting observations were done. The most striking difference in the accumulation of non-added metals is the accumulation of Mn, with concentrations in Sa leaves being approximately 7 times higher compared to those in Sf leaves and this independent of the treatment.

The concentration of Mn is significantly higher in the stems of treated Sa plants compared to control plants while the reverse is the case for the leaves, suggesting that a specific mechanism is actively controlling the translocation of Mn in leaves in presence of metals.

Zn is known to influence the uptake/translocation of Mn (Hassan and Aarts, 2011), and thus decreased Mn-translocation to leaves might result in the concomitant accumulation of the element in the stem. In a study on the accumulation of metals in two species of *Salix* a predominant accumulation of Mn was found in the leaves of the *S. fragilis* clone “Belgisch Rood” (Vandecasteele *et al.*, 2005). However, the Mn concentrations are below what is considered as toxic, and will thus probably not explain the growth reduction observed in the present study.

Environmental constraints are known to have an influence on different plant fluorescence parameters and pigment concentrations; therefore quantification of these parameters is often used as a relative indicator for stress experienced by a plant (Osorio *et al.*, 2012). Fluorescence rises from minimal fluorescence (F_o), the basal emission when all chlorophyll molecules and other electron acceptors in PSII are oxidized (or open), to maximal fluorescence (F_m) when all electron acceptors are reduced (or closed) (Mallick and Mohn, 2003; Govender *et al.*, 2009). The ratio $(F_m - F_o)/F_m = F_v/F_m$ estimates the photochemical efficiency of the PSII in the dark-adapted state and is a parameter commonly used to measure the stress perception on the photosynthetic apparatus (VanderAuwera *et al.*, 2012). When the photosynthetic mechanism is damaged, this ratio generally decreases (Maxwell and Johnson, 2000). In the present study, both clones showed a decrease of the ratio F_v/F_m (Figure 2A). However, this decrease was double for Sa compared to Sf. Generally, a lower value of the ratio compared to a control situation is due to an increase in F_o , indication of permanent damage to the PSII, and a decrease in F_m (Govender *et al.*, 2009). Interestingly, these results were observed for Sa but not for Sf (data not shown). So, the light absorbed by PSII was less efficiently used in the photochemistry of metal-treated Sa plants in comparison to Sf plants.

For both clones, no significant decrease in the ratio Chla/Chlb was observed although the concentration of Chla significantly decreased in response to the treatment (Figure 4). During the photosynthesis process, carotenoids absorb light at wavelengths not used by the chlorophylls, thereby protecting the photosynthetic apparatus and regulating the flow of energy in the chloroplast thylakoids (Govender *et al.*, 2009). Furthermore, carotenoids, especially violaxanthin and zeaxanthin, act as antioxidants by reacting with free radicals and dissipate the excess of excitation energy. As such, they protect the metabolism from free radicals (Matysiak, 2001; Maleva *et al.*, 2012; Osorio *et al.*, 2012). In the current study, the concentration of the main pigments, except for zeaxanthin, shows a tendency to decrease for both clones when grown in the presence of metals although not all changes were significant (Figure 5). Decreased concentrations of chlorophyll and carotenoids are regarded as a symptom of plant stress perception (Matysiak, 2001; Linger *et al.*, 2005; Govender *et al.*, 2009), which can be caused by metals (Janik *et al.*, 2008; Tkalec *et al.*, 2008; Ben Ghnaya *et al.*, 2009; John *et al.*, 2009; Malec *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Kösesakal *et al.*, 2011). In agreement with our study, other reports indicated that the reduction of pigment content is accompanied by a decrease in the efficiency of PSII. For instance, Cheng *et al.* (2002) showed a decrease in the ratio F_v/F_m , a decrease in Chla content and in the ratio Chla/Chlb in *Canna indica* in presence of Cd. The authors indicated that Chla was more sensitive to Cd than Chlb. Maleva *et al.*, 2012 confirmed this last observation, and a decrease in F_v/F_m in *Elodea* plants. In the few studies which were done on woody plants (*Salix*, *Populus*), little or no decrease in the pigment concentrations and/or F_v/F_m were noted (Hakmaoui *et al.*, 2006; Borghi *et al.*, 2007; 2008; Kieffer *et al.*, 2008; Marmiroli *et al.*, 2011; Borowiak *et al.*, 2012) except in Pietrini *et al.*, 2010 and Fernández *et al.*, 2012. Our results corroborate the hypothesis that the reduction of the photosynthetic capacity is caused by an increased

sensitivity to photo destruction because of lower accumulation and/or biosynthesis of antioxidant carotenoids and pigments (Matysiak, 2001; Malec *et al.*, 2010). It is remarkable that most pigments decrease but not zeaxanthin and beta-cryptoxanthin. This is potentially due to the specific metal-induced inhibition of zeaxanthin epoxidase, the enzyme catalysing the two-step conversion of zeaxanthin to antheraxanthin and violaxanthin, as previously described through the interaction of Cd with a cysteine residue (Latowski *et al.*, 2005). However, increased activation of the reverse reaction by violaxanthin de-epoxidase is likewise a possible explanation.

Furthermore, the increased electrolyte leakage of the Sa leaves indicates that Sa experiences more influence on membrane integrity compared to Sf from the exposure to metals in the current experiment (Figure 2B). These stress indicators point to the conclusion that Sa experiences more stress compared to Sf, contradicted by the fact that in Sf growth was reduced while Sa did not show negative effects on biomass production.

The concentration of the four quantified sugars all increased in the leaves of treated Sa plants while no significant increase for any of these sugars was measured in Sf (Figure 3). On the contrary, salicin did not accumulate in presence of metals. The accumulation of soluble sugars was previously observed in poplar and *Solanum lycopersicum* exposed to metals (Kieffer *et al.*, 2009a; Zoghalmi *et al.*, 2011). In other studies on herbaceous plants different hypotheses have been proposed to explain the increased accumulation of photo assimilates during exposure to metals (Samarakoon and Rauser, 1979). This might have beneficial results such as increased osmoprotection or the direct scavenging of ROS by sucrose, limiting the oxidative damage generally associated with biotic and abiotic stresses (Bolouri-Moghaddam *et al.*, 2010). In a study on oak, Spieß *et al.*, 2012 noted the accumulation of hexoses after drought treatment and indicated that osmotic adjustment is an adaptive response. But the accumulation of sugars is known to have more profound effects as well; because of feedback inhibition, important parts of the central metabolism are regulated by the concentrations of sugars and, additionally, sugars have signalling properties, which interact with stress-signal pathways to modulate metabolism (Gupta and Kaur, 2005). Feeding external glucose to tomato plants resulted in a decrease of the pigment content, as is observed in Sa. But similar accumulation of soluble sugars might account for the decrease in photosynthesis noted in most studies on metal-exposed plants (Vinit-dunand *et al.*, 2002; Maksymiec, 2007). The reverse relationship between sugar accumulation and photosynthesis stems from the sugar-induced down regulation of the expression of gene coding for photosynthetic proteins (Paul and Pellny, 2003; Oswald *et al.*, 2001). A non-significant increase in salicin was also observed, as for the sugars mentioned above, the accumulation of salicin was previously observed in trees exposed to environmental stressors (Gebre *et al.*, 1997; Guignard *et al.*, 2005).

The overall view on the results from the above mentioned parameters is that although the Sa plants do not experience an effect on biomass production, it is this clone that is suffering most from the imposed

stress. Nonetheless, the corresponding parameter in Sf generally changes in the same direction but with a metal induced impact that is not significant. Differences in the direction of change are observed in biomass production, decreased in Sf but stable in Sa, and electrolyte leakage. For the proteomics results exactly the same conclusions can be drawn. The majority of spots increasing/decreasing in Sa also increase/decrease in Sf but not to the same extent, often passing from significant (fold change <- 1.5 or >1.5, T-test $p < 0.01$) to insignificant. Only three groups of proteins do not follow this pattern, proteins that are part of the antioxidant system and proteolytic proteins.

Proteins from the Calvin Cycle, or directly related to this, were identified in 13 spots; RuBisCo large chain spots 623, 748, 371, 654, RuBisCo small chain spots 1857, 1871, 1886, 1887, RuBisCo activase spots 902, 982, 984 and sedoheptulose-1,7-bisphosphatase spots 1069 and 1073 (Table 3). Most of these, excluding some of the RuBisCo large chain containing spots, are less abundant in both clones as are the proteins involved in light-harvesting or oxygen generation, spots 1377, 1532 and 1571. These results are in agreement with those previously observed in abiotic stress studies. The decreased amount of RuBisCO and RuBisCO activases, indicates a diminution of the CO₂ fixation capacity due to the presence of metals (Portis, 2003; Demirevska-Kepova *et al.*, 2005; Andersson and Backlund, 2008; Kieffer *et al.*, 2008; 2009a,b; Durand *et al.*, 2010b; Lingua *et al.*, 2012). This diminution in carbon fixation is confirmed by the decreased intensity of two spots containing sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, a key enzyme in ribulose-1,5-bisphosphate regeneration (Hasan *et al.*, 2009; Zoghlami *et al.*, 2011), known to be important in determining the photosynthetic capacity (Feng *et al.*, 2007). Spots containing proteins involved in the photosystem are likewise less abundant in metal-stressed plants and again the impact on Sa is more important than that on Sf. This is linked with the decreased Fv/Fm ratio, showing the same difference between the clones.

Chloroplastic ATP synthase beta subunit (791) was less abundant in both clones in presence of metals, again linked with the suppression of photosynthesis. A vacuolar proton ATPase, catalytic subunit A (625), was, on the contrary, more abundant in presence of metal for Sf. This protein, an ATP-dependent proton pump which transports protons across membranes, was previously found to be induced in the presence of an excess of metals (Zhou *et al.*, 2008; Kieffer *et al.*, 2008).

Two proteins were found to be more abundant after two months of growth on polluted substrate, this was the case for two spots containing phenylcoumaran benzylic ether reductase (spots 1265 significant for Sf and spot 1268 only significant when comparing control versus exposed); the direction of change was the same for Sa but not significant. Phenylcoumaran benzylic ether reductase (PCBER) is an enzyme involved in cell wall dynamics and lignan synthesis (Vander Mijnsbrugge *et al.*, 2000). PCBER are predominantly found in secondary xylem and associated with the active growth period (Vander Mijnsbrugge *et al.*, 2000). Several PCBER have been identified by screening for plant genes that are induced by fungal elicitors or during defensive responses and increased protection against oxidative stress has been suggested (Gang *et al.*, 1999; Sohn *et al.*, 2005), but involvement in plant

growth regulation has likewise been suggested for the coumaran lignans produced by this enzyme (Binns *et al.*, 1987). In our case, we can hypothesize that inducing cell wall synthesis proteins helped maintain membrane integrity, which corroborates the electrolyte leakage results.

While the above-discussed proteins changed in the same direction in both clones, three groups of proteins have a completely different expression pattern in Sa and Sf when exposed to metallic stress; these are the FTSH proteases, succinate dehydrogenase and proteins involved in antioxidant responses. Three spots containing predicted ATP-dependent zinc metalloprotease (FTSH) (612, 613, 604) were more abundant in metal-treated Sa whereas the protein was not differentially expressed, with a trend towards increased accumulation, between the two conditions in Sf. ATP-dependent protease FTSH contains both intrinsically chaperone and proteolytic activities (Schumann, 1999; Tsai *et al.*, 2012). The specific identification of FTSH protease in this study in three spots with coherent fold changes makes it an interesting enzyme to study further. For the moment the exact physiological function is unknown, it is known to be involved in the degradation of photosystem subunits, for the D1 protein this involvement is confirmed both *in vitro* and *in vivo* (Bailey *et al.*, 2002). Furthermore, the *in vitro* degradation of light harvesting complexes by FTSH has been observed but *in vivo* confirmation is currently lacking (Wagner *et al.*, 2011). In the current study, no proof on changes in degradation of photosynthesis-related proteins was found.

The fact that FTSH is linked to the degradation of oxidatively inhibited photosystem proteins and that this protein is less abundant in Sa is interesting when looking at the changes in proteins involved in the antioxidant system. All these are likewise less abundant in Sa. A reaction contrary to what is expected for metal-exposed plants (Dixit *et al.*, 2001; Nepovim *et al.*, 2004; Durand *et al.*, 2010b). Glutathione-S-transferases (GST) are ubiquitous and multifunctional proteins involved in the detoxification of lipophilic compounds. Dehydroascorbate reductase, part of the Halliwell-Asada pathway (DHAR) (spot 1568) is also known to play an important role in protecting plant cells from oxidative damage (Öztetik, 2008; Kim *et al.*, 2012; Dominguez *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2009). 2-Cys peroxiredoxins is a family of antioxidative peroxidases where the two cysteine residues are involved in the reduction of peroxides (Baier and Dietz, 1994; Kim *et al.*, 2011).

The predicted enzyme, the succinate dehydrogenase flavoprotein (628, 646), was more abundant in treated Sa while stable in Sf. The succinate dehydrogenase complex (SDH) is a succinate:ubiquinone oxidoreductase integrated in the inner membrane of mitochondria and the flavoprotein subunit is one of the four subunits. This protein forms the complex II of the electron transport chain and is also a functional component of the Krebs cycle (Lenaz and Genova, 2010; Eprintsev *et al.*, 2012). SDH also catalyses the conversion of succinate in gluconeogenesis (Eprintsev *et al.*, 2012). The increased accumulation of succinate dehydrogenase in Sa might help maintain mitochondrial succinate-dependent respiration that is known to be inhibited by metals (Tan *et al.*, 2010). On the other hand, it

might also indicate increased respiration, as was previously reported for poplar exposed to Cd (Durand *et al.*, 2010b).

Grouping all the data results in a picture of two different willow-clones, producing the same biomass when exposed to excess metals, but which have different strategies of coping with imposed stress. The primary production in both clones changes in the same direction; a decrease in proteins involved in photosynthesis coinciding with a decrease of the Fv/Fm ratio. In the Sf clone this decrease is not accompanied by increased cellular damage because it maintains functions that could aid in limiting this damage at least at the same level as in control conditions. In the Sa clone, there is an increase in cellular damage, illustrated by the increased electrolyte leakage (Figure 2B), and functions that could counteract this damage or eliminate damaged molecules appear to decrease. The antioxidant system in Sa decreases while in Sf enzymes linked with protection against oxidants (Table 3 headings Secondary metabolism & Antioxidant system) are increased or maintained.

The mechanisms that account for these observations are not known but indications that sugar accumulation may be a determining factor in the observed proteome level changes have been described. The decrease in root growth and the corresponding diminution of the sink strength results in the accumulation of sugars in source leaves; the leaves sampled in the current study. In several studies on plants this was observed for instance in cucumber treated with copper (Alaoui-Sossé *et al.*, 2004). The accumulation of soluble sugars in source leaves is known to have an allosteric effect on the activity of proteins but also to influence gene expression (Ho *et al.*, 2001; Gupta and Kaur, 2005). One of the pathways regulated by the repression of its genes by high sugar concentrations is photosynthesis, by lowering the activity of this pathway further generation of reactive oxygen is limited. A sugar-induced decrease in photosynthesis might be the mechanism by which the Sa clone limits the generation of ROS, and settles a new homeostasis without necessitating a significant reduction in growth, be it at the expense of an increase in cellular damage. In the Sf clone no accumulation of sugars is observed, the efficiency of photosynthesis is likewise decreased but as seen in the Fv/Fm data (Figure 2A) not to the same degree as in Sa. However, contrary to the Sa clone, the Sf clone has to increase the abundance of proteins with antioxidant activities or at least keep them at the same level as in control plants and this at the price of a significant reduction in biomass production (Figure 1). Renaut *et al.* (2004) showed that the cessation of growth in poplar was a mechanism of protection against cold exposure.

4. Conclusion

The *S. fragilis* clone and *S. aurita* clone share common responses when grown on polluted substrate compared to control conditions. The most striking results are a decrease in Fv/Fm ratio and a decrease in most of the major pigments. This is combined with proteomic changes in the same direction for most of the identified proteins. However, some of the parameters are also very different; the Sa clone

has the same biomass production, while that of Sf is significantly lower on polluted substrate. Furthermore, the Sa clone, but not Sf, has several characteristics that are commonly linked with exposure to stress; increased accumulation of sugars and increased cellular damage.

Taken with the proteome-level data, this indicates that the Sa clone can maintain its production but as a result has to face increased damage due to metal exposure. By not inducing mechanisms to protect the cells from the oxidative stress linked with metal exposure growth can be maintained. These protective mechanisms are induced or maintained at the control-level in Sf, only slight increases in the accumulation of sugars are observed but growth is significantly lower, indicating the energy dissipated by Sf in maintaining cellular homeostasis.

In a follow-up study the long-term effect of this clonal difference in strategy could become clear.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge financial support from the project Ecolirimed, co-financed by the Fonds Européen de Développement Régional as part of the program Interreg IV A ‘Grande Région’. This study was also supported by the National Research Fund, Luxembourg as part of the project ENERREM-CORE call 2008. We thank the Unité de Génie biologique of the Centre wallon de Recherches agronomiques (Belgium) for supplying the willow plants. We acknowledge Dr Lucien Hoffmann from the CRP and Gabriel Lippmann for their careful reading of the manuscript, Johanna Ziebel for the elemental analyses, Laurent Solinhac, Marine D’Aulisa and Myriam Pilliet for their technical help and Sebastien Planchon for his support during the proteomics experiments.

The authors declare no financial/commercial conflicts of interest.

Conclusion du point IV

A l'issue du point I, le clone 47 (*Salix aurita*) a été mis en évidence comme le seul clone, parmi ceux testés, présentant les deux critères d'un phytoextracteur potentiel : à savoir une bonne production de biomasse couplée à de fortes teneurs en métaux. L'objectif du point IV est de vérifier la tolérance de ce clone en utilisant une approche physiologique et protéomique et en comparant les résultats obtenus à ceux pour le clone 45 (*Salix fragilis*). Ce dernier a été choisi pour sa production de biomasse, similaire à celle du clone 47, sans pour autant avoir accumulé des teneurs importantes en métaux dans les tiges. Une analyse comparative des deux clones a été réalisée en utilisant un substrat non contaminé (témoin) et dans un substrat artificiellement contaminé (Cd, Zn, Ni, Cu).

La production égale de biomasse en présence de métaux a été confirmée alors qu'un substrat artificiellement contaminé a été utilisé. Cependant, les réponses à la présence de métaux sont différentes d'un clone à l'autre. La production de biomasse du *Salix aurita* n'est pas influencée alors que le *Salix fragilis* voit sa biomasse diminuer en présence des métaux. Dans le substrat contaminé, les teneurs en zinc et en nickel augmentent dans les parties aériennes des deux clones. Le cadmium, quant à lui, n'augmente que dans les tiges. Par contre, bien que les teneurs en cuivre soient 60 fois plus élevées dans le sol contaminé par rapport au sol témoin, les tiges et les feuilles des deux clones présentent des teneurs en cuivre plus faibles. Les autres métaux étant également présents en fortes teneurs, ceux-ci pourraient réduire l'absorption du cuivre mais nos essais ne permettent pas de le confirmer. Bien que la concentration en manganèse n'ait pas été augmentée dans le substrat contaminé, *S. aurita* a accumulé davantage ce métal en comparaison à *S. fragilis*. Cependant, *S. aurita* présente des teneurs en manganèse plus élevées dans les tiges en présence de métaux alors que les feuilles l'accumulent davantage en milieu contrôlé. Nous avons dès lors suggéré que les autres métaux peuvent influencer l'accumulation et le transport du manganèse chez ce clone.

Les analyses physiologiques et protéomiques indiquent des signes de stress chez les deux clones. Cependant, l'impact des métaux serait plus important chez *S. aurita*, alors que la biomasse de ce dernier n'a pas varié en présence de métaux. Bien que sa production de biomasse soit maintenue en présence des métaux, *S. aurita* doit toutefois faire face à davantage de dommages cellulaires :

- Une perte d'électrolytes indiquant des dégâts au niveau de la membrane.
- Une moindre abondance des protéines impliquées dans la photosynthèse, couplée avec une diminution de l'efficacité du photosystème II.
- Une moindre abondance en protéines impliquées dans les défenses antioxydatives.

D'autre part, nous avons pu constater une concentration en sucres plus élevée dans les feuilles de *S. aurita*. Nous pouvons suggérer que cette accumulation en sucres est une stratégie de tolérance

développée chez ce clone car les sucres peuvent limiter les dommages oxydatifs généralement associés aux stress biotiques et abiotiques (osmoprotection, interaction directe avec les ROS) (Samarakoon et Rauser, 1979 ; Bolouri-Moghaddam *et al.*, 2010 ; Spieß *et al.*, 2012). L'accumulation en sucres peut réduire la concentration en pigments (Vinit-Dunand *et al.*, 2002 ; Maksymiec, 2007), ce qui pourrait notamment expliquer nos résultats observés chez *S. aurita*. L'accumulation des sucres dans les feuilles peut également être liée à une diminution de la croissance racinaire, comme cela a pu être observé chez le concombre avec le cuivre (Alaoui-Sossé *et al.*, 2004). Cependant, nos résultats ne nous permettent pas de vérifier cette hypothèse.

En conclusion, bien que *S. aurita* présente les critères d'un phytoextracteur potentiel, nos résultats n'indiquent pas clairement le développement d'une stratégie lui permettant de tolérer les métaux. Nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle l'absence de mécanismes de tolérance chez ce saule pourrait avoir une incidence sur sa capacité de survie, lors d'une exposition prolongée aux métaux. En revanche, la réduction de la croissance en présence de métaux chez *S. fragilis* indiquerait une utilisation de l'énergie pour maintenir l'homéostasie cellulaire des métaux. Ceci constitue donc une stratégie de tolérance développée par ce clone.

Discussion sur le chapitre 2

D'un point de vue phénotypique...

Le premier criblage de 2010 a pu mettre en évidence des clones de saules ayant de faibles ou de forts rendements en biomasse alors que ceux-ci ont été plantés dans un même substrat contaminé aux métaux. Les teneurs en métaux dans les tiges indiquent également une variabilité entre les clones quant à leur capacité à accumuler ces éléments.

La variabilité inter et intra spécifique se rencontre fréquemment dans la littérature. Or, le but de nos essais n'était pas d'évaluer la variabilité intra ou interspécifique chez le saule, mais bien de sélectionner les individus potentiellement intéressants en phytoremédiation, toutes espèces confondues. Le facteur « espèce » n'a donc pas été pris en compte, mais pourrait expliquer la variabilité des réponses obtenues dans nos travaux. L'identification d'une partie des clones utilisés indique que nous avons principalement exploité des hybrides *Salix alba x fragilis*. Une exception est toutefois à mettre en évidence : le clone 47 s'est avéré être un *Salix aurita*. Le fait qu'il se différencie des autres clones (cf. point I) pourrait s'expliquer par le facteur « espèce ». Ce facteur devrait être plus investigué.

Les clones présentant les plus fortes productions de biomasse ne sont pas ceux chez qui nous retrouvons les plus fortes teneurs en métaux. En effet, pour le cuivre, le fer, le cobalt et le plomb, les clones ayant produit le moins de biomasse montrent les plus fortes teneurs en contaminants. Quelques forts producteurs de biomasse accumulent des teneurs importantes en manganèse, cadmium, zinc et nickel. Toutefois, pour ces métaux, l'accumulation ne semble pas suivre le facteur « biomasse ». Grâce à la production élevée de biomasse, la quantité de métaux extraite reste importante, bien que les teneurs en métaux dans les tiges soient faibles (cf. point III). Greger et Landberg (2001) ainsi que Ekvall et Greger (2003) ont également obtenu ces résultats et ont suggéré un effet de dilution.

Les clones peuvent être triés sur base des teneurs en métaux dans leurs tiges annuelles. Cependant, ils ne peuvent pas être classés comme phytoextracteurs et ceci pour deux raisons. Premièrement, les valeurs des facteurs de bioaccumulation (BCF) sont généralement bien inférieures à 1 pour la plupart des métaux, indiquant que les saules ne sont pas des accumulateurs actifs (Fitz et Wenzel, 2002 ; Yoon et al., 2006). Deuxièmement, même si pour le cuivre et le cadmium nous retrouvons des concordances entre les résultats statistiques et les BCF (classement fort accumulateur et BCF >1), le transfert des métaux dans les parties aériennes est limité et donc les teneurs en métaux restent trop faibles pour permettre une phytoextraction efficace (Vervaeke et al., 2003).

L'ensemble de ces résultats « phénotypiques » indique une tolérance aux métaux chez les saules étudiés. Cette tolérance est expliquée par leur capacité à restreindre le transfert vers les parties aériennes. Les saules constituent donc une essence appropriée pour la phytostabilisation des métaux dans le sol. Nous pouvons faire l'hypothèse que les clones de saules étudiés ici sont à considérer comme exclueurs (Fitz et Wenzel, 2002).

Le transfert des métaux vers les parties aériennes est limité mais, malgré tout, les teneurs ne sont pas négligeables et, pour certains d'entre eux, ces teneurs sont proches des seuils de phytotoxicité trouvés dans la littérature (cf. point I). De ce fait, bien que les saules développeraient une stratégie d'exclusion, la disponibilité du métal dans le substrat et la transpiration de la plante permettraient une extraction passive des métaux (Greger et Landberg, 2001; Pietrosanti *et al.*, 2009 ; Marmioli *et al.*, 2011). Par conséquent, le saule pourrait indiquer des signes physiologiques d'intolérance aux métaux, s'il ne déploie pas de mécanismes d'homéostasie des métaux essentiels et de défense antioxydative réduisant l'impact négatif des métaux toxiques. C'est pourquoi, pour compléter ces analyses phénotypiques de la tolérance, il est important de considérer les réponses physiologiques et protéomiques induites par la plante en présence de métaux.

Les clones ayant produit un meilleur rendement en termes de biomasse ont été plantés de nouveau dans le substrat utilisé lors de la première expérience en 2010 (point I) afin de quantifier les teneurs présentes dans les tiges mais également dans les feuilles. D'un point de vue « phytoremédiation », il est préférable que le transfert vers les feuilles soit réduit afin de limiter les risques de remobilisation des métaux par dégradation de la litière. Les résultats obtenus dans la deuxième expérience (point II), ainsi que ceux de la littérature, indiquent des teneurs plus importantes dans les feuilles que dans les tiges. Bien que les teneurs foliaires en métaux interpellent vis-à-vis du risque de remobilisation, ce risque reste moins élevé comparativement aux valeurs très importantes obtenues pour les plantes hyperaccumulatrices. Dans un contexte de valorisation d'un site pollué par la mise en place d'un T(t)CR, ce risque de remobilisation pourrait constituer un inconvénient de la phytostabilisation et il devrait donc être évalué sur le terrain.

D'un point de vue physiologique et protéomique...

Bien qu'ils aient été soumis aux mêmes conditions de croissance, les clones de saules présentent des différences au niveau de la biomasse. Nous nous sommes demandé si les saules forts producteurs de biomasse (HBP) montraient des signes physiologiques et protéomiques indiquant une tolérance par rapport aux faibles producteurs de biomasse (LBP). Ces deux groupes ont donc été comparés au niveau des paramètres de fluorescence chlorophyllienne (F_o , F_m et F_v/F_m), des teneurs foliaires en sucres et, enfin, de l'expression des protéines.

L'approche physiologique révèle que ces deux groupes sont tolérants aux métaux. Les deux groupes induisent une plus forte expression des protéines impliquées dans le système de défense antioxydatif. Cependant, l'abondance de ces protéines est plus importante chez les LBP. Une protéine du complexe protéinique du PSII impliquée dans l'oxydation de l'eau pour la photosynthèse (OEC pour « extrinsic oxygen-evolving complex ») est également plus abondante chez ce groupe de saules. Cette présence indique une altération probable dans l'assemblage du PSII, sans pour autant affecter leur efficacité photochimique, lorsqu'elle est comparée à celle des HBP. Ces résultats montrent donc que les deux groupes sont soumis à un stress oxydatif et celui-ci pourrait résulter d'un stress métallique. Les deux

groupes présentent des symptômes de tolérance à ces stress par la synthèse de protéines spécifiques qui sont toutefois plus abondantes chez les LBP. Ceci pourrait être lié au fait que les teneurs en plomb sont plus importantes chez ces derniers. Nous pouvons également constater que, pour les LBP, les teneurs en cuivre, fer et zinc sont relativement proches des teneurs phytotoxiques indiquées dans la littérature. Les clones HBP et LBP sont donc tolérants aux métaux, les LBP investiraient plus d'énergie dans les mécanismes de tolérance. Cet investissement plus important pourrait être une cause de la différenciation dans la biomasse. L'absence de situation contrôle au départ ne nous permettait pas de confirmer cette hypothèse. Toutefois, les résultats obtenus lors du dernier essai avec un sol témoin, abondent dans ce sens.

A l'issue du point I, le clone 47 (*Salix aurita*) a été mis en évidence comme le seul clone, parmi ceux testés, présentant les deux critères d'un phytoextracteur potentiel : à savoir une bonne production de biomasse couplée à de fortes teneurs en métaux. La tolérance de ce clone a donc été étudiée en utilisant une approche physiologique et protéomique (point IV). L'essai du point IV se construit sur la comparaison du clone 47 au clone 45, deux clones à production de biomasse similaire mais aux teneurs en métaux différentes dans les tiges. Ces clones ont été plantés dans un substrat artificiellement contaminé aux métaux afin de pouvoir bénéficier d'une situation contrôle. En ce qui concerne la mobilité des métaux dans l'appareil aérien, les résultats de cet essai indiquent que, chez le saule, le zinc et le nickel se retrouvent davantage dans les feuilles que dans les tiges, contrairement au cuivre qui s'accumule davantage dans ces dernières. Ceci corrobore donc les résultats obtenus en 2011, ce qui rend probable le risque de remobilisation des métaux par la dégradation de la litière.

Grâce à la situation témoin, nous avons pu observer que la production de biomasse diminue en présence de métaux pour *S. fragilis* mais pas pour *S. aurita*. Les résultats physiologiques indiquent des signes de stress chez les deux clones mais ils sont plus prononcés chez *S. aurita* bien qu'il ait maintenu sa production de biomasse en présence de métaux. Le peu d'abondance des protéines du cycle de Calvin indique une diminution de la capacité à fixer le CO₂ en présence des métaux. Ces résultats coïncident avec la réduction de l'efficacité photosynthétique observée chez ces deux clones. D'autres protéines sont par ailleurs sous-régulées chez *S. aurita* alors que leur abondance est maintenue, voire légèrement en hausse chez *S. fragilis*. Parmi elles, nous retrouvons les protéines impliquées dans les mécanismes de réparation des protéines endommagées et dans les systèmes antioxydatifs, ce qui est un résultat opposé à ce que nous attendions chez une plante tolérante. Comme nous l'avons mentionné dans la conclusion du point IV, *S. fragilis* réduirait sa production de biomasse en faveur de mécanismes de tolérance lui permettant de maintenir l'homéostasie cellulaire des métaux. Une autre constatation, visible uniquement chez *S. aurita*, est l'accumulation des hexoses, alors que la photosynthèse est réduite et la croissance maintenue. De ce constat, nous avons pu tirer des interprétations différentes. Premièrement, cette accumulation en sucres serait une stratégie de tolérance développée chez ce clone et ce, pour deux raisons :

- les sucres peuvent agir comme osmoprotectants et/ou peuvent limiter les dommages oxydatifs souvent liés aux stress biotiques et abiotiques ;
- les concentrations en sucres importantes peuvent inhiber la synthèse de protéines impliquées dans la photosynthèse, ce qui limite la production de ROS.

Deuxièmement, l'accumulation des sucres dans les feuilles serait plutôt caractéristique d'une absence de mécanismes de tolérance :

- l'accumulation des hexoses est liée à une diminution de la croissance racinaire ([Alaoui-Sossé et al., 2004](#)) ;
- dans la littérature, l'accumulation de sucres est observée en réponse à la présence du cadmium ([Kieffer et al., 2009a](#); [Zoghlami et al., 2011](#)). Cependant, cette même littérature associe cette accumulation à une diminution de la biomasse : les sucres, moins utilisés pour la synthèse de tissus, sont stockés. Dans notre cas, nous n'avons pas observé de diminution de la biomasse, ce qui nous laisse penser qu'il s'agit d'une mauvaise utilisation des réserves due à un dysfonctionnement des protéines spécifiques.

En conclusion, *S. aurita* a présenté les critères d'un phytoextracteur potentiel d'un point de vue phénotypique. Cependant, d'un point de vue physiologique et protéomique, nos résultats n'indiquent pas clairement le développement d'une stratégie lui permettant de tolérer les métaux.

Le **chapitre 2** traite de l'impact des métaux sur le **saule sans considérer la colonisation des racines des ligneux par divers micro-organismes, dont les champignons**. Ces derniers jouent un rôle dans la nutrition de la plante grâce à leurs hyphes qui parcourent le volume de sol et permettent de véhiculer les éléments nutritionnels vers les racines ([Smith et Read, 2008](#)). Les champignons rhizosphériques sont donc très importants dans le développement des ligneux. Cependant, le développement de ces micro-organismes peut aussi être influencé par les métaux, ce qui peut perturber le développement des saules en présence de polluants. Le **chapitre 3** traite donc de l'impact des métaux, plus particulièrement du cadmium, sur des **souches fongiques** associées aux racines du saule et de l'aulne.



Chapitre 3

Impact du cadmium sur des souches fongiques associées aux racines des ligneux

- I. Mise en place d'un protocole *in vitro* de sélection de souches fongiques associées à la rhizosphère de ligneux

 - II. Criblage *in vitro* de souches fongiques associées aux racines des saules et des aulnes en fonction de leur sensibilité au cadmium
-

Chapitre 3 : Impact du cadmium sur des souches fongiques associées aux racines des ligneux

L'utilisation des micro-organismes comme technique de dépollution (bioremédiation) est bien connue et maîtrisée en ce qui concerne les polluants organiques les plus légers. Elle consiste à dégrader les hydrocarbures en utilisant les voies métaboliques des bactéries (*Pseudomonas*, *Vibrio*, *Achromonas*, *Actinomyces*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*), levures (*Candida*, *Hansenula*, *Torulopsis*) et champignons (*Phanerochaete chrysosporum*) (Aldric *et al.*, 2011). Le développement de ces micro-organismes est alors stimulé *in situ* ou ceux-ci peuvent être sélectionnés et injectés sous forme de « starter » dans le sol contaminé. A l'inverse des polluants organiques, les métaux ne sont pas dégradables. Cette méthode n'est donc pas applicable dans notre travail. Cependant, de nombreuses mycorhizes, et bactéries représentent une vaste population de micro-organismes composant la rhizosphère des végétaux. Les mycorhizes, symbioses entre les racines des végétaux et des champignons du sol, par exemple, ont un rôle majeur dans la nutrition de la plante grâce aux hyphes qui parcourent le volume de sol facilitant l'influx des éléments nutritionnels vers les racines. A l'inverse, la plupart de ces mycorhizes sont dépendantes du carbone organique fourni par la plante (Smith et Read, 2008). Plusieurs types de mycorhizes sont répertoriés et peuvent coexister sur un même système racinaire: il s'agit des mycorhizes à arbuscules (AM), ectomycorhizes (ECM), mycorhizes éricoïdes (ERM) et arbutoïdes (Smith et Read, 2008). Les ectomycorhizes sont les associations typiques des essences forestières (*Fagaceae*, *Betulaceae*, *Salicaceae*, *Leptospermoideae*, *Pinaceae*) (Taylor et alexander, 2005). Enfin, il existe un autre groupe de champignons rhizosphériques, les endophytes (DSE pour « dark septate endophytes »). Ces champignons ne sont pas considérés comme de réels symbiontes mycorhiziens mais leur abondance au niveau des racines n'est toutefois pas négligeable (Smith et Read, 2008). Ils appartiennent à plusieurs taxons mais sont souvent des ascomycètes. Les espèces les plus identifiées sont *Leptodontidium orchidicola*, *Cryptosporiopsis rhizophila* et *Phialocephala fortinii* (Newsham *et al.*, 2009). Des études suggèrent que les DSE ont un rôle dans la disponibilité de l'azote et du phosphore au niveau du sol (Smith et Read, 2008 ; Upson *et al.*, 2011).

En se basant sur ces connaissances, l'hypothèse que l'ensemble de ces micro-organismes rhizosphériques puissent jouer un rôle dans la mobilisation des métaux et la tolérance chez les végétaux a été émise (Rajkumar *et al.*, 2012). Bio et phytoremédiation peuvent alors être associées pour les polluants non organiques. Plusieurs scénarii ont été testés afin de savoir si les micro-organismes du sol augmentent la disponibilité et, donc, l'extraction des métaux par la plante ou, à l'inverse, protègent celle-ci de leurs effets néfastes (Fitz et Wenzel, 2002 ; Baum *et al.*, 2006). Pour tester ces scénarii, certains essais ont été réalisés notamment *in vitro* sur différentes ECM avec différents métaux, en l'absence de plante hôte.

Objectifs et Stratégie

Les racines de la plupart des essences ligneuses sont colonisées par des micro-organismes du sol. La rhizosphère, définie comme le volume de sol se trouvant à proximité immédiate des racines, constitue un écosystème à part entière. En conséquence, il est intéressant d'associer l'impact de ces micro-organismes dans l'étude de la tolérance des ligneux aux divers stress.

L'étude des micro-organismes rhizosphériques sur la tolérance des ligneux aux métaux est basée sur plusieurs hypothèses :

1. La toxicité des métaux peut affecter la diversité biologique de la rhizosphère.
2. En compromettant la survie des organismes symbiotiques, elle affecte indirectement la croissance des ligneux.
3. Ces micro-organismes, comme les végétaux, déploient des mécanismes de tolérance lorsqu'ils sont confrontés à des stress abiotiques.
4. Ces mécanismes de tolérance sont, *in fine*, favorables à la croissance des végétaux, soumis aux mêmes stress abiotiques.

Le projet ECOLIRIMED fixe l'objectif d'évaluer la tolérance aux métaux de champignons isolés à partir des racines d'aulnes et de saules. En ce sens, en 2009, des souches fongiques associées aux racines de ces ligneux, localisés le long de berges de cours d'eau non navigables, ont été récoltées. Suite à ce travail de prospection, une mycothèque de 91 souches fongiques a été réalisée. L'étude de la sensibilité au cadmium a ensuite été réalisée sur cette collection de souches (Figure IV). Le cadmium a été choisi pour deux raisons. Premièrement parce que, comme le plomb, il ne constitue pas un élément essentiel pour les organismes vivants. Deuxièmement, parce que, contrairement au plomb, le cadmium est plus facilement assimilable et est dès lors plus toxique que celui-ci (Balsberg Pahlsson, 1989).

Ce chapitre 3 comprend deux points :

- **Point I :** Présentation sous forme d'article d'un protocole *in vitro* permettant d'évaluer rapidement la tolérance au cadmium chez les souches fongiques de la mycothèque :

Ce point est présenté sous forme d'un article intitulé « *Effects of Cd on ectomycorrhizal fungal growth. Efficacy of in vitro screening experiment* ».

- **Point II :** Utilisation du protocole développé dans le point précédent afin de caractériser les souches fongiques de la mycothèque sur base de leur sensibilité au cadmium.

Ce point est présenté sous forme d'un article intitulé « *In vitro highlight of Cd tolerant dark septate endophytes* ».

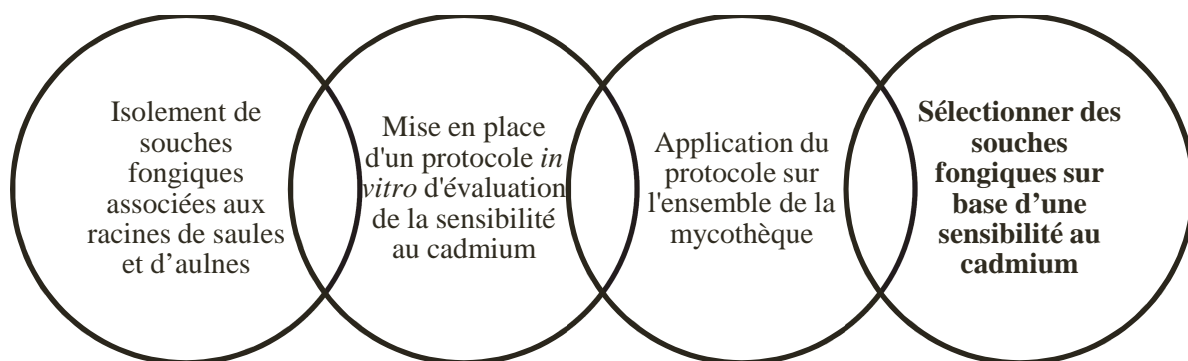


Figure IV : Schéma regroupant les trois stratégies (cercles) développées dans le chapitre 3 consacré à l'étude de la sensibilité au cadmium de souches fongiques issues des racines d'aulnes et de saules.

I. Mise en place d'un protocole *in vitro* de sélection de souches fongiques associées à la rhizosphère de ligneux

Article:

Effects of Cd on ectomycorrhizal fungal growth. Efficacy of in vitro screening experiment

Aricia Evlard, Bruno Campanella, Roger Paul

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

Publié dans *Agrochimica*, 2011, 55(2): 85-93.

SHORT COMMUNICATION

Effects of Cd on ectomycorrhizal fungal growth. Efficacy of *in vitro* screening experiment

A. Evlard*, B. Campanella, R. Paul

Laboratory of Environmental Toxicology, Plant Biology Unit, University of Liège, Gembloux
AgroBio-Tech, 2, passage des Déportés, B-5030 Gembloux, Belgium

Keywords: *Alnus*, *Salix*, tolerance, heavy metals, protocol

* Corresponding author: Aricia.Evlard@ulg.ac.be

INTRODUCTION – Phytoremediation, i.e. the use of plants to extract or stabilize heavy metals (HM) present in soils, is a biological technique which has been increasingly investigated over recent years (Raskin *et al.*, 1997; Khan *et al.*, 2000; Lasat, 2002). We tend now to plant trees that produce a large biomass such as poplars, alders and willows (Dickinson, 2000; Meers *et al.*, 2005; Meers *et al.*, 2007; Rosselli, 2003).

But, in the field, the roots of most of these trees are colonized by ectomycorrhizal fungal species (ECM). Although the presence of HM in soils can strongly affect mycorrhizal diversity, it has been shown that HM uptake and tolerance depend on both plants and ECM fungi (Hartley-Whitaker *et al.*, 2000a; Jentschke *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2000). The presence of these mycorrhizas may play an important role in the prevention of translocation (Colpaert *et al.*, 1993; Galli *et al.*, 1994; Leyval, 1997; Turnau, 1998; Hartley-Whitaker *et al.*, 2000b; Jentschke *et al.*, 2000; Van Tichelen, 2001; Lasat, 2002; Krupa *et al.*, 2003; Prasun *et al.*, 2005; Sell, 2005; Krznaric *et al.*, 2009, 2010) or in heavy metal uptake, in fewer cases (Colpaert *et al.*, 1992a; Khan *et al.*, 2000; Fernandez, 2008).

Tolerance of ECM fungal species to HM has been studied *in vitro* in recent years in phytoremediation projects, mostly in relation to Cd (Colpaert *et al.*, 1992b, 2000; Hartley *et al.*, 1997; Blaudez *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003; Fomina *et al.*, 2005; Krznaric *et al.*, 2010). This kind of test provides a rapid screening of metal tolerance of several ECM fungal strains (Blaudez *et al.*, 2000; Colpaert *et al.*, 2000; Prasun *et al.*, 2005), although selection of tolerant fungi based on *in vitro* growth trials cannot guarantee the success of their survival and/or symbiosis with trees in field trials (Hartley-Whitaker *et al.*, 2000a). In addition, *in vitro* tolerance of an ECM fungus does not necessarily predict its tolerance once in symbiosis (Colpaert *et al.*, 1992a)

The majority of these studies have involved the isolation of ECM fungal species from *Pinus* sp. However, in the present study, forty-seven ECM fungal strains were collected from the roots of alders and willows. The alders and willows were located along waterways in two regions of the Walloon area of Belgium (Hainaut and Namur), where there is a low anthropogenic Cd contamination, but also in another region (Liège) where there is a naturally high background of Cd of geological origin. The principal objectives of this study were: (1) to verify a protocol allowing an *in vitro* screening of these ECM fungal strains for their Cd-sensitivity, measured as inhibition of biomass production; (2) to discover whether there is a link between the Cd-sensitivity of these strains and Cd concentration in the soil of origin; (3) to select non sensitive strains for the inoculation of alders and willows and (4) to describe the role of the strains in the Cd-tolerance of plants i.e. their role as bioremediation promoters in polluted soils.

MATERIAL AND METHODS – *Ectomycorrhizal fungal strains*. Strains were collected from different sites in three provinces of Wallonia (Fig. 1). Trace-elements were analysed on each soil sample from which we obtained ECM fungal strains (Table 1). We defined each strain and its

associated tree by the GPS position of where the strain was collected. The depth of drilling was 20 cm maximum.

Isolation of ECM fungal strains. The root system was washed and mycorrhizal root tips were collected. We determined one to three strains per root system, which we photographed and described using the method of [Agerer \(1987\)](#). Mycorrhizal root tips were cut, disinfected in H₂O₂ and methanol for 30 seconds, and then rinsed in sterilised distilled water. The tips were placed in Petri dishes containing modified Melin-Norkrans (MMNC) medium ([Bruns & Read, 2000](#)), which were installed first in a culture chamber at 24 °C (Aqualytic, Liebherr) to aid ECM fungal growth, then at 4 °C to slow the growth down. Some strains were lost due to contamination. In total, forty-seven strains were used for the tolerance test. 18, 18 and 11 strains were obtained from sites in Hainaut, Namur and Liège, respectively.

Cd treatment and measurement of biomass production. We used a liquid medium of the same modified MMNC medium described above to measure tolerance through fungal biomass production in four treatments (0, 1, 5 and 10 mg Cd.l⁻¹ as CdSO₄). pH was adjusted to 5.5 ± 0.3.

Inocula of a constant size (25 mm² plugs) were taken from the edge of the colony, where growth is more active, and placed in vials containing 10 ml of sterile liquid medium. One plug of each strain was immediately harvested to determine the mean dry weight of ECM fungal biomass at the start of the treatment. We prepared three replicates of each treatment and allowed them to grow for 17 days in a culture chamber at 24 °C (Aqualytic, Liebherr) in the dark.

For each replicate, the mycelia were harvested, dried in an oven overnight at 60 °C, then weighed. The dry weight increment was then calculated to determine the fungal dry weight production during the 17d test period.

Calculation and statistics. A one-way analysis of variance (ANOVA), using Minitab v.15, was performed on the data with Cd concentration as the variable factor (p < 0.05). We used Fisher's Multiple Comparison Test to compare all the samples pairwise between the four treatments (p < 0.05).

The mean of the biomass variation (1) of each strain was calculated as the percentage of growth on medium enriched with 10 mg.l⁻¹ Cd (DW₁₀) compared with growth on the control medium (DW₀).

$$\text{Biomass variation Mean (\%)} = \frac{(\text{DW}_0) - (\text{DW}_{10})}{\text{DW}_0} \times 100 \quad (1)$$

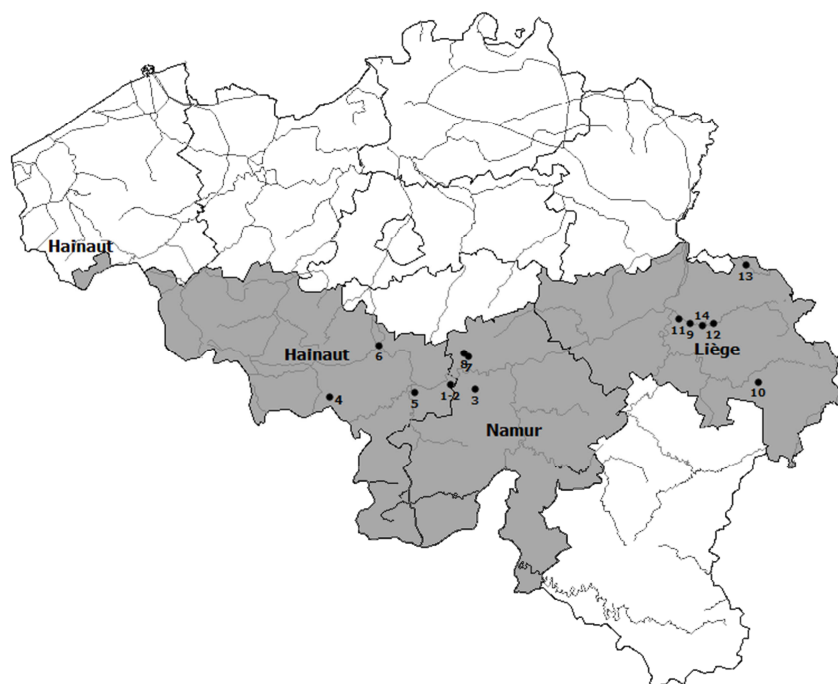


Figure 1: Map of Belgium. The black dots indicate the sampling points. Forty-seven ECM strains were collected from roots of alders and willows located along waterways in Hainaut, Namur and Liège. The names of the locations can be seen in Table 1.

Table 1: Mean of metal concentration in soil samples where the ECM fungi were found, collected at different sites in the three regions. n represents the number of soil samples analysed per site

Region	Nbr.	Site	Cd	Hg	Cu	Zn	Pb	Ni
			mg.kg ⁻¹					
Hainaut	1	Aiseau (n=2)	0.41	0.09	19.00	139.00	38.00	22.00
	2	Presles (n=2)	0.52	0.16	17.50	127.50	50.00	22.50
	4	Givry (n=2)	0.20	0.05	13.00	53.00	22.50	11.50
	5	Mt S/Marchienne (n=2)	0.53	0.14	23.00	129.50	39.50	21.50
	6	Seneffe (n=4)	0.48	0.11	14.75	76.75	42.75	14.75
	Namur	3	Fosses (n=6)	0.48	0.14	22.17	145.50	43.17
7		Onoz (n=3)	0.42	0.09	21.33	89.33	38.67	15.33
8		St Martin (n=8)	0.27	0.15	16.63	88.63	24.25	13.38
Liège	9	Trooz (n=1)	4.42	0.30	61.00	682.00	236.00	30.00
	10	Thiou (n=1)	1.17	1.01	88.00	241.00	145.00	32.00
	11	Chaufontaine (n=2)	25.51	3.87	172.00	1350.00	556.00	35.50
	12	Pepinster (n=2)	5.01	0.30	72.50	807.50	285.00	33.00
	13	Plombière (n=5)	6.57	0.20	24.20	5570.00	873.20	25.80
	14	Fraipont (n=3)	4.84	0.31	101.33	818.67	261.00	37.00

RESULTS – The effect of Cd on ECM fungal growth was found to vary from strain to strain. First, data of eight strains, showing aberrant behaviour, were removed. Of the thirty-nine strains left, nineteen strains were not affected by Cd ($p = 0.058\text{--}0.918$). Four tendencies in the strains can be highlighted (Fig. 2). (a) Data from some strains showed that at 10 mg, Cd had a positive effect on ECM fungal growth ($p < 0.0001\text{--}0.023$) (Fig. 2a). Indeed, five strains increased their biomass from 11.22% (± 9.75) to 41.93% (± 17.08) compared to the control. All the other strains showed sensitivity to Cd. (b) In some strains, the fungal dry weight production was significantly reduced with increasing Cd concentrations (Fig. 2b), e.g. strain 34 seemed to be the most sensitive ($p < 0.0001$), losing 70.22% (± 7.48) of its biomass at 10 mg Cd compared to the control. (c) In other strains, the sensitivity was not particularly more pronounced at 10 than at 5 or 1 mg Cd (Fig. 2c). (d) Other strains were only affected at 10 mg Cd ($p < 0.0001\text{--}0.004$) (Fig. 2d). S30 was the most sensitive ($p < 0.0001$), losing 58.75% (± 3.86) of its biomass at this concentration of Cd.

So, in total, fifteen strains from sites in Hainaut, seventeen from Namur and seven from Liège were used after removing the aberrant data. Of the thirty-two strains that came from Hainaut and Namur (low Cd concentration), nineteen strains were found to be non sensitive. Of the seven strains from Liège, five were non sensitive. Thus, most of the sensitive strains were found where there is a lower Cd contamination (Hainaut, Namur). These were essentially the sensitive strains that showed an increased sensitivity with the increasing Cd concentrations (b) or only at 10 mg Cd.¹(d).

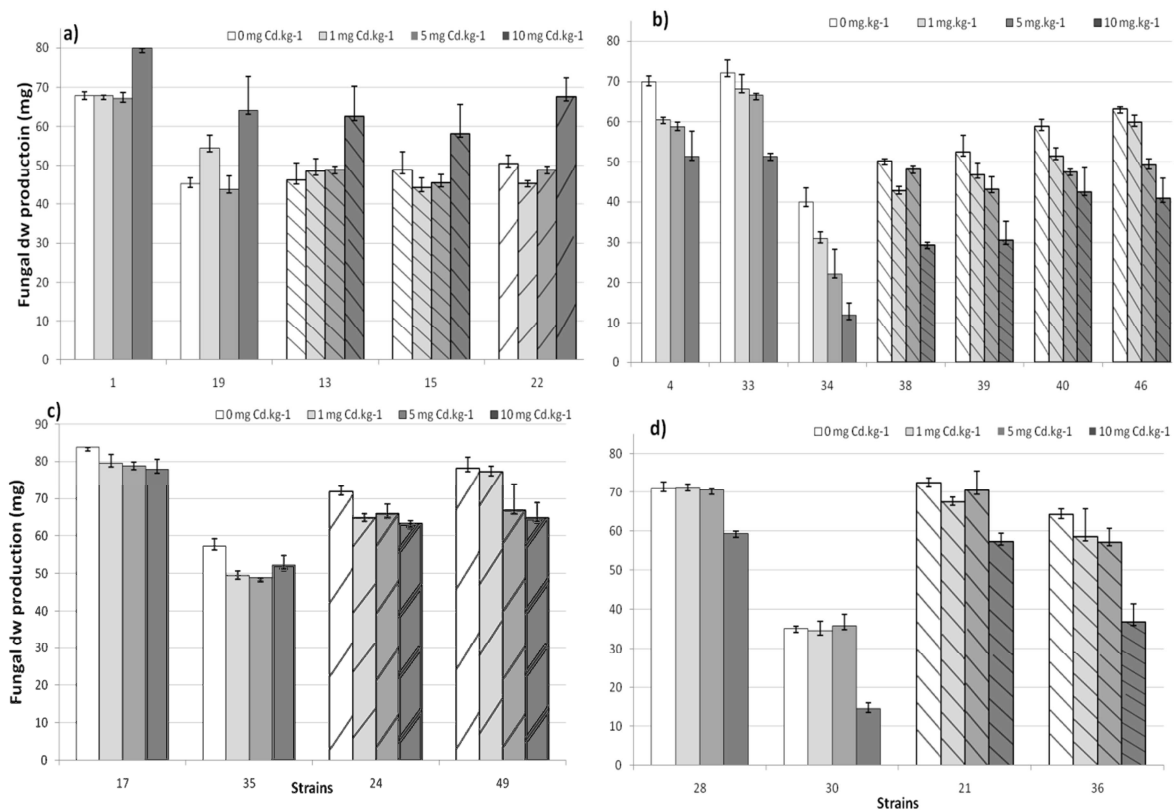


Figure 2: Fungal dry weight production (mg) at 0, 1, 5 and 10 mgCd.l⁻¹ of 20 ECM fungi strains showing the following tendencies: a) positive effect of Cd; b) sensitivity increases with Cd concentrations; c) constant sensitivity with increased Cd concentrations; d) sensitivity at only 10 mgCd.l⁻¹. □ Strains from Hainaut. ≡ Strains from Namur. Strains from Liège. Each column is the mean of 3 repetitions; bars represent the SE of the mean.

DISCUSSION – In the present experiment, we performed the screening test on liquid Melin-Norkrans instead of solid agar medium for different reasons. First, fungi can grow upwards in Petri dishes. It is for this reason that the measurement of the colony surface could be less representative of ECM fungal growth, compared to biomass production. Therefore, screening on liquid medium allowed us to collect biomass with ease and to reduce the errors that can be made with radial growth measurement. There are also other problems associated with using agar medium because it may contain metals, and the complexation of metals within the substrate matrix can alter the availability of metals, although metal precipitation may also occur in liquid medium (Colpaert *et al.*, 2000).

The ECM fungal strains studied here showed a variability of responses to the presence of Cd, as has been shown in other studies (Blaudez *et al.*, 2000; Colpaert *et al.*, 1992b, 2000; Kim *et al.*, 2003; Fomina *et al.*, 2005; Prasun *et al.*, 2005; Krznicaric *et al.*, 2010). In the present study, the strains exhibiting a reduced biomass production once Cd was present in the medium showed the highest sensitivity to the metal. But, of the thirty-nine strains retained in the results, twenty-four did not seem to be affected by Cd. Measuring biomass production allows accurate assessment of Cd sensitivity because the density of the mycelium is taken into account. It has been shown that the density of the mycelium is an important factor in the survival of ECM fungi in the presence of metals (Colpaert *et al.*, 1992b, 2000; Hartley *et al.*, 1997). In addition, C sources present in the medium can also outweigh Cd toxicity. Glucose, for example, is known to be the preferred source of C for ECM fungi. Kim *et al.* (2003) showed that fungal dry mass production significantly increased with 10 and 20 g.l⁻¹ of glucose, even in the presence of Cd. According to their results, the glucose concentration added to our MMN medium would not be able to interfere with Cd toxicity. But, adequate provision of C has to be taken into account in this kind of Cd-sensitivity test. With the exception of the fact that Cd concentrations were not high enough in our experiment, mycelium density and C concentrations in the medium can also explain why most of the ECM fungal strains in the present study were not sensitive to Cd.

Our results showed that most of the sensitive ECM fungal strains came from Hainaut and Namur, where there is a lower Cd contamination compared to Liège, where there is a naturally high background of Cd of geological origin. This observation would suggest that elevated Cd concentrations in soils of origin might play a role in the sensitivity of strains (selection pressure). There is much controversy regarding this point in the literature. Our results show a similar tendency to those of Colpaert *et al.* (1992, 2000) and Krznicaric *et al.* (2009), who compared isolates obtained from both polluted and unpolluted areas. Conversely, the studies of Fomina *et al.* (2005) and Blaudez *et al.* (2000) reported that there was rarely a correlation between metal tolerance under controlled conditions and metal concentrations at their site of origin.

Thus, we cannot draw conclusions here as to whether there is a clear correlation between Cd sensitivity of ECM fungi and their site of origin. From this perspective, more strains from Liège would need to be added to the investigation, and higher concentrations of Cd would need to be used. Selection pressure also depends on the characteristics of the soil (pH, soil type, etc.), and both total

metal concentrations and metal bioavailability need to be considered. Furthermore, identification of the strains would allow a comparison of the populations (Liège, Namur and Hainaut) of ECM fungal species.

CONCLUSION – ECM fungi are usually associated with a host plant in the environment. Selection of tolerant fungi based on *in vitro* growth trials cannot guarantee the success of their survival and/or their symbiosis with trees in field trials (Hartley-Whitaker *et al.*, 2000a). Moreover, an *in vitro* tolerance of an ectomycorrhizal fungus does not necessarily predict its tolerance once in symbiosis (Colpaert *et al.*, 1992a).

The present protocol shows that *in vitro* tolerance tests can be performed to screen several ECM fungal strains at the same time and in a rapid way, whereas these tests cannot be performed with host plants.

Using liquid Melin-Norkrans medium is of practical help in the selection of ECM fungal strains. Nevertheless, vials with a bigger capacity would need to be used in the future to enable clear observation of the effect of a metal and to exclude the hypothesis that the lack of nutrients could affect ECM fungal growth only after 17d. Also, after this first screening, the range of concentrations would need to be enhanced in order to identify tolerant strains and the strains would need to be identified in the future in order to highlight a possible intra or interspecific variation of tolerance.

II. Criblage *in vitro* de souches fongiques associées aux racines des saules et des aulnes en fonction de leur sensibilité au cadmium

Article :

In vitro highlight of Cd tolerant dark septate endophytes

Aricia Evlard^{a*}, Salvador Ferrandis^b, Bruno Campanella^a, Roger Paul^a,

^aLaboratoire de Toxicologie environnementale, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liège, 2, passage des Déportés, B-5030 Gembloux, Belgium

^b Unité de Statistique, Informatique et Mathématique appliquées, University of Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, 2, passage des Déportés, B-5030 Gembloux, Belgium

Soumis à International Journal of phytoremediation (01/02/2013).

***In vitro* highlight of Cd tolerant dark septate endophytes**

Aricia Evlard^{a*}, Salvador Ferrandis^b, Bruno Campanella^a, Roger Paul^a

^aLaboratoire de Toxicologie environnementale, Unité de Biologie Végétale, University of Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, 2, passage des Déportés, B-5030 Gembloux, Belgium.

^bUnité de Statistique, Informatique et Mathématiques appliquées, University of Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, 2, passage des Déportés, B-5030 Gembloux, Belgium.

*Corresponding author: aevlard@gmail.com Tel: +32(0)81.62.24.94 - Fax: +32(0)81.60.07.27

Salvador Ferrandis: s.ferrandis@ulg.ac.be

Bruno Campanella: Bruno.Campanella@ulg.ac.be

Roger Paul: roger.paul@ulg.ac.be

Abstract

Using woody plants (alder, willow, poplar) has been considered in phytoremediation because of their ability to produce large biomass. The roots of these trees are colonized by mycorrhizal fungi as well as dark septate endophytes (DSE). In the presence of heavy metals, these associations can play an important role in plant tolerance mechanisms and influence the plant's fitness to grow on contaminated soils. In this study, the effects of a gradient of Cd concentrations (0, 10, 25 and 50 mg Cd.L⁻¹) on the biomass production of sixty-eight fungal strains collected from the roots of alders and willows were tested *in vitro* in a liquid medium. Twenty strains were affected by metal levels. For these sensitive strains, the EC₅₀ values (Cd concentration which inhibits growth by 50%) were calculated and varied between 22.8 for the more affected strain and 245.8 mg Cd.l⁻¹ for the less affected one. Sixteen strains were not affected by the concentrations of Cd tested and twenty-four strains showed an increase in biomass production as the Cd concentration increased. Twenty of these non-sensitive strains were mainly identified for both alder and willow as DSE, belonging especially to the genera *Cylindrocarpon*, *Leptodontidium* and *Cryptosporiopsis*.

Keywords: Willow, Alder, Screening, Rhizospheric fungi.

1. Introduction

In natural conditions, the roots of most trees form mycorrhizal associations. The most common mycorrhizal types are arbuscular mycorrhizas (AM), ectomycorrhizas (ECM), ericoid mycorrhizas (ERM) or arbutoid mycorrhizas (Smith and Read, 2008). These different types of mycorrhizal fungus can colonized simultaneously a same root system. The role of these associations in water, mineral nutrient and carbon transfers between the two organisms has been well documented (Smith and Read, 2008). The ECM are the most typical associations found under natural conditions of most of the forest tree varieties (*Fagaceae*, *Betulaceae*, *Salicaceae*, *Leptospermoideae* (sub-family of *Myrtaceae*), *Pinaceae*) (Taylor and Alexander, 2005). In the same way, up to 80% of plants are colonized by AM fungi (Gamalero *et al.*, 2009). Tree roots are also colonized by less well-known dark septate endophytes (DSE). DSE are mainly defined as ascomycetous anamorphic fungi colonizing roots intercellularly or intracellularly with stained or melanized septate hyphae (Barrow and Osuna, 2002 in Deram *et al.*, 2011; Jumpponen, 2001). They frequently colonize the fine roots of trees (Ahlich and Sieber, 1996) and often coexist with different mycorrhizal fungi (Colpaert *et al.*, 2011). In contrast with mycorrhizal fungi, very few studies have been carried out to investigate the impact of DSE on plant hosts. The relationship between a DSE and its host depends on the associated species, as well as on the experimental conditions (García-Jiménez *et al.*, 2000; Jumpponen, 2001; Jumpponen and Trappe, 1998). *Cylindrocarpon destructans* (Zinssmeister) Scholten is not a mycorrhizal fungus but is often associated with roots, sometimes as an endophyte (Seymour *et al.*, 2004). Strains belonging to the genus *Leptodontidium* have also been identified as DSE. Four strains of *L. orchidicola* (Fungi Imperfecti) were inoculated with *Picea glauca* (Moench) Voss and *Potentilla fruticosa* L. Responses depended on the strains used, with some of them enhancing biomass production and others decreasing it (Fernando and Currah, 1996 in Jumpponen, 2001). *Cryptosporiopsis radicola* Kowalski & C. Bartnik, also known to be a DSE, could play an important role in the health of *Quercus robur* L. roots because of its high frequency of occurrence (Kowalski and Bartnik, 1995). It has also been isolated from healthy *Populus tremuloides* Michx. roots. Therefore, this fungal species seems to be not host-specific and non-pathogenic (Wang *et al.*, 2007). Colonization of the roots of *Larix decidua* Mill. improves root and shoot growth (Schulz and Boyle, 2005). Endophytic fungi such as the *Pezizula* species (telemorph genus of *Cryptosporiopsis*) isolated from healthy tissues could be pathogens with low virulence (because of the long latency period). During this long period of incubation, the endophyte maintains equilibrium with its host and only becomes parasitic when the tree is stressed (Schulz *et al.*, 1995). Nevertheless, DSE seem to be able to form interfaces that permit mutualistic exchanges (Jumpponen, 2001). Fungal development, diversity and abundance on roots can be affected by the presence of heavy metals (Leyval *et al.*, 1997; Lingua *et al.*, 2008; Muthukumar and Bagyaraj, 2010). Several studies investigated the tolerance mechanisms induced in the mycorrhizas in presence of metals. In ECM fungi, the fungal cellular mechanisms involved in metal tolerance do not seem to be dissimilar from those of non-mycorrhizal fungal species or those of plants (Bellion *et al.*, 2006).

These mechanisms can be extracellular (precipitation, chelation, cell-wall binding) as well as intracellular (binding to organic acids, peptides, polyphosphate, sulphur compounds). It is likely that antioxidative detoxification systems could also be involved. Proteins involved in fungal metal homeostasis and antioxidative cycles have now been further investigated (Bellion *et al.*, 2006; Colpaert *et al.*, 2011; Guelfi *et al.*, 2003; Vetter, 2005). Moreover, concerning AM fungi, studies showed that the root-associations modulate expression of enzymes involved in photosynthesis, carbon fixation (i.e., RuBisCO, RuBisCO activase, and ATP synthase) and protective antioxidant agents (i.e. S compounds, thioredoxin peroxidase and glutathione peroxidase) (Gamalero *et al.*, 2009). These findings testify how these types of mycorrhizas can help plants to overcome the negative impacts of heavy metal. Considering this, ECM as AM fungal associations are important for protecting the plant against high levels of metals by improving plant nutrition (Galli *et al.*, 1994; Hartley *et al.*, 1997b; Likar and Regvar, 2009; Turnau, 1998), by acting as a barrier (Fitz and Wenzel, 2002; Gibson and Mitchell, 2006; Hartley-Whitaker *et al.*, 2000a, 2000b; Jentschke and Godbold, 2000; Muthukumar and Bagyaraj, 2010; Van Tichelen *et al.*, 2001) or by helping in the pollutants uptake (Colpaert *et al.*, 1992a; Fernandez, 2008; Gamalero *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2000; Leyval *et al.*, 1997). Nevertheless, fewer studies have been made on DSE strain metal tolerance whereas their occurrence is frequent in roots of boreal forest trees (Deram *et al.*, 2010; Smith and Read, 2008). However, strains belonging to the genus *Leptodontidium* have been isolated from *Salix caprea* L. living on the Cd-polluted soil of northern Slovenia (Likar and Regvar, 2009). And it has been shown that the melanin of the cell wall would increase metal sorption (Fogarty and Tobin, 1996). The concept of hormesis is a component of ecological risk assessment. Hormesis is generally defined as a stimulation effect (e.g. an increase in growth) that could be explained by overcompensation to an alteration in homeostasis. So, under low stress, organisms can repair damages but may also overcompensate for it. The beneficial or harmful effects of hormesis are not taken into account in this definition and are difficult to evaluate. Hormetic responses have been reported in several studies concerning protozoans to vertebrates, but it is not always fully understood and is often ascribed to anomalous dose-response curves (Chapman, 2002).

With this knowledge, fungal associations have to be considered in studies with phytoremediation purposes, especially those focusing in the utilization of trees (alder, willow, poplar). The present work describes one of the key steps of a phytoremediation research program “Ecolirimed” using *Salix* and *Alnus* species (Evlard *et al.*, 2013, submitted to Int J Phytorem) and their associated root micro-organisms. This research program integrates the inoculation of woody plants with indigenous fungal strains isolated from their roots, which is an unavoidable and well-known tool in the achievement of such remediation of contaminated soils by plants.

Metal tolerance of mycorrhizal fungal strains have been widespread studied using *in vitro* tests on fungal isolates (Blaudez *et al.*, 2000a; Colpaert *et al.*, 1992b, 2000; Fomina *et al.*, 2005; Guelfi *et al.*, 2003; Hartley *et al.*, 1997a; Khade and Adholeya, 2007; Krznicar *et al.*, 2009, 2010; Prasun *et al.*,

2005). However, most of these *in vitro* studies have involved the isolation of specific and known ecto or endo-mycorrhizal fungal species. The working method opted in this study differs from those which could be found in the literature. Firstly, a collection of fungal strains was isolated directly from the roots of *Salix* and *Alnus* species. Indigenous to the tree species studied, the success of association between the microorganisms and the roots is promoted. Moreover, the fungal material originates from the same environment of plant material, i.e. from bank soils along unnavigable rivers in Belgium.

Secondly, this study aimed to screen this collection of unidentified rhizospheric fungal strains following their tolerance to heavy metals. To meet this objective, the hypothesis that it would be appropriate to choose non-sensitive strains to metals for the further inoculation of woody plants was followed. In order to differentiate sensitive to non-sensitive strains and because it was previously shown that it provides rapid screening, *in vitro* metal tolerance testing was chosen (Colpaert and Van Assche, 1987; Hartley *et al.*, 1997a). Thirdly, at the end of the experiment, the non-sensitive strains selected for the further inoculation were identified by DNA sequence comparison (ITS zone) and morphological analyses.

So, this present paper is a descriptive study showing an *in vitro* selection of rhizospheric fungal strains, based on the cadmium tolerance, one of the most toxic and non-essential metal. Thus, this work represents a first key step in the study of the influence of the root-associated fungi in the tolerance of woody plants to heavy metals.

2. Materials and methods

2.1 Origine of the fungal strains

The phytoremediation research program 'Ecolirimed' works with woody plants (*Salix* and *Alnus* spp.) located along unnavigable rivers in different areas Wallonia, Belgium. From this project's starting point, fungal strains originated from the same environment (i.e. river bank soil) and were also collected from the roots of alders and willows located along unnavigable waterways located in three provinces of Wallonia, Belgium (Hainaut, Namur, Liege) (Evlard *et al.*, 2011) (Table 1). The provinces of Hainaut and Namur have a low anthropogenic metal contamination whereas there is a naturally high background of metals of geological origin in the province of Liège.

2.2 Isolation of cultivable fungal strains and fungal identification

Near each tree trunk (max. 50 cm), a drilling was performed at 20 cm maximum using an auger. The root system was washed and roots were collected. Root tips which seem to be associated to a fungal strain were cut, disinfected in H₂O₂ and methanol for 30 seconds each, and then rinsed in sterilised distilled water. The tips were placed in Petri dishes containing modified Melin-Norkrans (MMNC) medium (Brunns & Read, 2000), which were installed first in a culture chamber at 24 °C (Aqualytic, Liebherr) to aid fungal growth, then at 4 °C to slow the growth down. Some strains were lost due to contamination. Twenty-eight, sixteen and twenty-four strains were obtained from sites in Hainaut,

Namur and Liège, respectively. Trace-elements were analysed on each soil sample from which we obtained fungal strains (Table 1).

Fungal identifications were performed by DNA sequence comparison (ITS zone) and morphological analyses by BCCMTM/MUCL, Louvain-la-Neuve (Belgian Coordinated Collections of Microorganisms). Identification was only carried out for non-sensitive strains. DNA extraction, amplification, and sequencing of the nuclear ribosomal 5' end of the LSU and ITS regions are as described in [Decock *et al.* \(2007\)](#). The primer pairs LROR- LR5 and NS7-ITS4 were used for PCR amplifications of LSU and ITS, respectively. Sequencing reactions were performed using CEQ DTCS Quick Start Kit® (Beckman Coulter), according to the manufacturer's recommendations, with the primers LROR, LR3, LR3R, LR5 for the LSU; ITS1, ITS2, ITS3, ITS4 for the ITS (<http://biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>). Sequence similarities and tentative identification of the strains were obtained using the Blast search option at GenBank ([Altschul *et al.* 1990](#)).

Table 1: Mean of trace element concentrations (mg.kg⁻¹ dry weight.) in soil where the fungal strains were sampled. n represents the number of soil samples analysed per site.

Site		Cd	Hg	Cu	Zn	As	Cr	Ni	Pb	Co
		mg.kg ⁻¹ dry weight								
<i>Hainaut</i>										
Aiseau	n=2	0.4	0.1	19	139	6.7	31	22	38	9.4
Estaimpuis	n=3	4.6	1.8	164	1166	51.5	859	28	288	7.1
Givry	n=3	0.2	0.0	15	61	5.2	35	13	28	5.0
Mont s/Marchienne	n=4	0.5	0.1	28	163	7.7	41	23	50	9.5
Presles	n=2	0.5	0.2	18	128	9.4	28	23	50	10.6
Seneffe	n=4	0.5	0.1	15	77	7.0	36	15	43	7.7
<i>Namur</i>										
Fosses-La-Ville	n=6	0.5	0.1	22	146	7.6	35	19	43	9.5
Onoz	n=3	0.4	0.1	21	89	5.7	31	15	39	5.1
Saint-Martin	n=11	0.3	0.1	18	97	5.7	33	14	25	6.2
<i>Liege</i>										
Chaufontaine	n=2	25.5	3.9	172	1350	19.9	59	36	556	18.7
Fraipont	n=3	4.8	0.3	101	819	9.5	41	37	261	20.1
Plombière	n=5	6.6	0.2	24	5570	16.4	21	26	873	8.7
Pepinster	n=3	4.7	0.7	68	822	12.1	41	34	299	23.6
Trooz	n=3	3.6	0.3	58	653	11.1	44	35	213	18.7
Thieux	n=3	1.6	0.7	81	233	13.2	1613	31	127	14.7

2.3 Screening for Cd sensitivity

We used the experimental protocol described in Evlard *et al.* (2011) to measure tolerance through fungal biomass production. Briefly, a liquid modified Melin-Norkrans medium (MMNC) (Bruns and Read, 2000) was used. Casein hydrolysate (1 g.L^{-1}), glucose (2.5 g.L^{-1}) and malt extract (10 g.L^{-1}) were used as C sources. The pH was adjusted to 5.5 ± 0.3 . Inocula of a constant size (25 mm^2 plugs) were taken from the edge of the colony grown on solid MMNC and placed in 250 mL vials containing 50 mL of sterile liquid medium. A plug of agar containing mycelia was immediately dried and weighed for each strain. Three replicates of each treatment were prepared and allowed to grow for 17 days in a culture chamber (Aqualytic, Liebherr) at 24°C in the dark without agitation. For each replicate, the fungal biomass was harvested, dried in an oven overnight at 60°C and then weighed. The corresponding initial dried biomass value of plugs was subtracted from the final dried biomass values. Compared to Evlard *et al.*, (2011), highest concentrations of cadmium were used (0, 10, 25 and 50 mg Cd.L^{-1} as CdSO_4) with the hypothesis these concentrations would include lethal concentrations. Thus, among these strains, ten strains used in Evlard *et al.* (2011), which have shown aberrant behaviour (S16, S27) or no sensitivity to Cd (S1, S3, S6, S9, S32, S37, S45 and S47) were tested again in this present experiment. The list regrouping the set of the strains tested in this work is shown as supplemental Table 5)

A partially hierarchical three-way analysis of variance (ANOVA) was performed on data using Minitab v. 15. Cd concentration, province and strain were considered as independent factors. Strain factor was hierarchized to the province factor, because every strain was not necessarily found in all three provinces. Cd concentration was crossed to both province and strain factors. Therefore, province*Cd concentration and strain*Cd concentration interactions were included in the model. With a non-significant random factor 'province' and a significant fixed interaction, scatterplots and one-way ANOVA enabled the visualization and verification of the significance of the response of each strain to Cd concentrations (after testing the homoscedasticity). When ANOVA results rejected the null hypothesis ($p < 0.05$), the correlation (R of Pearson) and coefficient of correlation (R^2) were calculated. When R^2 values indicated a linear model, a normal distribution of residuals was verified and growth data were line-fitted to calculate the EC_{50} , the Cd concentration which inhibits growth by 50% (the lower the EC_{50} value, the greater the metal toxicity).

3. Results

The three-way ANOVA indicated that the origin of the strains had no effect on their sensitivity to Cd because the factor “province” was not significant ($p = 0.396$). However, the interaction Cd concentration*strain was significant ($p=0.000$). This means that the effect of the concentration of Cd depended on the strain considered. Following the one-way ANOVA, R and R² calculation, the strains were classified into three groups (a-c). The group (a) counts sixteen strains which were not affected by an increase in Cd concentration ($p = 0.062-0.968$). The biomass production mean (mg d.w.) of each strain from groups (b) and (c) is summarized in Table 2 for the different Cd concentrations. In group (b), twenty-four strains showed an increasing biomass production with the increasing Cd concentration ($p < 0.000-0.003$). Indeed, most of them had a significant R value (0.59-0.88) ($\alpha = 5\%$), which reflects a strong positive correlation between biomass production and Cd concentration. Two strains (S37 and S67) had no significant correlation. However, R² did not indicate a linear model between the observed and predicted data. In this group, the biomass production of eight strains, after enhancement, was reduced at 25 or 50 mg Cd.L⁻¹ (S5, S10, S20, S29, S41, S50, S51 and S68). The strains which shown aberrant behaviour or no sensitivity to the Cd concentrations in Evlard *et al.*, 2011 did not show sensitivity at more elevated Cd concentration used in this study neither. Twenty non-sensitive strains (ten isolated from alder and ten from willow roots) belonging to groups (a) and (b) were identified (Table 3). Strains S32 and S97 were identified as Ascomycetes of two different orders, but further identification was not possible. Finally, in group (c), twenty strains were affected by the concentrations of Cd ($p < 0.000-0.006$), showing a strong negative correlation between the two quantitative variables ($R = -0.81$ to -0.99) ($\alpha = 5\%$). Except for strain S83, R² indicated a linear model (0.66-0.98), so a normal distribution of residuals was verified. For these sensitive strains, growth data were line-fitted to calculate the EC₅₀ (Table 4). EC₅₀ values varied between 22.8 mg Cd.L⁻¹ for the more sensitive strain to 245.8 mg Cd.L⁻¹ for the less sensitive ones.

Table 2: Fungal biomass production mean (mg dry weight) \pm standard error of mean (SE) at different concentrations of Cd (n=3).

Strain	Cd concentration (mg Cd.L ⁻¹)			
	0	10	25	50
<i>Non sensitive strains (group b)</i>				
1	267.7 \pm 4.7	297.7 \pm 11.6	309.3 \pm 12.6	316.7 \pm 15.1
3	216.7 \pm 8	270.7 \pm 21	275.3 \pm 5.3	274.3 \pm 3.6
6	222 \pm 17	264.3 \pm 3.6	255 \pm 8	277.7 \pm 7.9
9	156 \pm 4	148.3 \pm 23.3	198.3 \pm 19.7	173.7 \pm 13.2
16	277 \pm 10	310 \pm 4	308.3 \pm 9.1	298.7 \pm 3.6
27	225.3 \pm 7.7	258 \pm 14	252.7 \pm 47.9	303.3 \pm 11.1
32	248.7 \pm 17.4	308.7 \pm 23.2	325.7 \pm 5.1	319.3 \pm 4.3
37	293 \pm 4	320.3 \pm 3.5	317 \pm 5	314 \pm 4
45	130 \pm 3	145 \pm 2	161 \pm 11	153 \pm 10
47	155.7 \pm 12.7	164.3 \pm 5.3	168.7 \pm 8.8	198.3 \pm 12.6
57	181.3 \pm 66.2	271.7 \pm 6.6	262.3 \pm 37	289.3 \pm 13.1
58	247.7 \pm 7.3	258 \pm 1	274 \pm 7	276.3 \pm 4.6
59	181.7 \pm 9.1	274.7 \pm 11.3	269.7 \pm 15.6	282 \pm 3
62	185.3 \pm 8.3	223.3 \pm 9.8	241.7 \pm 2.6	241.3 \pm 15.7
63	169 \pm 18	231 \pm 2	235.3 \pm 13.3	229 \pm 4
64	174.3 \pm 11.6	206 \pm 30	242.7 \pm 36	247 \pm 30
65	260 \pm 21	293 \pm 5	307.7 \pm 6.4	301.7 \pm 12.6
67	216 \pm 29	281.7 \pm 31.3	274.3 \pm 9.1	275 \pm 16
70	224 \pm 20	283 \pm 20	297.7 \pm 27.4	301 \pm 15
74	145 \pm 7	203 \pm 6	222.7 \pm 13	222.7 \pm 10.1
77	174.7 \pm 7.7	232.3 \pm 13	251.3 \pm 57.5	250.3 \pm 10.2
85	256.3 \pm 11.9	282 \pm 9	276.3 \pm 1.7	289 \pm 4
86	152.7 \pm 16.1	261.3 \pm 22.9	238.3 \pm 9.5	278 \pm 32
88	228 \pm 14	292.3 \pm 22.7	266 \pm 21	258 \pm 23
5*	266.7 \pm 6.2	328 \pm 4	316.7 \pm 6.2	300 \pm 4
10*	188 \pm 9	230.3 \pm 2.4	240.3 \pm 1.7	202 \pm 10
20*	309.7 \pm 1.7	305.7 \pm 3.6	314 \pm 8	297.3 \pm 7.5
29*	272 \pm 32	302.3 \pm 30.7	391.7 \pm 10.7	210.3 \pm 5.7
41*	137 \pm 3	157.3 \pm 7.5	175 \pm 7	160.3 \pm 5.2
50*	379 \pm 7	402 \pm 8	393 \pm 8	359.7 \pm 6.2
51*	332.7 \pm 3.5	358.7 \pm 7.4	346 \pm 9	307 \pm 0
68*	244.7 \pm 3.5	278.3 \pm 7.9	274 \pm 6	254.3 \pm 6.5
<i>Sensitive strains (group c)</i>				
14	304.7 \pm 12.2	274.7 \pm 6.5	226.3 \pm 6.8	227.3 \pm 2.8
24	279 \pm 3	304.3 \pm 5.7	226.3 \pm 13.3	219 \pm 3
48	261.7 \pm 15.4	246.7 \pm 6.5	243 \pm 3	201 \pm 8
17	385.7 \pm 12.5	409 \pm 4	380.7 \pm 9.6	312 \pm 22
52	305.3 \pm 4	255.3 \pm 3.6	248 \pm 1	225.7 \pm 7.5
55	150.3 \pm 22.5	103.7 \pm 5.2	73.3 \pm 3.6	47.3 \pm 5.6
60	353.3 \pm 9.2	324 \pm 9	160 \pm 10	96.7 \pm 10.8
61	349.3 \pm 6.5	351.7 \pm 15.1	323.3 \pm 22.5	143.3 \pm 10.1
69	287.3 \pm 6.6	280 \pm 6	277.3 \pm 2.9	257.7 \pm 6.2
71	189.7 \pm 2.9	187.3 \pm 9.1	139.7 \pm 29.8	128.3 \pm 26.5
72	142.7 \pm 15.1	152.3 \pm 5.7	82 \pm 23	59.3 \pm 6.5
78	324 \pm 6	321.3 \pm 2.4	287 \pm 9	254 \pm 9
79	68.3 \pm 8	58 \pm 10	51.3 \pm 2.6	33.7 \pm 3.5
80	18 \pm 6	-15.3 \pm 2.9	6.7 \pm 2.9	3.7 \pm 4.3
81	158.3 \pm 3.5	135.7 \pm 4.6	115.3 \pm 5.7	66.7 \pm 8.3
83	265.7 \pm 28.1	190 \pm 55	38.7 \pm 2.6	26 \pm 5
89	120.7 \pm 8.5	65.3 \pm 9.6	53.3 \pm 17.4	36.7 \pm 13.8
90	149.7 \pm 33.9	88 \pm 6	61.3 \pm 10.3	15.3 \pm 7.4
91	365.7 \pm 58.8	361.3 \pm 10.2	290.3 \pm 12.5	206.3 \pm 24.9
54	339 \pm 8	353.3 \pm 14.1	323.3 \pm 5.6	280.3 \pm 25.5

* Strains showing a reduction of the biomass production at 25 and/or 50 mg Cd.L⁻¹.

Table 3: Morphological identification and top BLAST match sequences of nineteen non-sensitive fungal strains.

Strain No	BCCMMUCL reference	Morphological identification	BLAST Match sequence		
			Reference Accession No	Coverage	Max Ident
<i>Non-sensitive strains (group a)</i>					
56	018M	<i>Pyrenochaete</i> sp.	<i>Pyrenochaete</i> sp. AM921726	90%	100%
76	018W	<i>Massariosphaeria cf. typhicola</i>	<i>Massariosphaeria typhicola</i> EF165033	99%	99%
		<i>Massariosphaeria cf. typhicola</i>	<i>Massariosphaeria typhicola</i> JQ435795	99%	98%
95	018Y	<i>Leptodontidium</i> sp.	<i>Leptodontidium orchidicola</i> JN655581	90%	99%
96	018Z	<i>Cryptosporiopsis radiculicola</i>	<i>Cryptosporiopsis radiculicola</i> EF413597	98%	100%
97	018AA	<i>Gaeumannomyces</i> sp. (Sordariales)	<i>Gaeumannomyces cylindrosporus</i> DQ341494	94%	93%
<i>Non-sensitive strains (group b)</i>					
1	018A	<i>Rhizopycnis</i> sp.	<i>Rhizopycnis vagum</i> JN859312	73%	98%
3	018B	<i>Cryptosporiopsis radiculicola</i>	<i>Cryptosporiopsis radiculicola</i> AF141193	96%	100%
6	018D	<i>Neonectria radiculicola/Cylindrocarpon destructans</i>	<i>Neonectria radiculicola</i> GQ922913	92%	100%
32	018J	Ascomycete (Pleosporale)	<i>Pleosporale</i> sp. AB255255	100%	91%
41	018K	<i>Cylindrocarpon</i> sp.	<i>Cylindrocarpon</i> sp. JF735301	100%	97%
47	018L	<i>Neonectria radiculicola/ Cylindrocarpon destructans</i>	<i>Neonectria radiculicola</i> GU934548	100%	100%
57	018N	<i>Neonectria radiculicola/ Cylindrocarpon destructans</i>	<i>Ilyonectria radiculicola</i> JQ846089	99%	100%
59	018O	<i>Neonectria radiculicola/ Cylindrocarpon destructans</i>	<i>Neonectria radiculicola</i> AJ875335	100%	100%
62	018P	<i>Neonectria radiculicola/ Cylindrocarpon destructans</i>	<i>Neonectria radiculicola</i> AJ875337	100%	99%
63	018Q	<i>Neonectria radiculicola/ Cylindrocarpon destructans</i>	<i>Neonectria radiculicola</i> AJ875337	100%	99%
65	018R	<i>Cylindrocarpon</i> sp.	<i>Cylindrocarpon</i> sp. JF735301	100%	97%
67	018T	<i>Neonectria radiculicola/ Cylindrocarpon destructans</i>	<i>Neonectria radiculicola</i> AJ875335	100%	100%
70	018U	<i>Cylindrocarpon</i> sp.	<i>Cylindrocarpon</i> sp. JF735301	100%	97%
74	018V	<i>Neonectria radiculicola/ Cylindrocarpon destructans</i>	<i>Neonectria radiculicola</i> GQ131875	100%	100%
77	018X	<i>Cylindrocarpon</i> sp.	<i>Cylindrocarpon</i> sp. JF735301	100%	99%

Table 4: EC₅₀ (mg Cd.l⁻¹) of the sensitive strains.

Strain	EC ₅₀
90	22.8
89	27.3
80	27.7
55	30.9
60	31.6
72	40
81	43.5
61	48.7
79	49.3
91	57.5
71	70.2
14	90.2
24	97
52	98.6
78	111.3
48	113.7
17	127.1
54	136.2
69	245.8

4. Discussion

Once in association with roots, metal-tolerant fungal isolates can play an important role in plant tolerance. In this study, a collection of rhizospheric fungal strains collected on woody plants roots (willow, alder) was screened *in vitro* to identify their tolerance to Cd. This represents a necessary key-selection step before inoculating plants. In these experiments, *in vitro* tests were performed on liquid Melin-Norkrans instead of solid agar medium because fungi can grow upwards in Petri dishes and, for this reason, the measurement of the colony surface could be less representative of fungal growth than biomass production in a liquid medium (Hartley *et al.*, 1997b). In our trial, the fungal strains exhibited different response levels in the presence of Cd, as it has been previously shown in the literature with ECM strains during *in vitro* studies (Hartley *et al.*, 1997b, Prasun *et al.*, 2005, Colpaert *et al.*, 2011). Bellion *et al.* (2006) explain that the effect of Cd is direct or indirect. For instance, Cd is known to displace redox-active metals. Cd also reacts with the sulphur part of several proteins involved in cellular processes, including those involved in antioxidative mechanisms, inducing free radical species. Cd and the elevated free radical species level cause severe cellular damage, the disruption of physiological processes. Consequently, fungal growth is reduced and this eventually leads to the death of the fungal cells. Based on this knowledge, we expected that fungal growth would be partially even completely inhibited at 50 mg Cd.L⁻¹. Sensitive strains have been highlighted in our work and, among these, nine were seriously affected by less than 50 mg Cd.L⁻¹. However, the Cd concentrations used in this study did not cause a complete growth inhibition. Moreover, some of these non-sensitive strains showed increased growth in Cd concentrations whereas Cd is not an essential element. Cd tolerance *in vitro* tests have been made on solid agar medium with ECM fungi and generally the EC₅₀ values obtained in these culture conditions are higher than EC₅₀ values obtained in liquid medium (Colpaert and Van Assche, 1992b; Tam, 1995; Hartley *et al.*, 1997b; Colpaert *et al.*, 2000; Krznicaric *et al.*, 2009). However, the EC₅₀ values obtained here are close to or greater than those obtained on agar medium with lower Cd concentrations. However, EC₅₀ values should be treated with caution (Hartley *et al.*, 1997b) and should not be extrapolated to a field situation (Krznicaric *et al.*, 2009). The growth stimulation observed in our trial has also been demonstrated with lower Cd concentrations in Evlard *et al.* (2011) and with *Aspergillus nidulans* G. Winter (Guelfi *et al.*, 2003) as in different types of mycorrhizal fungi tested with Pb (Fomina *et al.*, 2005). Guelfi *et al.* (2003) observed an increased biomass production at 0.33 mg Cd.L⁻¹ (as CdCl₂) whereas growth was inhibited at 1.7 mg Cd.L⁻¹. The authors hypothesized that Cd in low concentrations could form complexes with constituents of the culture medium and so essential elements such as Cu could be released and made available for the fungus. In our case, higher levels of Cd were used and the enhancement of Cd concentration still caused growth stimulation. It can be hypothesized that this could be a response to the marked stress, like a hormesis response (Chapman, 2002). However, it remains difficult to evaluate the beneficial or negative effects of hormesis responses. In a beneficial way, an *in vitro* growth overcompensation could enhance the non-metabolic process involved in the metal detoxification, e.g. cell-wall binding

(Blaudez *et al.*, 2000b, Bellion *et al.*, 2006; Colpaert *et al.*, 2011). Also, in culture media, malt extract and casein hydrolysate can reduce Cd availability. This can explain the high Cd concentrations needed to inhibit growth of the strains. Therefore, nutrients do not limit fungal growth whereas in soil it is always limited by one or several essential elements. Finally, the strains of group (a) were not affected by Cd at all. A hypothesis can be made about the possible existence of mechanisms involved in metal detoxification. The first mechanism that comes to mind is the metal sorption on the cell wall. Fungal mycelia have a high metal sorption capacity, so the fraction of cell-wall-binding metals can be substantial (Blaudez *et al.*, 2000b; Colpaert *et al.*, 2011). However, this mechanism is probably not efficient at stopping the entry of metals into cells, so it cannot alone explain the differences in response between group (a) and group (c). Indeed, when the sorption surface is saturated, metals can eventually enter into hyphae and intracellular mechanisms of detoxification can be induced. Studies on the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* (Barsch) Fr. revealed an accumulation of glutathione in the presence of Cd. The synthesis of superoxide dismutase (SOD), an enzyme involved in the detoxification of reactive-oxygen species, and glutathione-related systems was also induced. It has also been shown that catalase activity was induced by Cd in *Aspergillus nidulans* G. Winter (Guelfi *et al.*, 2003; Bellion *et al.*, 2006). However, it has been shown that Cd-tolerant ecotypes of *Suillus* sp. exclude the metal whereas sensitive ecotypes accumulate it (Colpaert *et al.*, 2011). Finally, the role of non-essential metals is rarely investigated and so the scarce knowledge about metal roles in fungal cells needs to be improved (Vetter, 2005; Bellion *et al.*, 2006), especially since a Cd-containing protein was discovered in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G.Fryxell & Hasle (Bellion *et al.*, 2006). Our results show that the sensitivity responses were not different from one province to another. It is a controversial subject in the literature but it is rare to find a correlation between metal tolerance of microorganisms under laboratory conditions and the metal concentrations at the site of origin, unless they are extremely high (Duxbury in Colpaert *et al.*, 2000; Colpaert *et al.*, 1992b, 2000, 2011; Krznic *et al.*, 2009). Nevertheless, the results of Blaudez *et al.* (2000a) and Fomina *et al.* (2005) are in agreement with our observations for ectomycorrhizal fungi, as Gibson and Mitchell (2006) for ericoid mycorrhizal fungi which reported that differences in sensitivity are not necessarily related to their origin.

Identification was performed on twenty non-sensitive strains. Most of the identified strains belong to the telemorph/anamorph genus *Neonectria/Cylindrocarpon* (*N. radicola* (Gerlach & L. Nilsson) Mantiri & Samuels/*C. destructans* (Zinssmeister) Scholten). Other strains belong to the genus *Leptodontidium* and the species *Cryptosporiopsis radicola* Kowalski & C. Bartnik, which are known to be dark septate endophytes (DSE). Little information exists about the genera *Pyrenochaete* sp., *Massariosphaeria* sp. and *Rhizopycnis* sp. but they do not seem to be known as mutualistic genera (García-Jiménez *et al.*, 2000). Any ectomycorrhizal species were identified. Smith and Read (2008) reported works of Melin (1923, 1925) performed on roots of forest trees who observed high frequent

occurrence of dark-coloured fungal and these could be recovered from roots even after extensive surface sterilization. As a conclusion, the author stated they were inhabitants of the root tissues rather than root-associated soil fungi. Our observations can also be explained by the fact that ectomycorrhizal communities can be strongly modified in extreme environments and that ECM fungi can be supplanted by DSE, with species belonging to the genus *Leptodontidium* (Colpaert *et al.*, 2011; Likar and Regvar, 2009). Deram *et al.*(2010) reported that AM colonization of *Arrhenatherum elatius* L. roots was affected by high levels of heavy metals whereas, although the DSE infection was weak, it was fairly steady in polluted and non-polluted soils. Other authors mentioned that DSE are one of the most common root-associated fungi in metal polluted soils and these DSE have an inherent tolerance (Li *et al.*, 2011). Gibson and Mitchell (2006) also showed a low sensitivity of DSE to heavy metals. Some authors explained that melanin, located in cell walls in fungi, because it contains carboxyl, phenolic, hydroxyl, and amine groups, can provide many potential binding or biosorption sites for metal ions (Fogarty and Tobin, 1996). Soil microbial communities exposed to heavy metal stress are reported as a good example of hormesis. Instead of the hypothesized linear diversity decrease with increased stress, low levels of stress can result in the predominance of few competitive species, and so a lack of diversity. But as stress increases, these species lose their competitive advantage and diversity increases. At higher stress, progressive species disappearance occurs and diversity decreases again (Giller *et al.*, 1998 in Chapman, 2002).

5. Conclusion

This study demonstrated heavy metal tolerance tests, performed *in vitro*, remain a suitable method when a rapid screening of an important and undifferentiated fungal material is purposed. This work described the way non-sensitive strains to Cd were selected following the hypothesis that these strains, once associated to roots, will help in the development of woody plants in metal-contaminated soils. Firstly, fungal strains were differentially affected by Cd concentrations used in this study but a predominance of non-sensitive strains was observed. Thus, this method highlighted several Cd-tolerant fungal strains. Secondly, twenty of them were selected for DNA and morphological identifications before a futur inoculation. Interestingly, the identification showed that most of these Cd-tolerant strains belong to a less-known fungal association type which is the Dark Septate Endophytes (DSE). Thus, this study demonstrated that, first, DSE, especially the three genera *Cylindrocarpon*, *Leptodontidium* and *Cryptosporiopsis*, are present in contaminated soils but secondly, that endophytes, as frequent inhabitants of tree roots, represent an innovative study-branch for phytoremediation purpose. Nevertheless, this paper, as a descriptive study, only hypotheses could be made to explain the predominance of the non-sensitive strains and Cd-tolerance of DSE. Thus, metal tolerance mechanisms involved in these studied strains have to be explored. The second step will be to study the survival and/or the success of symbiosis with tree roots in contaminated and non-

contaminated environment. Then, fungal behaviour in association with the host plant and the role they could play in host plant tolerance will be further investigated.

Acknowledgements

Financial support from the project Ecolirimed co-financed by the Fonds Européen de Développement Régional as part of the program Interreg IV A ‘Grande Région’ is gratefully acknowledged (<http://ecoliri.cra.wallonie.be>). We thank the Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM/MUCL) of Louvain-la-Neuve for the identification of fungal material. Thanks to François Ferrais and Marine D’Aulisa for technical assistance and Jean-Paul Barthelemy (Unité de Chimie Analytique, GxABT-ULg) for chemical analyses and their helpful discussions.

Discussion sur le chapitre 3

Le travail décrit dans ce chapitre constitue une première étape pour intégrer les organismes vivants de la rhizosphère du saule dans la compréhension de sa tolérance aux métaux. Les études que l'on retrouve dans la littérature sont menées de la manière suivante :

1. Les études *in vitro* de tolérance de champignons mycorhiziens ont généralement été effectuées sur des espèces fongiques précises provenant de collections commerciales, quelquefois, sans associer les plantes hôtes que ces champignons colonisent généralement (Colpaert and Van Assche, 1992 ; Tam, 1995 ; Blaudez *et al.*, 2000, Kim *et al.*, 2003 ; Prasun *et al.*, 2005).
2. Ces études *in vitro* concernent également des souches préalablement identifiées associées aux espèces du genre *Pinus* (Colpaert and Van Assche, 1992b, 1993, 2000 ; Hartley-Whitaker *et al.*, 2000a, b) ou à l'espèce *Betula pendula* (Blaudez *et al.*, 2000b ; Krupa et Kozdroj, 2004). Très peu d'études *in vitro* ont été réalisées sur les micro-organismes de la rhizosphère du saule (Sell *et al.*, 2005, Vyslouzilova *et al.*, 2006 ; Hryniewicz *et al.*, 2008)

Le travail effectué ici apporte une plus-value dans la mesure où, dans nos essais, des souches fongiques ont été directement prélevées des racines des ligneux *in situ* (saules et aulnes). Cela nous a permis de créer notre propre collection reflétant la diversité de souches de différentes origines. Une deuxième étape visait à mettre en place un protocole rapide de sélection de souches aptes à croître en présence de métaux dans le but d'étudier leur influence sur la tolérance des ligneux à ces polluants.

La sélection des souches s'est basée sur leur croissance dans un milieu liquide contaminé par un gradient en cadmium. Le gradient utilisé dans le premier essai était de 0, 1, 5 et 10 mg.L⁻¹ de cadmium, partant du fait que la disponibilité du métal est augmentée *in vitro*. Sur les 39 souches étudiées, 15 souches ont montré une sensibilité au cadmium. Parmi ces souches sensibles, certaines ont montré une grande sensibilité au cadmium alors qu'il était présent à faible dose, alors que d'autres souches n'ont montré une sensibilité qu'à la concentration en cadmium la plus élevée. Les 24 autres souches n'ont pas montré d'effet négatif du cadmium sur leur croissance. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ces résultats :

1. Le glucose, source en carbone préférée des champignons, présent dans le milieu occulte l'effet néfaste du cadmium. En effet, nous pouvons supposer que la teneur en source de carbone « aide » les champignons à contrecarrer les effets nocifs du cadmium.
2. La concentration en cadmium utilisée, bien qu'elle ait pu montrer un effet négatif sur certaines souches, n'était pas suffisamment importante pour observer leur inhibition totale ou une réduction de la biomasse chez toutes les souches testées.

Pour vérifier ces hypothèses, un deuxième essai a été mis en place. Des concentrations en cadmium plus importantes ont été utilisées (0, 10, 25 et 50 mg Cd.L⁻¹). Quelques souches étudiées dans le point I ayant montré des résultats aberrants (S16, S27) ou n'ayant pas montré de sensibilité aux concentrations testées précédemment (S1, S3, S6, S9, S32, S37, S45 and S47) ont été à nouveau

utilisées dans ce deuxième essai. Qu'elles proviennent des racines de saule ou d'aulne, la plupart des souches ne sont pas affectées par le cadmium, quelle que soit la concentration testée. D'autres souches voient même leur biomasse augmenter avec la concentration en métal. Les souches qui ont été testées dans les deux essais n'indiquent toujours pas de sensibilité aux concentrations plus élevées en cadmium. D'autres souches ont montré une sensibilité variable au cadmium mais, contrairement à notre hypothèse de départ, les concentrations utilisées n'ont pas inhibé totalement la croissance de la biomasse.

Parallèlement à ce deuxième essai, des concentrations variables en glucose (une des sources de carbone) ont été testées (0, 2.5, 5,10 g.L⁻¹) sur deux traitements : 0 et 80 mg.L⁻¹ Cd. En absence de cadmium, l'augmentation en glucose favorise la production de biomasse. Cet effet positif était attendu car le glucose est considéré comme source préférée de carbone pour les champignons ([Gupta et Mukerji, 2001](#)). Néanmoins, notre milieu de culture contenait d'autres sources d'hydrates de carbone (extrait de malt et hydrolysate de caséine). Les souches ont donc pu croître même en absence de glucose. En présence du cadmium, de manière générale, le glucose seul compense peu ou pas l'effet néfaste du métal. La croissance du champignon est réduite même avec des concentrations supérieures à 2.5g de glucose. Ceci pourrait être expliqué par le fait que le cadmium, une fois au sein de la cellule, perturbe le métabolisme cellulaire et, en absence de mécanismes de tolérance, bien que le glucose augmente dans le milieu, le champignon est incapable de l'utiliser ([Nweke et al., 2010](#)). Plus encore, une augmentation en glucose augmente l'absorption du cadmium dans les cellules et accroît alors davantage sa toxicité ([Blaudez et al., 2000](#) ; [Gadd et al., 1993](#), [Mapolelo et Torto, 2004](#)). Il est également intéressant de noter qu'en absence de glucose, avec ou sans cadmium, le champignon a produit la même biomasse. Or, nous aurions pu nous attendre à ce qu'en présence de cadmium et en absence de glucose, la croissance du champignon soit minime, voire nulle. Le glucose étant connue comme la source de C préférée des champignons, les autres sources de carbone n'ont pas été enlevées du milieu de culture et elles ont permis la croissance du champignon, même en présence de cadmium. Une autre hypothèse était que la toxicité du cadmium ait pu être réduite par la formation de précipités de cadmium lors de la préparation et la stérilisation des milieux de culture. Pour vérifier la validité de cette hypothèse, deux milieux contenant 50 mg Cd.L⁻¹ ont été préparés selon le protocole de départ. Bien qu'avant stérilisation, aucun précipité n'ait été visible, après le passage à l'autoclave, des précipités ont pu être filtrés, séchés et mis à l'analyse (Unité de Chimie Analytique, Gembloux Agro-Biotech). Les résultats indiquent que les précipités contiennent 4.1 mg de cadmium sur les 50 mg du milieu de culture initial. Cela représente 8.2 % du cadmium de la solution. Une coprécipitation est donc possible lors de l'autoclavage. Cependant, bien qu'il y ait eu une faible précipitation, la concentration en cadmium dans le milieu à laquelle les souches ont été soumises reste importante et la précipitation semblable pour toutes les souches.

Enfin, le deuxième essai a également permis l'identification de souches non sensibles au cadmium.

Contrairement à ce dont nous aurions pu nous attendre, et bien qu'elles proviennent des racines

d'aulne ou de saule, ce ne sont pas des souches ectomycorhiziennes (ECM) qui ont été identifiées mais bien des endophytes (DSE), appartenant principalement aux genres *Cylindrocarpon*, *Leptodontidium* et *Cryptosporiopsis*.



Chapitre 4

Discussion générale
Conclusions et perspectives

Chapitre 4 : Discussion générale

L'exploitation de minerais *via* le développement de la métallurgie constitue la principale cause de diffusion primaire de métaux dans notre environnement. L'Homme a, de ce fait, modifié la disponibilité de ces métaux et engendré une nouvelle source de pollution représentant des risques sanitaires et environnementaux.

Bien que certains métaux constituent des oligo-éléments nécessaires au bon développement des organismes vivants, ils peuvent, à forte dose, devenir toxiques. Outre ces oligo-éléments, d'autres métaux sont libérés dans l'environnement, parmi lesquels le cadmium et le plomb, métaux non essentiels et toxiques, même à faible dose.

Quelles incidences ont les métaux sur les végétaux ? Ces derniers, parce qu'ils ne peuvent se déplacer, survivent grâce à des mécanismes de tolérance. Des approches génétiques, protéomiques et biochimiques ont permis de décrire les mécanismes de tolérance, surtout chez les herbacées hyperaccumulatrices telles que *Thlaspi caerulescences* ou *Arabidopsis halleri*. Deux stratégies existent chez les plantes pour contrer ce que nous appelons « pollution métallique » : la *stratégie par exclusion* et la *stratégie par accumulation des métaux*.

Dans la première, la plante limite la présence du métal au niveau des racines et évite le transfert des métaux vers les parties aériennes. Premièrement, les métaux peuvent d'abord être adsorbés en dehors de la racine. La plante est capable également de rejeter des exsudats racinaires pouvant influencer le comportement des métaux en réduisant ou augmentant leur disponibilité (modification du pH, des réactions redox, précipitation et chélation) (Kidd *et al.*, 2009). Deuxièmement, les métaux peuvent entrer dans la racine en empruntant soit la voie *intracytoplasmique* (symplaste) soit la *voie extracytoplasmique* (apoplaste) via des transports passifs ou actifs, spécifiques ou non. Le passage des métaux vers l'intérieur de la cellule racinaire peut être limité au niveau de l'apoplaste grâce, notamment, à la capacité d'échange cationique (CEC) de la paroi cellulaire et de la membrane (Kidd *et al.*, 2009). 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 racinaire, la plante régule la distribution au sein de cette dernière pour minimiser l'effet néfaste des métaux (mécanisme de séquestration, transport vers la vacuole (détoxification)). La plante peut ainsi limiter le transport des métaux vers les parties aériennes et restreindre l'accumulation uniquement au niveau racinaire (Clemens, 2001 ; Hossain *et al.*, 2012a). A l'inverse, dans la seconde stratégie, la plante favorise le transport, l'accumulation et la détoxification des métaux dans les parties aériennes (*stratégie d'accumulation*) (Clemens, 2001 ; Kidd *et al.*, 2009 ; Hossain *et al.*, 2012a).

Dans « l'approche phytoremédiation », les plantes hyperaccumulatrices, sur lesquelles ces mécanismes ont été découverts, produisent peu de biomasse. L'utilisation d'espèces végétales plus fortes productrices de biomasse a alors été proposée. Durant cette dernière décennie, des espèces de saule ont pu être étudiées. Ces recherches ont abouti au fait que le saule présente des capacités à accumuler des teneurs variables en métaux dans les tiges, les feuilles et les racines. Les parties aériennes peuvent être récoltées, ce qui rend donc possible l'extraction des métaux du sol. Les racines, quant à elles, rendent possible la stabilisation des métaux dans le sol. Sur base de la littérature, nous savons qu'il existe une variabilité dans la réponse phénotypique des saules lorsqu'ils sont plantés dans un substrat contaminé.

Etant donné que ce travail s'inscrit dans le cadre du projet ECOLIRIMED, nous disposions de clones de saules « locaux » issus de boutures récoltées sur les pieds mères localisés dans diverses régions de la Wallonie (Belgique). Notre premier objectif était de sélectionner, dans cette collection, des phytoextracteurs idéaux (forte production de biomasse couplée à une forte teneur en métaux dans les parties récoltables).

Pour cela, dans un premier temps, nous avons choisi de nous baser sur le meilleur rendement en biomasse des clones. A l'issue de ces travaux, les résultats que nous avons obtenus corroborent ceux obtenus dans la littérature, à savoir :

- Une capacité de clones de saules à croître sur un substrat contaminé aux métaux, ceci indique une tolérance aux métaux.
- Une variabilité dans la production de biomasse entre les clones de saules en présence de métaux.
- Une variabilité dans l'accumulation des métaux.

Dans un second temps, nous voulions affiner la sélection en choisissant, parmi les forts producteurs de biomasse, ceux qui associent une forte accumulation en métaux. Cependant, l'hypothèse de départ suggérant que les clones à forte biomasse auraient des teneurs en métaux suffisantes dans les tiges pour permettre une phytoextraction n'est pas vérifiée.

En effet, nos constatations sont les suivantes :

- les forts producteurs de biomasse ne sont pas les clones dont les teneurs en métaux sont les plus importantes ;
- à l'inverse, les concentrations les plus fortes se retrouvent chez les plus faibles producteurs de biomasse ;
- les quantités extraites par les forts producteurs de biomasse restent trop faibles pour envisager une dépollution ;
- enfin, les clones de saules n'accumulent pas les métaux de manière active.

La tolérance des clones de saules peut s'expliquer par leur capacité à restreindre le transfert vers les parties aériennes. L'extraction des métaux par les clones de saules est trop faible pour permettre une phytoextraction efficace (Vervaeke *et al.*, 2003). Dans notre approche du saule comme « outil » de

phytoremédiation, nos résultats indiquent qu'il est plus apte à être utilisé comme technique de phytostabilisation des métaux. Les analyses des lixiviats indiquent que les métaux n'ont pas été lessivés. Cependant, les racines n'ayant pas été analysées dans ce travail, nous ne pouvons que faire l'hypothèse que les clones de saules étudiés utilisent une stratégie d'exclusion (Fitz et Wenzel, 2002). Les études de Pietrosanti *et al.* (2009) et Vyslouzilova *et al.* (2003) affirment par ailleurs que l'accumulation des métaux est due à la forte capacité de transpiration des ligneux. De plus, d'autres études ont montré que la survie des ligneux (saules, aulnes, bouleaux) résidait dans leur capacité à tolérer les métaux par évitement ou immobilisation de ceux-ci dans les racines (références dans Vyslouzilova *et al.*, 2006). En pots, les conditions sont réunies pour provoquer l'accumulation des métaux par le saule. Par exemple, la capacité qu'ont les racines d'éviter des « spots » de contamination a été réduite vu le volume restreint dans lequel elles se sont développées. Malgré cela, nous avons pu vérifier que l'extraction n'est pas privilégiée par les saules par rapport à la stabilisation (par exemple, les teneurs en cadmium dans les tiges excèdent rarement $5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ m.s.). Des saules dits d'exception n'ont pu être mis en évidence. L'efficacité de phytoextraction étant déjà réduite dans des conditions en pots, nous pouvons faire l'hypothèse qu'elle sera encore plus faible en conditions de terrain.

Bien que similaires à ceux de la littérature, les résultats de l'approche phénotypique nous poussent à reconsidérer cette technique de phytoremédiation souvent privilégiée, notamment dans le projet ECOLIRIMED.

A ce jour, ne devons-nous pas nous demander si la phytoextraction par le saule est toujours envisageable ?

L'objectif commun des auteurs repris dans le Tableau I se résume à identifier les saules les plus performants pour la décontamination des sols pollués aux métaux. En ce sens, ces auteurs orientent leur conclusion en faveur de la phytoextraction des métaux par le saule. Cependant, mis à part quelques arbres « d'exception », les quantités maximales en métaux extraites présentées sont, de manière générale, relativement faibles. Des modèles réalisés sur base de ces résultats indiquent que la durée d'assainissement d'un terrain se compte en centaines d'années (Tableau II). Pouvons-nous proposer la décontamination du site par les saules lorsque la phytoextraction prend tant d'années ? Nos résultats suggèrent que la phytoextraction par le saule dans le but d'assainir un site contaminé n'est pas concevable.

Pour autant, il existe un transfert, bien que minime, des métaux vers les parties aériennes. Ceci doit être pris en considération, surtout lorsqu'il s'agit de métaux toxiques tels que le plomb et le cadmium. Cette capacité d'absorber les métaux dans les parties aériennes peut contribuer, à l'instar de la phytostabilisation, à limiter la dispersion des métaux dans l'environnement. L'utilisation du saule en phytoremédiation peut dès lors être schématisée comme dans la Figure XII. Ce schéma s'inspire de la combinaison des informations que l'on retrouve dans la littérature et les résultats de ce travail. La

dégradation de la litière constitue un risque de remobilisation des métaux dans le sol. Ces métaux seraient alors de nouveau disponibles dans l'écosystème. Ce risque de remobilisation pourrait constituer un inconvénient de la phytostabilisation. La restitution des métaux dans le sol suite à la dégradation des feuilles et leur absorption mériteraient d'être davantage investigués et évalués sur le terrain.

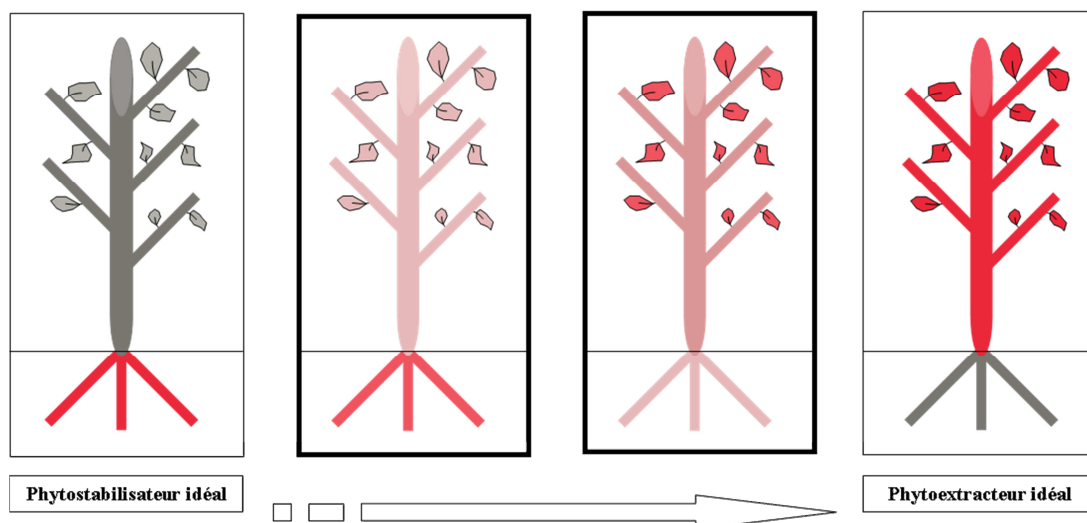


Figure XII : Schéma conceptuel de l'utilisation du saule en phytoremédiation. Les parties colorées correspondent aux organes de la plante où les métaux sont accumulés. S'agissant d'un schéma conceptuel, nous partons du postulat selon lequel il n'existe pas de phytostabilisateur ni de phytoextracteur idéaux. Un phytostabilisateur « idéal » accumulerait les métaux exclusivement au niveau des racines et les stabiliserait au niveau de la rhizosphère (cadran 1). Dans le cadre d'une gestion en T(t)CR, ce dernier pourrait être utilisé dans une valorisation de biomasse « propre » tout en stabilisant la pollution d'un site. En dehors d'une gestion en T(t)CR, ce même phytostabilisateur, en tant qu'espèce pionnière, pourrait promouvoir la revégétalisation généralement observée en conditions naturelles. Un phytoextracteur « idéal », quant à lui, serait un individu pouvant extraire des métaux du sol grâce à une accumulation importante de ceux-ci dans ses parties aériennes (cadran 4) de manière à permettre l'assainissement d'un site pollué sur une période d'une culture en T(t)CR par exemple (environ 25 ans).

Dans nos essais, nous avons pu démontrer que les clones de saules ne constituent pas des phytoextracteurs de métaux. Bien que nous n'ayons pas analysé les teneurs en métaux dans les racines, nous avons pu montrer qu'il y a un « gradient » de concentrations dans les parties aériennes (cadres 2 et 3) parmi les clones de saules étudiés. Ceci appuie le fait qu'il n'existe pas de phytostabilisateur idéal. Ainsi, les clones présentant les plus faibles teneurs dans la biomasse seraient à privilégier en phytostabilisation et permettraient de récolter du bois le moins contaminé possible (cadran 2). Les clones ayant une possibilité de transfert des métaux plus importante vers la partie récoltable peuvent également limiter la dispersion des métaux dans l'environnement (cadran 3). La récolte de leur biomasse contribuera à une exportation minimale des métaux du sol. L'utilisation de nos clones de saules est discutée dans nos conclusions et perspectives en référence aux législations en vigueur à l'échelle européenne.

Nos clones de saules ont pu croître dans le même substrat contaminé, or deux groupes de saules ont pu être déterminés : les forts producteurs de biomasse (HBP pour high biomass producers) et les faibles producteurs de biomasse (LBP pour low biomass producers). Nos résultats indiquent que les teneurs en plomb sont importantes chez les LBP. Nous avons pu également constater que, pour les LBP, les teneurs en cuivre, fer et zinc sont relativement proches des teneurs phytotoxiques indiquées dans la littérature. Les mesures physiologiques (fluorescence chlorophyllienne (F_o , F_m et F_v/F_m), des teneurs foliaires en sucres) n'indiquent toutefois pas une moindre tolérance aux métaux des LBP par rapport aux HBP. Les deux groupes induisent des protéines impliquées dans le système de défense antioxydatif. Cependant, l'abondance de ces protéines est plus grande chez les LBP. L'efficacité photochimique des LBP est également identique à celle des HBP. Les LBP et les HBP sont donc tolérants aux métaux bien que leur croissance soit différente. La tolérance des HBP aurait un moindre coût énergétique par rapport aux LBP.

L'approche phénotypique classe le clone 47 (*Salix aurita*) comme phytoextracteur potentiel. En comparant ce clone au clone 45 (*Salix fragilis*) en présence et en absence de métaux, nous avons pu constater que la production de biomasse de *Salix fragilis* diminue en présence des métaux alors que celle de *Salix aurita* ne varie pas. Nous avons également observé que lorsque le zinc et le nickel sont en excès, ceux-ci sont davantage accumulés dans les parties aériennes, et ce pour les deux clones. Le cadmium, quant à lui, n'augmente que dans les tiges. Par contre, bien que les teneurs en cuivre soient 60 fois plus élevées dans le sol contaminé, les clones y présentent des plus faibles teneurs en cuivre que ceux cultivés en sol témoin. Aussi, bien que la concentration en manganèse n'ait pas été augmentée dans le substrat contaminé, *S. aurita* l'accumule davantage en comparaison à *S. fragilis*. Les autres métaux étant également présents en fortes teneurs, ceux-ci pourraient influencer l'absorption du cuivre et du manganèse mais nos essais ne permettent pas de le confirmer. De manière générale, les analyses physiologiques et protéomiques indiquent des signes de stress chez les deux clones. Cependant, l'impact des métaux serait plus important chez *S. aurita* bien que sa production de biomasse soit maintenue. En effet, *S. aurita* doit faire face à des dommages au niveau de la membrane et le processus de photosynthèse est davantage perturbé chez ce clone. Enfin, les protéines impliquées dans les défenses antioxydatives sont sous-réglées chez ce clone, alors que chez *S. fragilis*, les mécanismes de défense sont maintenus.

D'autre part, nous avons pu constater une concentration en sucres plus élevée chez *S. aurita*. Nous avons suggéré que cette accumulation en sucres puisse être une stratégie de tolérance développée chez ce clone (rôle d'osmorégulateurs et/ou signal pour réduire le processus de photosynthèse et donc la production de ROS). A l'inverse, l'accumulation des sucres dans les feuilles peut être liée à une inhibition de la croissance racinaire, elle-même symptôme d'une probable intolérance aux métaux. Cependant, nos résultats ne nous permettent pas de vérifier ces hypothèses.

En conclusion, nos résultats n'indiquent pas clairement le développement d'une stratégie de *S. aurita* afin de tolérer les métaux, bien que ce clone présente les critères d'un phytoextracteur. Nous pouvons

émettre l'hypothèse selon laquelle l'absence de mécanismes de tolérance chez ce saule aura une incidence sur sa capacité de survie, lors d'une exposition prolongée aux métaux. En revanche, la réduction de la croissance en présence de métaux chez *S. fragilis* indique que ce clone privilégie la diminution de la croissance comme stratégie de tolérance.

A partir de ce constat, nous sommes confrontés à la définition même de la tolérance chez les ligneux.

La définition de tolérance selon [Macnair et Baker \(1994\)](#) est la capacité d'une plante à survivre, à croître et à se reproduire sur un sol dont les teneurs en métaux sont toxiques pour d'autres. Lorsqu'il s'agit de la tolérance de populations d'herbacées, de métallobytes se développant sur les collines cuprifères du Katanga, cette définition globale reste relativement simple. En effet, ces végétaux étant des herbacées annuelles, le cycle complet de la plante est facilement observable. A partir du moment où une plante est apte à se reproduire sur un sol riche en métaux, la définition de [Macnair and Baker \(1994\)](#) est compréhensible. Qu'en est-il des ligneux ? Que peut être la définition de tolérance à l'échelle de vie d'un arbre ? Si l'on fait référence à la définition de [Clemens \(2001\)](#), qui va au-delà du contexte global proposé par les auteurs cités précédemment, pouvons-nous parler de tolérance chez les ligneux étudiés dans ce travail ?

L'approche phénotypique n'est pas suffisante pour répondre à cette question et l'intégration des approches physiologiques et protéomiques permettent d'obtenir une vue d'ensemble sur la tolérance des ligneux aux métaux. Nous avons constaté que, les faibles producteurs de biomasse, bien qu'ils aient présenté des teneurs en métaux plus importantes au niveau de leur tige, ne sont pas moins tolérants que les forts producteurs de biomasse (cf. chap. 2. III). Il y a donc chez ces clones des indices de mécanismes d'homéostasie permettant de réguler l'effet néfaste d'un excès en éléments essentiels et non essentiels. Ces mécanismes ont permis aux ligneux testés dans nos essais de croître et survivre dans un milieu contaminé aux métaux.

Si l'on convient qu'après une période courte d'essais (en pots), des clones peuvent s'avérer tolérants, alors nous pouvons convenir que sur une période d'essai plus longue *in situ*, il est crucial de suivre le comportement de l'arbre sur l'entièreté de son existence. A partir du moment où il y a une persistance des mécanismes de tolérance durant le cycle de vie de l'arbre, nous pouvons affirmer que le temps est un paramètre à intégrer dans la définition de la tolérance des ligneux aux métaux.

Le développement du saule en présence de métaux est possible. En effet, en tant qu'espèce pionnière, le saule est enclin à développer des mécanismes de tolérance communs aux stress abiotiques générés par des conditions environnementales difficiles ([Durand, 2009](#)).

A l'issue de l'étude « physiologique » et « protéomique » de la tolérance des clones de saules, la forte production de biomasse ne peut être utilisée comme critère de sélection de clones tolérants. Nous nous retrouvons avec une incompatibilité entre les critères phénotypiques de sélection dans une approche de phytoremédiation et les critères physiologiques et protéomiques de la tolérance.

Les micro-organismes de la rhizosphère, bactéries et champignons, ont également leur importance dans l'étude de tolérance des ligneux aux métaux. D'une part parce qu'ils sont cruciaux dans le bon développement des végétaux en captant les éléments essentiels, d'autre part parce que ces micro-organismes, premiers contacts avec les contaminants, peuvent jouer un rôle important dans l'accumulation ou le piégeage des métaux par l'arbre.

Bactéries et champignons ont également développé des mécanismes de tolérance aux métaux leur permettant de faire face à cette contrainte environnementale. En ce sens, plusieurs études *in vitro* ont été menées pour mesurer l'effet des métaux sur la croissance des champignons « seuls » mais capables de former des ectomycorhizes, dans la plupart des cas. D'autres auteurs ont, par ailleurs, comparé la mobilisation et l'accumulation des métaux entre des plants inoculés et non inoculés. Les essais du troisième chapitre représentent une première étape de sélection avant l'inoculation de saules en vue d'étudier l'effet de la symbiose sur la tolérance de ceux-ci. Il résulte de ces essais que des souches ont pu être classées sensibles au cadmium et d'autres pas ou peu sensibles au métal. L'identification de souches non sensibles au cadmium a révélé qu'il s'agissait d'endophytes (DSE pour dark septate endophyte). Il s'agit là d'un groupe moins étudié de manière générale par rapport aux mycorhizes. Dès lors, ces endophytes ont été d'autant moins étudiés en présence de métaux. [Smith et Read \(2008\)](#) rapportent des travaux de Melin de 1923 et de 1925, qui a observé de manière fréquente ce type de champignons. D'après lui, ceux-ci peuvent être isolés des racines même avec une stérilisation extensive. De cette manière, il conclut qu'il s'agissait plutôt de micro-organismes vivant dans les tissus racinaires plutôt qu'en association. Certaines études ne classent pas ces endophytes comme des champignons mycorhiziens. Même si dans certains cas ils agissent comme tels et sont bénéfiques au développement de végétaux, les endophytes sont plutôt classés à l'intersection du continuum mutualisme-parasitisme (références dans [Smith et Read, 2008](#)). Cependant, des études complémentaires doivent encore être menées pour confirmer le statut de parasite des endophytes.

Ces endophytes, faisant partie intégrante des racines, constituent une nouvelle branche de micro-organismes rhizosphériques qu'il serait intéressant d'étudier. A ce jour, nous possédons peu d'informations quant à ce que confère cette association chez les ligneux et quels rôles celle-ci peut jouer en présence de métaux. Certains auteurs rapportent que les DSE constituent l'association champignon-hôte la plus fréquemment retrouvée sur les sols pollués ([Li et al., 2011](#) ; [Deram et al., 2011](#) ; [Fogarty et Robin, 1996](#)). D'autres auteurs ont tenté d'expliquer les mécanismes conférant cette tolérance aux métaux chez les DSE par la présence de la mélanine dans les hyphes. La mélanine, composée de groupes carboxyliques, phénoliques, hydroxyles et aminés, constitue des sites de fixation d'ions métalliques. Ceci pourrait expliquer pourquoi nos souches non sensibles sont essentiellement des DSE.

Conclusions et perspectives

Par rapport aux essais menés dans ce travail

Nos résultats indiquent que les saules présentent généralement une stratégie de tolérance aux métaux par exclusion, ce qui leur permet de croître sur un substrat contaminé. Cependant, dans nos essais, les racines n'ont pas été récoltées. Le facteur de bioconcentration (BCF) racinaire, par exemple, n'a pu être calculé. Ceci est essentiellement dû au fait que la récupération du système racinaire entier dans un produit de dragage se révèle relativement complexe. Il serait donc intéressant d'effectuer des essais complémentaires pour vérifier notre hypothèse avec différents types de substrats (avec des mobilités des métaux différentes).

Les essais de 2010 et de 2011 en conteneurs visaient principalement le criblage de ligneux sur base de leur développement en milieu contaminé. A cet effet, aucun milieu témoin n'a été utilisé. Cependant, ceci aurait été très important pour répondre à plusieurs questions telles que la réduction de croissance ou non, par rapport à un substrat non contaminé. Il y a toutefois une difficulté à trouver un milieu témoin ayant des propriétés similaires (structure et texture) aux boues de dragage. Des solutions sont tout de même proposées, telles que l'utilisation de boues de dragage du même site de stockage (Obourg), mais présentant de moindres teneurs en métaux. Cependant, ceci pourrait entraîner un risque d'utiliser une boue avec une texture différente (moins de particules fines). Si nous voulons garder l'avantage d'une contamination « historique » dans l'utilisation des boues de départ, celles-ci pourraient également être « nettoyées » en les soumettant à des modifications physico-chimiques favorisant la lixiviation ou la chélation des métaux. Cependant, ceci pourrait mobiliser ou immobiliser d'autres éléments que les métaux. La microfaune et la microflore pourraient également être affectées. Une autre alternative serait de mélanger le substrat à des alluvions non contaminés afin de réaliser un gradient de contaminations.

La fluorescence chlorophyllienne peut être utilisée comme outil non destructif permettant une approche physiologique de l'étude de la tolérance. Cependant, il serait intéressant de sélectionner différents paramètres de fluorescence qui seraient mesurés sur le saule *in situ* et de comparer les valeurs à celles obtenues sur des saules non exposés aux métaux.

Le chapitre trois représente une première étape dans l'étude de l'effet des associations fongiques sur la tolérance des ligneux aux métaux. Des essais de la seconde étape devraient inclure les points suivants :

- Etudier les paramètres de culture permettant l'installation d'une association entre les racines et les souches étudiées.
- Une fois que l'association est installée, étudier l'effet de l'association fongique sur la tolérance des ligneux aux métaux : les souches favorisent-elles la croissance en milieu contaminé ? Empêchent-elles le transfert des métaux vers la partie aérienne ? Promeut-elle la stratégie d'exclusion des essences ligneuses et donc l'obtention d'un bois moins contaminé ?

Ces essais, avant d'être menés sur le terrain, devraient être menés en conditions contrôlées. En effet, il faut s'assurer des conditions dans lesquels l'association se fait. Des dispositifs tels que les rhizoboxes paraissent intéressants (Vyslouzilova *et al.*, 2006).

En Wallonie, il existe de nombreux sites contaminés classés en trois catégories : les sites désaffectés à réaménager (SAR), les dépotoirs et les stations-services. Mais il faut également tenir compte des sites à risques toujours en activité, les dépôts de produits de dragage contenant de fortes teneurs en métaux, les pollutions accidentelles mais aussi les anciens sites non répertoriés (Cellule Etat de l'environnement wallon, 2010). Depuis le 1er janvier 2013, le Décret Sols³ est pleinement opérationnel et a donc toute son importance.

Le Décret Sols est basé sur l'évaluation et la gestion du risque lié aux pollutions. Il présente à cet égard (1) les normes de concentrations en polluants auxquelles les teneurs retrouvées sur un site doivent être comparées, ainsi que les (2) actions devant être menées en fonction des valeurs atteintes.

Le dépassement de concentrations dites « *valeurs seuils* » implique la nécessité de réaliser une étude d'orientation et, le cas échéant, une caractérisation plus poussée d'un site pollué. Dans certains cas, le Décret impose l'assainissement proprement dit des pollutions et l'élaboration d'un « projet d'assainissement » du site avant toute réaffectation, et des mesures supplémentaires doivent ensuite être prises afin de prévenir de toute nouvelle pollution.

Lorsqu'il s'agit de *pollution historique* (antérieures au 30 avril 2007), le Décret Sols impose d'enlever tout risque de « menace grave » pour la santé humaine, les eaux souterraines et l'écosystème. Cependant, même si tout risque sanitaire est écarté, il peut persister un risque environnemental de lessivage vers les nappes phréatiques. C'est dans ce cas particulier que la phytostabilisation des polluants peut représenter une solution de gestion du risque de lessivage. Il est toutefois important de mentionner que des mesures de suivi complémentaires devront nécessairement être adjointes. En effet, dans un processus de phytostabilisation, l'adjonction d'un *monitoring* de la plantation permettra de s'assurer que tout du risque de lessivage sera maîtrisé via l'installation de drains et piézomètres de contrôle par exemple.

Lorsqu'il s'agit d'une *pollution nouvelle* (postérieure au 30 avril 2007), le Décret Sols impose une dépollution du site afin d'atteindre les « *valeurs de référence* » pondérées par les concentrations de fond, notamment dans le cas de pollutions en métaux. D'autre part, le décret intègre le principe « BAT⁴ », en conséquence de quoi des considérations de faisabilités économiques et techniques peuvent être prises en compte. C'est ainsi que des techniques dites classiques peuvent être appliquées.

³ Décret du 5 décembre 2008 relatif à la gestion des sols.

⁴ «Best Available Technology » - concept repris à l'article 2 13° du décret : "meilleures techniques disponibles" : le stade de développement le plus efficace et avancé des installations et activités et de leurs modes de conception, de construction, d'exploitation et d'entretien dans le secteur de l'assainissement des sols démontrant l'aptitude pratique de techniques particulières à constituer, en principe, la base des valeurs établies en exécution du présent décret et visant à éviter et, lorsque cela s'avère impossible, à réduire de manière générale les préjudices à la santé de l'homme ou à la qualité de l'environnement, à condition que ces techniques soient mises au point sur une échelle permettant de les appliquer dans le secteur concerné, dans des conditions économiquement et techniquement viables et soient accessibles dans des conditions raisonnables (Directive n°2010/75 du 24 novembre 2010 relative aux émissions industrielles (« IED »)).

Développées depuis les années 70, il s'agit principalement de techniques physiques, chimiques et thermiques (Evlard *et al.*, 2011). Elles éliminent (lavage des terres, électrocinétique, désorption thermique) ou insolubilisent les métaux dans le sol (stabilisation physico-chimique). Le confinement est également possible et consiste au regroupement des terres dans une cavité imperméable et où les eaux d'infiltration sont collectées et traitées (Vanobberghen, 2011). Ces techniques sont coûteuses et destructrices des propriétés du sol. Par l'application conjointe de ces techniques et du principe BAT, il peut néanmoins rester des *pollutions résiduelles* lorsque les valeurs de référence ne peuvent être atteintes. Dans ce cas précis, et pour autant que tout risque de menace grave ait été éliminé, le « Décret sol » impose des mesures de *réparations complémentaires et compensatoires*⁵. C'est dans ce contexte précis que la phytostabilisation peut s'avérer être une stratégie complémentaire. Les teneurs en métaux dans le sol ayant été diminuées, elle permettrait ainsi d'assurer une démarche de dépollution susceptible d'être reconnue à juste titre comme mesure de réparation complémentaire. Enfin, la phytostabilisation pourrait être utilement reconnue comme mesure de réparation compensatoire dans le sens où elle permettrait non seulement de pérenniser la gestion de risques de contamination des nappes phréatiques, mais aussi de récupérer une valeur biologique du sol. Encore une fois, un suivi sera nécessaire pour s'assurer que la pollution est bien maîtrisée.

C'est dans ces contextes que la phytostabilisation est envisageable et peut être une alternative innovante et intéressante d'un point de vue financier. En effet, une plantation de saules, suivant une technique de culture en taillis à courte rotation (TCR), peut valoriser des sites contaminés aux métaux. Cette valorisation peut avoir deux aboutissements principaux qui sont la valorisation « énergie » et la valorisation « matière » du bois de phytostabilisation (Delcarte *et al.*, 2013, Gossiaux, 2012).

Mais quelle serait la production annuelle de biomasse par le saule en milieu contaminé ?

Sur sol « normal », le rendement moyen du saule en T(t)CR varie entre 5 à 7 t.ha⁻¹.an⁻¹ (Gauthier, 2013) et entre 6 à 10 t.ha⁻¹.an⁻¹ (French *et al.*, 2006 ; Dimitriou *et al.*, 2005 ; 2006) mais pourrait aller jusqu'à 10 à 15 t.ha⁻¹.an⁻¹ (Greger et Landberg, 1995; Meers *et al.* 2005).

Nos résultats en biomasse, ainsi que ceux généralement obtenus après des essais en pots ou en laboratoire ne peuvent être extrapolés à ceux que nous pourrions obtenir sur le terrain. En effet, la biodisponibilité des éléments métalliques, et donc leur toxicité, est souvent plus importante en milieu contrôlé. Le confinement du système racinaire lors des expériences en pots peut également être un facteur important. Il faut également prendre en considération que le long terme n'est pas intégré dans ce type d'expérience. Enfin, les substrats artificiellement contaminés, généralement utilisés en pots, ne reflète pas l'équilibre physico-chimique d'un sol historiquement contaminé : il existe une

⁵ « Réparation complémentaire » : toute mesure de réparation entreprise à l'égard des ressources naturelles ou des services afin de compenser le fait que la réparation primaire n'aboutit pas à la restauration complète des ressources naturelles ou des services. « Réparation compensatoire » : toute action entreprise afin de compenser les pertes intermédiaires de ressources naturelles ou de services qui surviennent entre la date de survenance d'un dommage et le moment où la réparation primaire a pleinement produit son effet.

hétérogénéité et des hotspots dans le sol d'un site pollué que les racines peuvent contourner, ce qui favorise la croissance de la plante (Dickinson *et al.*, 2009 ; Pietrini *et al.*, 2010). Afin de valider nos conclusions, des démonstrations *in situ* sont donc nécessaires.

Quelques expériences ont été menées *in situ* (Gardea-Torresdey *et al.*, 2005 ; Witters *et al.*, 2009 ; Ruttens *et al.*, 2011 ; Suer and Andersson-Sköld, 2011). Trois ans après la plantation, Witter *et al.*, 2009 indiquent que la moyenne annuelle de production de biomasse est de 4.7 à 5.9 t.ha⁻¹.an⁻¹. Cependant, ils remettent en cause les concentrations élevées en Cd, Zn et Pb, ces dernières ayant pu réduire la production de biomasse. Ils indiquent également des conditions difficiles de croissance liées aux caractéristiques du sol (le sol était sec, pauvre et sableux). Toutefois, le taux de survie des plants était de 91%, ceci indiquant que les plants se sont bien enracinés malgré les conditions peu favorables pour la croissance (Ruttens *et al.*, 2011). Le rendement annuel de biomasse est principalement fonction de deux facteurs. Avant la contrainte liée aux métaux, il est important de tenir compte de la contrainte « nutritionnelle » et d'éventuelles conditions de croissance non favorables pour les ligneux. Ensuite, des teneurs trop élevées en métaux peuvent également être la raison d'un échec de la plantation (Pulford *et al.* 2001 ; King *et al.*, 2006 ; Meers *et al.*, 2007). Dans les deux cas de figures, des amendements et fertilisants peuvent être nécessaires (Bes et Mench, 2008).

La réalisation d'essais *in situ*, permettrait de quantifier les coûts que représente une plantation de saules, ainsi que les « bénéfiques » économiques (énergie, valorisation matière) et environnementaux inhérents (phytostabilisation, réduction d'émissions de CO₂) (Witters *et al.*, 2009).

L'installation d'une saulaie comprend différents coûts, certes moins importants par rapport à des techniques d'assainissement classiques, mais qu'il faut toutefois intégrer. L'investissement de départ nécessaire pour l'installation et la survie des plantes concerne principalement le matériel végétal, la préparation du site, la plantation, la récolte mais aussi les amendements, la fertilisation, le désherbage et l'irrigation. En effet, un des facteurs limitants est sans doute la demande en eau qui peut s'avérer importante chez le saule malgré qu'il puisse s'adapter à des conditions de croissance difficiles. Certaines espèces peuvent aller puiser en profondeur l'eau de la nappe phréatique et s'acclimater ainsi aux conditions environnementales. Le saule a également l'avantage de croître aussi bien dans des sols engorgés que dans les sols bien aérés.

Bois propre ou bois déchet ?

Delcarte *et al.* (2013) et Gossiaux (2012) ont procédé à la comparaison des teneurs en métaux dans les tiges provenant de nos essais aux valeurs seuils des différentes législations européennes déterminant la qualité du bois. Compte tenu de leurs résultats, les bois obtenus après ces essais sont considérés comme « bois propre ». La combustion du bois issu d'un projet de phytostabilisation est dès lors théoriquement possible. Toutefois, bien que le transfert des métaux soit limité chez les clones de saules, il reste néanmoins un risque d'émission des métaux dans l'atmosphère lorsque la biomasse sera brûlée. Il faut donc partir du principe que la biomasse issue d'un tel projet doit être brûlée de manière

contrôlée et qu'il faut l'intégrer aux circuits de valorisation industrielle (épuration des fumées absente au niveau domestique...). Des recherches doivent encore être menées quant à la sélection de saules limitant un maximum le transfert des métaux vers les parties aériennes et viser l'obtention d'un bois de plus en plus propre (Figure XII). D'autant plus lorsque le transfert vers les feuilles est non négligeable et qu'il implique que la biomasse foliaire devrait être également récoltée pour éviter le problème de disponibilité des métaux par la dégradation des feuilles une fois tombées au sol. Ceci en défaveur de l'enrichissement du sol par la restitution de la litière.

Des processus de combustion adéquats de matériaux issus de projets de phytoremédiation permettraient d'empêcher l'émission des métaux et sont maintenant en cours d'investigation (Kuppens *et al* 2010). D'autre part, le recyclage des métaux peut être envisagé grâce à la récupération des métaux issus des cendres, ce qui serait un atout économique non négligeable à l'heure actuelle. En ce sens, ces parties de la filière « valorisation du bois de phytostabilisation » engendrent des atouts en termes de développement socio-économiques. Qu'il s'agisse du développement de nouveaux projets en recherche et développements (techniques et matériaux innovants), ou du maintien, voire de la création d'emplois ou d'activités économiques.

Enfin, une plantation de saulaie, confère d'autres plus-values environnementales au site contaminé :

- Une contribution à la fixation du carbone et à la réduction des émissions de CO₂ (Ledin, 1998 ; Marmiroli *et al.*, 2011 ; Witters *et al.*, 2012).
- Un effet bénéfique sur la biodiversité en offrant nourriture et protection à divers animaux, favorisant ainsi la création d'écosystèmes (Ledin, 1998 ; Suer and Andersson-Sköld, 2011).
- L'absorption des nutriments et la circulation du carbone dans le système sol-plante-atmosphère (Laureysens *et al.*, 2004).
- Un frein à l'érosion du sol et au lessivage des contaminants.
- Dans un objectif de phytostabilisation, une plantation de saules n'implique pas nécessairement la technique de culture par T(t)CR. Si la technique du T(t)CR n'est pas envisagée, la dégradation de « nouvelle » matière organique pourrait permettre le développement des strates herbacées auparavant limitées. Au cours du temps, le saule, espèce pionnière serait remplacé par d'autres espèces végétales.
- Un couvert végétal améliorant la qualité du paysage.
- Enfin, les parties ligneuses « propres » peuvent alors être valorisées culturellement par la restauration des pratiques de la vannerie, de l'architecture végétale (Evlard *et al.* 2011).

« Cette nouvelle approche ne sera acceptée que si l'on démontre son succès » (Van Der Lelie *et al.*, 2001) et « elle sera définitivement acceptée au travers de l'intégration des aspects sociaux » (Gardea-Torresdey *et al.*, 2005). A l'heure actuelle, nous évoluons dans une société complexe, où les actions envisagées s'intègrent dans une vision systémique. La phytostabilisation comme technique de phytoremédiation dépasse désormais le domaine de la recherche. Elle intègre des filières porteuses et amène la communauté scientifique à travailler de manière transversale en vue d'assurer une gestion intégrée.

Bibliographie

- Agerer R. (1987 – 2002). Colour Atlas of Ectomycorrhizae. *EinhornSchwaebisch Gmuend, Germany*.
- Ahsan N., Renaut J. et Komatsu S. (2009). Recent developments in the application of proteomics to the analysis of plant responses to heavy metals. *Proteomics* **9** (10): 2602-2621.
- Alaoui-Sosse B., Genet P., Vinit-Dunand F., *et al.* (2004). Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Science* **166** (5): 1213-1218.
- Aldric J.-M., Druart P., Maesen P., *et al.* (2011). Potentialités d'application des technologies biologiques pour la dépollution des sols en Wallonie. *Le Journal des Ingénieurs Bruxelles, Belgium: Fédération Royale d'Associations Belges d'Ingénieurs Civils et d'Ingénieurs Agronomes et l'Association pour l'Encouragement à l'Union des Revues Techniques Belges (URTB)*.
- Almeida C.M., Pereira C., da Costa D.S., *et al.* (2012). Chlapsin, a chloroplastidial aspartic proteinase from the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* **236**: 283-296.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., *et al.* (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.
- Alvarez E., Marcos M.L.F., Vaamonde C. et Fernandez-Sanjurjo M.J. (2003). Heavy metals in the dump of an abandoned mine in Galicia (NW Spain) and in the spontaneously occurring vegetation. *Science of the Total Environment* **313** (1-3): 185-197.
- Anderson L.E., Gatla N. et Carol A.A. (2009). Co-localization of P-glycerate kinase, P-ribulokinase, ADP-glucose pyrophosphorylase and Rubisco activase with CF1 in pea leaf chloroplasts. *Plant Science* **177**: 136-141.
- Andersson I. et Backlund A. (2008). Structure and function of Rubisco. *Plant Physiology and Biochemistry* **46** (3): 275-291.
- Apel K. et Hirt H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 373-399.
- Arduini I., Godbold D.L., Onnis A. et Stefani A. (1998). Heavy metals influence mineral nutrition of tree seedlings. *Chemosphere* **36** (4-5): 739-744.
- Arik F. et Yaldiz T. (2010). Heavy Metal Determination and Pollution of the Soil and Plants of Southeast Tavsanlı (Kutahya, Turkey). *Clean-Soil Air Water* **38** (11): 1017-1030.
- Baczek-Kwinta R., Koziel A. et Seidler-Łożykowska K. (2011). Are the fluorescence parameters of German chamomile leaves the first indicators of the anthodia yield in drought conditions? *Photosynthetica* **49** (87-97):
- Baier M. et Dietz K.J. (1997). The plant 2-cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded chloroplast protein: Its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plants. *Plant Journal* **12** (1): 179-190.

Bailey S., Thompson E., Nixon P.J., *et al.* (2002). A critical role for the Var2 FtsH homologue of *Arabidopsis thaliana* in the photosystem II repair cycle *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry* **277** (3): 2006-2011.

Baize D. (1994). Teneurs totales en métaux lourds dans les sols français premiers résultats du programme ASPITET. *Courrier de l'Environnement INRA* **22**: 37-46.

Baize D. (2009). Elements en traces dans les sols : fonds géochimiques ; fonds pédogéochimiques et teneurs agricoles habituelles. Définitions et utilités. *Courrier de l'Environnement INRA* **57**: 63-72.

Balsberg Pahlsson A.M. (1989). Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. A literature review. *Water, Air, and Soil Pollution* **47** (3-4): 287-319.

Banfalvi G. (2011). Heavy Metals, Trace Elements and Their Cellular Effects Cellular Effects of Heavy Metals. *Springer, Netherlands*.

Baudouin J.C. (1993). Les plantes ligneuses. Vol II : Les arbres feuillus. *Ministère de la Région Wallonne, Belgium*.

Baum C., Hryniewicz K., Leinweber P. et Meisner R. (2006). Heavy-metal mobilization and uptake by mycorrhizal and nonmycorrhizal willows (*Salix × dasyclados*). *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **169** (4): 516-522.

Belgio E., Johnson M.P., Jurić S. et Ruban A.V. (2012). Higher plant photosystem II light-harvesting antenna, not the reaction center, determines the excited-state lifetime - Both the maximum and the nonphotochemically quenched. *Biophysical Journal* **102** (12): 2761-2771.

Bellion M., Courbot M., Jacob C., *et al.* (2006). Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters* **254** (2): 173-181.

Ben Ghnaya A., Charles G., Hourmant A., *et al.* (2009). Physiological behaviour of four rapeseed cultivar (*Brassica napus* L.) submitted to metal stress. *Comptes Rendus - Biologies* **332** (4): 363-370.

Bernier F. et Berna A. (2001). Germins and germin-like proteins: Plant do-all proteins. But what do they do exactly? *Plant Physiology and Biochemistry* **39**: 545-554.

Bertrand M. et Poirier I. (2005). Photosynthetic organisms and excess of metals. *Photosynthetica* **43** (3): 345-353.

Bes C. et Mench M. (2008). Remediation of copper-contaminated topsoils from a wood treatment facility using *in situ* stabilisation. *Environmental Pollution* **156** (3): 1128-1138.

Bhaduri A.M. et Fulekar M.H. (2012). Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **11** (1): 55-69.

Binns A.N., Chen R.H., Wood H.N. et Lynn D.G. (1987). Cell division promoting activity of naturally occurring dehydrodiconiferyl glucosides: Do cell wall components control cell division? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84** (4): 980-984.

- Blaudez D., Botton B. et Chalot M. (2000b). Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Microbiology* **146** (5): 1109-1117.
- Blaudez D., Jacob C., Turnau K., *et al.* (2000a). Differential responses of ectomycorrhizal fungi to heavy metals *in vitro*. *Mycological research* **104** (11): 1366-1371.
- Bolouri-Moghaddam M.R., Le Roy K., Li X., *et al.* (2010). Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *FEBS Journal* **277** (9): 2022-2037.
- Borghgi M., Tognetti R., Monteforti G. et Sebastiani L. (2007). Responses of *Populus euramericana* (*P. deltoides* x *P. nigra*) clone Adda to increasing copper concentrations. *Environmental and Experimental Botany* **61** (1): 66-73.
- Borghgi M., Tognetti R., Monteforti G. et Sebastiani L. (2008). Responses of two poplar species (*Populus alba* and *Populus x canadensis*) to high copper concentrations. *Environmental and Experimental Botany* **62** (3): 290-299.
- Borowiak K., Drzewiecka K., Magdziak Z., *et al.* (2012). Effect of Ca/Mg ions ratio on copper accumulation, photosynthetic activity and growth of Cu²⁺-treated *Salix viminalis* L. 'Cannabina'. *Photosynthetica* **50** (3): 353-361.
- Bouchet P., Guignard J.L. et Villard J. (1999). Les champignons. Mycologie fondamentale et appliquée. *Masson : Paris, France*.
- Brieger G., Wells J. et Hunter R.D. (1992). Plant and animal species composition and heavy metal content in fly ash ecosystems. *Water, Air, and Soil Pollution* **63** (1-2): 87-103.
- Brown M.T. et Wilkins D.A. (1985). Zinc tolerance in *Betula*. *New Phytologist* **99** (1): 91-100.
- Bruns T. et Read D. (2000). *In vitro* germination of nonphotosynthetic, myco-heterotrophic plants stimulated by fungi isolated from the adult plants. *New phytologist* **148** (2): 335-342.
- Caulfield L.E. et Black R.E. (2004). Comparative Quantification of Health Risks. Global and regional burden of disease attribution to selected major risk factors. *World Health Organization Library Geneva*.
- Cecchi M. (2008). Thèse de doctorat : Devenir du plomb dans le système sol-plante. Cas d'un sol contaminé par une usine de recyclage du plomb et de deux plantes potagères (Fève et Tomate). *Institut National Polytechnique de Toulouse : France*.
- Cellule Etat de l'environnement wallon (2010). Tableau de bord de l'environnement wallon. Partie 4, chap. 3. *SPW-DGARNE-DEMNA-DEE, Belgium*.
- Chaney R.L., Malik M., Li Y.M., *et al.* (1997). Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology* **8** (3): 279-284.
- Chapman P.M. (2002). Ecological risk assessment (ERA) and hormesis. *Science of The Total Environment* **288** (1-2): 131-140.
- Chen C., Huang D. et Liu J. (2009). Functions and toxicity of nickel in plants: Recent advances and future prospects. *Clean - Soil, Air, Water* **37** (4-5): 304-313.

- Chen L., Jia H., Du L., *et al.* (2011). Release of the oxygen-evolving complex subunits from photosystem ii membranes in phosphorylation condition under light stress. *Chinese Journal of Chemistry* **29** (12): 2631-2636.
- Cheng S., Ren F., Grosse W. et Wu Z. (2002). Effects of cadmium on chlorophyll content, photochemical efficiency, and photosynthetic intensity of *Canna indica* Linn. *International Journal of Phytoremediation* **4** (3): 239-246.
- Cherif J., Mediouni C., Ammar W.B. et Jemal F. (2011). Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in tomato plants (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Environmental Sciences* **23** (5): 837-844.
- Clemens S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212** (4): 475-486.
- CNHS, Centre National d'Histoire des Sciences & La Fonderie. (2013). http://www.astrolabium.be/IMG/pdf/dossier_pedagogique_metaux.pdf.
- Collins R.N., Bakkaus E., Carriere M., *et al.* (2010). Uptake, localization, and speciation of cobalt in *triticum aestivum* L. (Wheat) and *lycopersicon esculentum* M. (Tomato). *Environmental Science and Technology* **44** (8): 2904-2910.
- Colls J.J. et Hall D.P. (2004). Application of a chlorophyll fluorescence sensor to detect chelate-induced metal stress in *Zea mays*. *Photosynthetica* **42** (1): 139-145.
- Colpaert J.V. et Van Assche J.A. (1987). Heavy Metal Tolerance in Some Ectomycorrhizal Fungi. *Functional Ecology* **1** (4): 415-421.
- Colpaert J.V. et Van Assche J.A. (1992a). Zinc toxicity in ectomycorrhizal *Pinus sylvestris*. *Plant and Soil* **143** (2): 201-211.
- Colpaert J. et Van Assche J. (1992b). The effects of cadmium and the cadmium-zinc interaction on the axenic growth of ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **145** (2): 237-243.
- Colpaert J.V. et Van Assche J.A. (1993). The effects of cadmium on ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* L. *New Phytologist* **123** (2): 325-333.
- Colpaert J., Vandenkoornhuyse P., Adriaensen K. et Vangronsveld J. (2000). Genetic variation and heavy metal tolerance in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus luteus*. *New phytologist* **147** (2): 367-379.
- Colpaert J.V., Wevers J.H.L., Krznicaric E. et Adriaensen K. (2011). How metal-tolerant ecotypes of ectomycorrhizal fungi protect plants from heavy metal pollution. *Annals of Forest Science* **68** (1): 17-24.
- Cosio C., Vollenweider P. et 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. *Environmental and Experimental Botany* **58**: 64-74.
- Dagnelie P. (2003). Principes d'experimentation. *Les presses agronomiques, Gembloux, Belgium*.

Dagnelie P. (2011). Statistique theorique et appliquee. Tome 2. Inference statistique a une et a deux dimensions. *De Boeck, Bruxelles, Belgium*.

Dahmani-Muller H., van Oort F., Gelie B. et Balabane M. (2000). Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environmental Pollution* **109** (2): 231-238.

De Foresta E. et Paul R. (1981). Phytotoxicity of cadmium. *Annales de Gembloux* **87** (4): 201-210.

De Paolis M., Pietrosanti L., Capotorti G., et al. (2011). *Salicaceae* Establishment in a Heavy Metal-contaminated Site Revealed by Eco-physiological Characterization of the Culturable Soil Bacterial Fraction. *Water, Air, and Soil Pollution* **216** (1-4): 505-512.

Decock C., Herrera Figueroa S., Robledo G. et Castillo G. (2007). *Fomitiporia punctata* (Basidiomycota, Hymenochaetales) and its presumed taxonomic synonyms in America: taxonomy and phylogeny of some species from tropical / subtropical area. *Mycologia* **99** (5): 733-752.

Delaplace P., Fauconnier M.L., Sergeant K., et al. (2009). Potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber ageing induces changes in the proteome and antioxidants associated with the sprouting pattern. *Journal of Experimental Botany* **60**: 1273-88.

Delcarte J., Gossiaux L. et Evlard A. (2013). Valorisation énergétique du bois produit à des fins de phytoremédiation. In : *Druart P., Husson, C. et Paul R. (Eds.). Renaturation des berges de cours d'eau et phytoremédiation. Presses agronomiques de Gembloux, Belgium*.

Demirevska-Kepova K., Holzer R., Simova-Stoilova L. et Feller U. (2005). Heat stress effects on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco binding protein and Rubisco activase in wheat leaves. *Biologia Plantarum* **49** (4): 521-525.

Denny H.J. et Wilkins D.A. (1987a). Zinc tolerance in *Betula* spp. III. Variation in response to zinc among ectomycorrhizal associates. *New Phytologist* **106** (3): 535-544.

Denny H.J. et Wilkins D.A. (1987b). Zinc tolerance in *Betula* spp. IV. The mechanism of ectomycorrhizal amelioration of zinc toxicity. *New Phytologist* **106** (3): 545-553.

Deram A., Languereau F. et Haluwyn C.v. (2011). Mycorrhizal and endophytic fungal colonization in *Arrhenatherum elatius* L. roots according to the soil contamination in heavy metals. *Soil & Sediment Contamination* **20** (1): 114-127.

Dickinson N.M. (2000). Strategies for sustainable woodland on contaminated soils. *Chemosphere* **41** (1-2): 259-263.

Dickinson N.M. et Pulford I.D. (2005). Cadmium phytoextraction using short-rotation coppice *Salix*: the evidence trail. *Environment International* **31** (4): 609-613.

Dickinson N.M., Baker A.J.M., Doronila A., et al. (2009). Phytoremediation of inorganics : realism and synergies. *International Journal of Phytoremediation* **11** (2): 97-114.

Dimitriou I. et Aronsson P. (2005). Willows for energy and phytoremediation in Sweden. *Unasylva* **56** (221): 47-50.

- Dimitriou I., Aronsson P. et Weih M. (2006). Stress tolerance of five willow clones after irrigation with different amounts of landfill leachate. *Bioresource Technology* **97**: 150-157.
- Dixit V., Pandey V. et Shyam R. (2001). Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of Experimental Botany* **52** (358): 1101-1109.
- Dixon R.K. et Buschena C.A. (1988). Response of ectomycorrhizal *Pinus banksiana* and *Picea glauca* to heavy metals in soil. *Plant Soil* **105** (2): 265-271.
- Dominguez D., Cordoba Garcia F., Canalejo Raya A. et Torronteras Santiago R. (2010). Cadmium-induced oxidative stress and the response of the antioxidative defense system in *Spartina densiflora*. *Physiologia Plantarum* **139** (3): 289-302.
- Drénou C., Bonneau M., Charnet F., et al. (2006). Les racines. Face cachée des arbres. *IDF, Paris, France*.
- Druart P., Leclercq M., Joussemet M. A., 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 P., Husson, C. et Paul R. (Eds.). *Renaturation des berges de cours d'eau et phytoremédiation. Presses agronomiques de Gembloux, Belgium*.
- Duffus J.H. (2002). "heavy metals" - A meaningless term? (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry* **74** (5): 793-807.
- Duquesnoy I., Goupil P., Nadaud I., et al. (2009). Identification of *Agrostis tenuis* leaf proteins in response to As(V) and As(III) induced stress using a proteomics approach. *Plant Science* **176** (2): 206-213.
- Durand T.C. (2009). Thèse de doctorat : Approche proteomique des stress abiotiques chez *Populus tremula x P. alba*. *Université d'Orléans (France)*.
- Durand T.C., Hausman J.F., Carpin S., et al. (2010a). Zinc and cadmium effects on growth and ion distribution in *Populus tremula x Populus alba*. *Biologia Plantarum* **54** (1): 191-194.
- Durand T.C., Sergeant K., Planchon S., et al. (2010b). Acute metal stress in *Populus tremula x P. alba* (717-1B4 genotype): Leaf and cambial proteome changes induced by cadmium²⁺. *Proteomics* **10** (3): 349-368.
- Eason J.R., Ryan D.J., Pinkney T.T. et O'Donoghue E.M. (2002). Programmed cell death during flower senescence: isolation and characterization of cysteine proteinases from *Sandersonia aurantiaca*. *Functional Plant Biology* **29**: 1055-1064.
- Ekvall L. et Greger M. (2003). Effects of environmental biomass-producing factors on Cd uptake in two Swedish ecotypes of *Pinus sylvestris*. *Environmental Pollution* **121** (3): 401-411.
- Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Selivanova N.V., et al. (2012). The role of promoter methylation in the regulation of genes encoding succinate dehydrogenase in maize seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology* **59** (3): 299-306.

- Ernst W.H.O. (1996). Bioavailability of heavy metals and decontamination of soils by plants. *Applied Geochemistry* **11** (1-2): 163-167.
- Evers D., Lefèvre I., Legay S., Lamoureux D., Hausman J.-F., Rosales R. O. G., Marca L. R. T., Hoffmann L., Bonierbale M. and Schafleitner R. (2010). Identification of drought-responsive compounds in potato through a combined transcriptomic and targeted metabolite approach. *Journal of Experimental Botany* **61** (9): 2327-2343.
- Evlard A., Campanella B. et Paul R. (2011). Effects of Cd on ectomycorrhizal fungal growth. Efficacy of *in vitro* screening experiment. *Agrochimica* **55** (2): 85-93.
- Evlard A., Vanobberghen F., Campanella B. et Paul R. (2011). La phytoremediation par le saule. *Forêt Wallonne* **112**: 36-46.
- Evlard A., Printz B., Campanella B., *et al.* (2013). Etude du saule et de l'aulne pour la phytoremediation des berges de cours d'eau non navigables. In : *Druart P., Husson, C. et Paul R. (Eds.). Renaturation des berges de cours d'eau et phytoremédiation. Presses agronomiques de Gembloux, Belgium.*
- FAO. (2008). Synthèse des rapports d'activité nationaux, préparée pour la 23eme 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 publiée).*
- FAO. (2013). International Poplar Commission. <http://www.fao.org/forestry/ipc/en/>.
- Faucon M.P. (2009). These de doctorat : Ecologie et biologie de la conservation des metallophytes. Le cas de *Crepidiorhopalon perennis* et *C. tenuis* (Scrophulariaceae) des sols cupro-cobaltiferes du Katanga. *Université Libre de Bruxelles : Belgique.*
- Feng L., Han Y., Liu G., *et al.* (2007). Overexpression of sedoheptulose-1,7-bisphosphatase enhances photosynthesis and growth under salt stress in transgenic rice plants. *Functional Plant Biology* **34** (9): 822-834.
- Fernandez R. (2008). Cadmium accumulation and its effect on the *in vitro* growth of woody fleabane and mycorrhized white birch. *Environmental Pollution* **152**: 522-529.
- Fernandez J., Zacchini M. et Fleck I. (2012). Photosynthetic and growth responses of *Populus* clones Eridano and I-214 submitted to elevated Zn concentrations. *Journal of Geochemical Exploration* **123** (0): 77-86.
- Fitz W.J. et Wenzel W.W. (2002). Arsenic transformations in the soil-rhizosphere-plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. *Journal of Biotechnology* **99** (3): 259-78.
- Fogarty R.V. et Tobin J.M. (1996). Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme and Microbial Technology* **19** (4): 311-317.

- Fomina M., Alexander I., Colpaert J. et Gadd G. (2005). Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. *Soil biology & biochemistry* **37** (5): 851-866.
- Fortin A.J., Plenchette C. et Piche Y. (2008). Les Mycorhizes, la nouvelle revolution verte. *Quebec : MultiMondes et Paris : Quae*.
- French C., Dickinson N. et Putwain P. (2006). Woody biomass phytoremediation of contaminated brownfield land. *Environmental pollution* **141** (3): 387-395.
- Gadd G.M. (1993). Interactions of fungus with toxic metals. *New Phytologist* **124** (1): 25-60.
- Galli U., Schuepp H. et Brunold C. (1994). Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum* **92** (2): 364-368.
- Gamalero E., Lingua G., Berta G. et Glick B.R. (2009). Beneficial role of plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to heavy metal stress. *Canadian Journal of Microbiology* **55** (5): 501-14.
- Gang D.R., Kasahara H., Xia Z.Q., *et al.* (1999). Evolution of plant defense mechanisms: Relationships of phenylcoumaran benzylic ether reductases to pinoresinol-lariciresinol and isoflavone reductases. *Journal of Biological Chemistry* **274** (11): 7516-7527.
- Garcia-Jimenez J., Armengol J., Sales R., *et al.* (2000). Fungal pathogens associated with melon collapse in Spain. *Bulletin OEPP* **30** (2): 169-173.
- Gardea-Torresdey J.L., Peralta-Videa J.R., De la Rosa G. et Parsons J.G. (2005). Phytoremediation of heavy metals and study of the metal coordination by X-ray absorption spectroscopy. *Coordination Chemistry Reviews* **249**: 1797-1810.
- Gauthier G. (2013). (Valbiom) Entrevue du 8 fevrier 2013.
- Gebre G.M., Brandle J.R. et Kuhns M.R. (1997). Influence of rewatering and time of sampling on solute accumulation of two *Populus deltoides* clones. *Tree Physiology* **17** (5): 341-346.
- Gibson B.R. et Mitchell D.T. (2006). Sensitivity of ericoid mycorrhizal fungi and mycorrhizal *Calluna vulgaris* to copper mine spoil from Avoca, County Wicklow. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy* **106** (1): 9-18.
- Gossiaux L. (2012). Travail de fin d'etude : Valorisation de la biomasse ligneuse issue de sites pollués en éléments-traces métalliques. *Université de Liège, Gembloux agro bio tech (Belgique)*.
- Govender M., Dye P.J., Weiersbye I.M., *et al.* (2009). Review of commonly used remote sensing and ground-based technologies to measure plant water stress. *Water SA* **35** (5): 741-752.
- Greger M. et Landberg T. (1995). Use of willow clones with high Cd accumulating properties in phytoremediation of agricultural soils with elevated Cd levels. *Contaminated Soils (Les Colloques n°85)*.
- Greger M. et Landberg T. (1999). Use of Willow in Phytoextraction. *International Journal of Phytoremediation* **1** (2): 115-123.

Greger M. et Landberg T. (2001). Investigations on the relation between biomass production and uptake of Cd, Cu and Zn. In : Greger M., Landberg T., Berg B. (2001). *Salix clones with different properties to accumulate heavy metals for production biomass*. Akademityck AB, Edsburk.

Guelfi A., Azevedo R.A., Lea P.J. et Molina S.M.G. (2003). Growth inhibition of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* by cadmium: An antioxidant enzyme approach. *Journal of General and Applied Microbiology* **49** (2): 63-73.

Guignard C., Jouve L., Bogeat-Triboulot M.B., et al. (2005). Analysis of carbohydrates in plants by high-performance anion-exchange chromatography coupled with electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1085** (1): 137-142.

Gupta A.K. et Kaur N. (2005). Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *Journal of Biosciences* **30** (5): 761-776.

Gupta R. et Mukerji K.G. (2001). *Microbial Technology Fungi as a major group of organisms*. Kulbhushan Nangia Ashish Books, India.

Gupta S. (1965). On some multiple decision (selection and ranking) rules. *Technometrics* **7**: 225-245.

Hakmaoui A., Baron M. et Ater M. (2006). Environmental biotechnology screening Cu and Cd tolerance in *Salix* species from North Morocco. *African Journal of Biotechnology* **5** (13): 1299-1302.

Hall J.L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **53** (366): 1-11.

Hammer D., Kayser A. et Keller C. (2003). Phytoextraction of Cd and Zn with *Salix viminalis* in field trials. *Soil Use and Management* **19** (3): 187-192.

Hartley J., Cairney J.W.G., Sanders F.E. et Meharg A.A. (1997a). Toxic interactions of metal ions (Cd²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺ and Sb³⁻) on *in vitro* biomass production of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* **137** (3): 551-562.

Hartley J., Cairney J.W.G. et Meharg A.A. (1997b). Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptive tolerance to potentially toxic metals in the environment? *Plant and Soil* **189** (2): 303-319.

Hartley-Whitaker J., Cairney J. et Meharg A. (2000a). Toxic effects of cadmium and zinc on ectomycorrhizal colonization of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from soil inoculum. *Environmental toxicology and chemistry* **19** (3): 694-699.

Hartley-Whitaker J., Cairney J. et Meharg A. (2000b). Sensitivity to Cd or Zn of host and symbiont of ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* L. (Scots pine) seedlings. *Plant and soil* **218** (1/2): 31-42.

Hasan S.A., Fariduddin Q., Ali B., et al. (2009). Cadmium: Toxicity and tolerance in plants. *Journal of Environmental Biology* **30** (2): 165-174.

Hassan Z. et Aarts M.G.M. (2011). Opportunities and feasibilities for biotechnological improvement of Zn, Cd or Ni tolerance and accumulation in plants. *Environmental and Experimental Botany* **72** (1): 53-63.

Henmi T., Miyao M. et Yamamoto Y. (2004). Release and Reactive-Oxygen-Mediated Damage of the Oxygen-Evolving Complex Subunits of PSII during Photoinhibition. *Plant and Cell Physiology* **45** (2): 243-250.

Ho E. (2004). Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **15** (10): 572-578.

Ho S.L., Chao Y.C., Tong W.F. et Yu S.M. (2001). Sugar coordinately and differentially regulates growth- and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanisms. *Plant Physiology* **125** (2): 877-890.

Hopkins W.G. (2003). Introduction to plant physiology. *De Boeck, Bruxelles, Belgium*.

Horton P., Ruban A.V. et Walters R.G. (1996). Regulation of light harvesting in green plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47** (1): 655-684.

Horvath G., Droppa M., Oravecz A., et al. (1996). Formation of the photosynthetic apparatus during greening of cadmium-poisoned barley leaves. *Planta* **199**: 238-243.

Hossain M.A., Piyatida P., da Silva J.A.T. et Fujita M. (2012a). 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. *Journal of Botany* **2012**:

Hossain Z., Makino T. et Komatsu S. (2012b). Proteomic study of β -aminobutyric acid-mediated cadmium stress alleviation in soybean. *Journal of Proteomics* **75**: 4151-4164.

Hryniewicz K., Haug I. et Baum C. (2008). Ectomycorrhizal community structure under willows at former ore mining sites. *European Journal of Soil Biology* **44** (1): 37-44.

Hsu J.C. (1996). Multiple comparisons theory and methods. *Chapman and Hall, London*.

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>.

Janik E., Grudziński W., Gruszecki W.I. et Krupa Z. (2008). The xanthophyll cycle pigments in *Secale cereale* leaves under combined Cd and high light stress conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **90** (1): 47-52.

Jentschke G. et Godbold D.L. (2000). Metal toxicity and ectomycorrhizas. *Physiologia Plantarum* **109** (2): 107-116.

Jiang N., Luo X., Zeng J., et al. (2010). Lead toxicity induced growth and antioxidant responses in *Luffa cylindrical* seedlings. *International Journal of Agriculture and Biology* **12**: 205-210.

John R., Ahmad P., Gadgil K. et Sharma S. (2009). Heavy metal toxicity: Effect on Plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L. *International Journal of Plant Production* **3** (3): 65-75.

Jones M.D. et 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 Phytologist* **108** (4): 451-459.

Jones D.L., Nguyen C. et Finlay R.D. (2009). Carbon flow in the rhizosphere: Carbon trading at the soil-root interface. *Plant and Soil* **321** (1-2): 5-33.

Jozefczak M., Remans T., Vangronsveld J. et Cuypers A. (2012). Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *International Journal of Molecular Sciences* **13** (3): 3145-3175.

Jumpponen A. et Trappe J.M. (1998). Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist* **140** (2): 295-310.

Jumpponen A. (2001). Dark septate endophytes - are they mycorrhizal? *Mycorrhiza* **11** (4): 207-211.

Juste C. (1988). Appreciation de la mobilite et de la biodisponibilite des elements en trace du sol. *Science du sol* **26** (2): 103-112.

Khade S.W. et Adholeya A. (2007). Feasible Bioremediation through arbuscular mycorrhizal fungi imparting heavy metal tolerance: A retrospective. *Bioremediation Journal* **11** (1): 33-43.

Khan A.G., Kuek C., Chaudhry T.M., et al. (2000). Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* **41** (1/2): 197-207.

Kidd P., Barcelo J., Bernal M.P., et al. (2009). Trace element behaviour at the root-soil interface: Implications in phytoremediation. *Environmental and Experimental Botany* **67** (1): 243-259.

Kieffer P., Dommes J., Hoffmann L., et al. (2008). Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants. *PROTEOMICS* **8** (12): 2514-2530.

Kieffer P., Planchon S., Oufir M., et al. (2009a). Combining proteomics and metabolite analyses to unravel cadmium stress-response in poplar leaves. *Journal of Proteome Research* **8** (1): 400-417.

Kieffer P., Schroder P., Dommes J., et al. (2009b). Proteomic and enzymatic response of poplar to cadmium stress. *Journal of Proteomics* **72** (3): 379-396.

Kim C., Power S. et Bell J. (2003). Effects of cadmium on growth and glucose utilisation of ectomycorrhizal fungi *in vitro*. *Mycorrhiza* **13** (4): 223-226.

Kim M.D., Kim Y.-H., Kwon S.-Y., et al. (2011). Overexpression of 2-cysteine peroxiredoxin enhances tolerance to methyl viologen-mediated oxidative stress and high temperature in potato plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **49** (8): 891-897.

Kim Y.J., Lee O.R., Lee S., et al. (2012). Isolation and characterization of a theta glutathione S-transferase gene from *Panax ginseng* meyer. *Journal of Ginseng Research* **36** (4): 449-460.

- King R., Royle A., Putwain P. et Dickinson N. (2006). Changing contaminant mobility in a dredged canal sediment during a three-year phytoremediation trial. *Environmental pollution* **143** (2): 318-326.
- Kosesakal T., Yuzbaşıoğlu E., Kaplan E., et al. (2011). Uptake, accumulation and some biochemical responses in *Raphanus sativus* L. to zinc stress. *African Journal of Biotechnology* **10** (32): 5993-6000.
- Kovalchuk I., Titov V., Hohn B. et Kovalchuk O. (2005). Transcriptome profiling reveals similarities and differences in plant responses to cadmium and lead. *Muta Res – Fundam Mol Mech Mutagen* **570**: 149-161.
- Kowalski T. et Bartnik C. (1995). *Cryptosporiopsis radiccicola* sp. nov. from roots of *Quercus robur*. *Mycological Research* **99** (6): 663-666.
- Kruger T.P.J., Ilioaia C., Valkunas L. et Van Grondelle R. (2011). Fluorescence intermittency from the main plant light-harvesting complex: Sensitivity to the local environment. *Journal of Physical Chemistry B* **115** (18): 5083-5095.
- Krupa P. et Piotrowska-Seget Z. (2003). Positive aspects of interaction between plants and mycorrhizal fungi originating from soils polluted with cadmium. *Polish Journal of Environmental Studies* **12** (6): 723-726.
- Krznaric E., Verbruggen N., Wevers J., et al. (2009). Cd-tolerant *Suillus luteus* : a fungal insurance for pines exposed to Cd. *Environmental pollution* **157** (5): 1581-1588.
- Krznaric E., Wevers J., Cloquet C., et al. (2010). Zn pollution counteracts Cd toxicity in metal-tolerant ectomycorrhizal fungi and their host plant, *Pinus sylvestris*. *Environmental microbiology* **12** (8): 2133-2141.
- Kuppens T., Cornelissen T., Carleer R., et al. (2010). Economic assessment of flash co-pyrolysis of short rotation coppice and biopolymer waste streams. *Journal of Environmental Management* **91** (12): 2736-2747.
- Kuzovkina Y.A. et Quigley M.F. (2005). Willows beyond wetlands: Uses of *salix* L. species for environmental projects. *Water, Air, and Soil Pollution* **162** (1-4): 183-204.
- Lambot F. (2011). Le saule dans le genie vegetal : maintien des berges et talus. *Forêt Wallonne* **112**: 29-35.
- Landberg T. et Greger M. (1996). Differences in uptake and tolerance to heavy metals in *Salix* from unpolluted and polluted areas. *Applied Geochemistry* **11**: 175-180.
- Landberg T. et Greger M. (2004). No phytochelatin (PC2 and PC3) detected in *Salix viminalis*. *Physiologia Plantarum* **121** (3): 481-487.
- Lasat M.M. (2002). Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality* **31** (1): 109-20.
- Latowski D., Kruk J. et Strzałka K. (2005). Inhibition of zeaxanthin epoxidase activity by cadmium ions in higher plants. *Journal of Inorganic Biochemistry* **99** (10): 2081-2087.

Laureysens I., Bogaert J., Blust R. et Ceulemans R. (2004). Biomass production of 17 poplar clones in a short-rotation coppice culture on a waste disposal site and its relation to soil characteristics. *Forest Ecology and Management* **187** (2–3): 295-309.

Lazar D. (1999). Chlorophyll a fluorescence induction. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1412** (1): 1-28.

Ledin S. (1998). Environmental consequences when growing short rotation forests in Sweden. *Biomass & Bioenergy* **15** (1): 49-55.

Lenaz G. et Genova M.L. (2010). Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING* **12** (8): 961-1008.

Leuschner C. et Bricker T.M. (1996). Interaction of the 33 kDa extrinsic protein with photosystem II: Rebinding of the 33 kDa extrinsic protein to photosystem II membranes which contain four, two, or zero manganese per photosystem II reaction center. *Biochemistry* **35** (14): 4551-4557.

Levy D.B., Redente E.F. et Uphoff G.D. (1999). Evaluating the phytotoxicity of PB-ZN tailings to big bluestem (*Andropogon Gerardii* Vitman) and switchgrass (*Panicum Virgatum* L.). *Soil Science* **164** (6): 363-375.

Leyval C. (1997). Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* **7**: 139-157.

Li T., Liu M.J., Zhang X.T., et al. (2011). Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*. *Science of the Total Environment* **409** (6): 1069-1074.

Likar M. et Regvar M. (2009). Application of temporal temperature gradient gel electrophoresis for characterisation of fungal endophyte communities of *Salix caprea* L. in a heavy metal polluted soil. *Science of The Total Environment* **407** (24): 6179-6187.

Linger P., Ostwald A. et Haensler J. (2005). *Cannabis sativa* L. growing on heavy metal contaminated soil: growth, cadmium uptake and photosynthesis. *Biologia Plantarum* **49**: 567-576.

Lingua G., Franchin C., Todeschini V., et al. (2008). Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect the response to high zinc concentrations of two registered poplar clones. *Environmental Pollution* **53** (1): 137-147.

Lingua G., Bona E., Todeschini V., et al. (2012). Effects of heavy metals and arbuscular mycorrhiza on the leaf proteome of a selected poplar clone: A time course analysis. *PLoS ONE* **7** (6):

Lone M.I., He Z.L., Stoffella P.J. et Yang X.E. (2008). Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: Progresses and perspectives. *Journal of Zhejiang University: Science B* **9** (3): 210-220.

Mackey A.J., Haystead T.A. et Pearson W.R. (2002). Getting more from less: algorithms for rapid protein identification with multiple short peptide sequences. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **1** (2): 139-147.

- Macnair M.R. et M. Baker A.J.M. (1994). Metal tolerance in plants :evolutionary aspects. *In Bert V., Macnair M. R., Laguerie P. d., Saumitou-Laprade P. and Petit D. (2000). Zinc tolerance and accumulation in metallicolous and nonmetallicolous populations of Arabidopsis halleri (Brassicaceae). New Phytologist* **146** (2): 225-233.
- Maksymiec W. (2007). Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum* **29** (3): 177-187.
- Malec P., Maleva M.G., Prasad M.N.V. et Strzałka K. (2010). Responses of *Lemna trisulca* L. (Duckweed) exposed to low doses of cadmium: Thiols, metal binding complexes, and photosynthetic pigments as sensitive biomarkers of ecotoxicity. *Protoplasma* **240** (1): 69-74.
- Maleva M.G., Nekrasova G.F., Borisova G.G., et al. (2012). Effect of heavy metals on photosynthetic apparatus and antioxidant status of Elodea. *Russian Journal of Plant Physiology* **59** (2): 190-197.
- Mallick N. et Mohn F.H. (2003). Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **55** (1): 64-69.
- Mapolelo M. et Torto N. (2004). Trace enrichment of metal ions in aquatic environments by *Saccharomyces cerevisiae*. *Talanta* **64** (1): 39-47.
- Marmiroli M., Pietrini F., Maestri E., et al. (2011). Growth, physiological and molecular traits in Salicaceae trees investigated for phytoremediation of heavy metals and organics. *Tree Physiology* **31** (12): 1319-1334.
- Marschner H. (1995). Beneficial Mineral Elements. Mineral Nutrition of Higher Plants (Second Edition). *Academic Press, London*.
- Martins L.L., Mourato M.P., Cardoso A.I., 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 Physiologiae Plantarum* **33** (4): 1375-1383.
- Matysiak R. (2002). Content of carotenoids in needles of *Pinus sylvestris* L. growing in polluted area. *Cuadernos de Medicina Forense* (28): 39-42.
- Maxwell K. et Johnson G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence - A practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51** (345): 659-668.
- Meers E., Lamsal S., Vervaeke P., et al. (2005). Availability of heavy metals for uptake by *Salix viminalis* on a moderately contaminated dredged sediment disposal site. *Environmental Pollution* **137** (2): 354-364.
- Meers E., Vandecasteele B., Ruttens A., et al. (2007). Potential of five willow species (*Salix* spp.) for phytoextraction of heavy metals. *Environmental and experimental botany* **60** (1): 57-68.
- Mertens J., Van Nevel L., De Schrijver A., et al. (2007). Tree species effect on the redistribution of soil metals. *Environmental Pollution* **149** (2): 173-181.

- Mertens P., Elsocht P., Ramelot F. et Stordeur G. (2011a). Diversite et determination des saules en Wallonie. *Forêt Wallonne* **112**: 7-19.
- Mertens P. (2011b). Diverite des mlieux de developpement pour les saules indigenes. *Forêt Wallonne* **112**: 20-28.
- Migeon A., Richaud P., Guinet F., *et al.* (2009). Metal Accumulation by Woody Species on Contaminated Sites in the North of France. *Water Air and Soil Pollution* **204** (1-4): 89-101.
- Miles C. D., Brandle J. R., Daniel D. J., *et al.* (1972). Inhibition of photosystem II in isolated chloroplasts by lead. *Plant Physiology* **49**: 820-825.
- Miquel, G. (2001). Rapport sur les effets des metaux lourds sur l'environnement et la sante. *Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques*:
- Mleczek. (2009). Accumulation of selected heavy metals by different genotypes of *Salix*. *Environmental and Experimental Botany* **66** (2): 289-296.
- Mleczek M., Rutkowski P., Rissmann I., *et al.* (2010). Biomass productivity and phytoremediation potential of *Salix alba* and *Salix viminalis*. *Biomass & bioenergy* **34** (9): 1410-1418.
- Muthukumar T. et Bagyaraj D.J. (2010). Use of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Proc Nat Ac Sci Ind Sect B - Biol Sci* **80 (PART 2)**: 103-121.
- Neiman M., Olson M.S. et Tiffin P. (2009). Selective histories of poplar protease inhibitors: Elevated polymorphism, purifying selection, and positive selection driving divergence of recent duplicates. *New Phytologist* **183**: 740-750.
- Nepovim A., Podlipna R., Soudek P., *et al.* (2004). Effects of heavy metals and nitroaromatic compounds on horseradish glutathione S-transferase and peroxidase. *Chemosphere* **57** (8): 1007-1015.
- Newsham K.K., Upton R. et Read D.J. (2009). Mycorrhizas and dark septate root endophytes in polar regions. *Fungal Ecology* **2** (1): 10-20.
- Nweke C.O. (2010). Effects of metals on dehydrogenase activity and glucose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Nigerian Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **25** (2): 28-35.
- Osorio J., Osorio M.L. et Romano A. (2012). Reflectance indices as nondestructive indicators of the physiological status of *Ceratonia siliqua* seedlings under varying moisture and temperature regimes. *Functional Plant Biology* **39** (7): 588-597.
- Oswald O., Martin T., Dominy P.J. et Graham I.A. (2001). Plastid redox state and sugars: Interactive regulators of nuclear-encoded photosynthetic gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98** (4): 2047-2052.
- Oufir M., Legay S., Nicot N., *et al.* (2008). Gene expression in potato during cold exposure: Changes in carbohydrate and polyamine metabolisms. *Plant Science* **175** (6): 839-852.
- Oztetik E. (2008). A tale of plant Glutathione S-transferases: Since 1970. *Botanical Review* **74** (3): 419-437.

- Palit S., Sharma A. et Talukder G. (1994). The effects of cobalt on plants. *The botanical review* **60** (2): 149-181.
- Palm R. (2000). L'analyse de la variance multivariee et l'analyse canonique discriminante: principes et applications en analyse de la variance. *Notes de statistique et d'informatique, 2000/1, Gembloux, Belgique*. http://www.gembloux.ulg.ac.be/si/Note2000/avm_acd.pdf (26/11/2012).
- Parys E., Romanowska E., Siedlecka M. et Poskuta J.W. (1998). The effect of lead on photosynthesis and respiration in detached leaves and in mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*. *Acta Physiologiae Plantarum* **20** (3): 313-322.
- Patnaik D. et Khurana P. (2001). Germins and germin like proteins: an overview. *Indian Journal of Experimental Biology* **39**: 191-200.
- Paul M.J. et Pellny T.K. (2003). Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *Journal of Experimental Botany* **54** (382): 539-547.
- Perez-Bueno M.L., Baron M. et Garcia-Luque I. (2011). PsbO, PsbP, and PsbQ of photosystem II are encoded by gene families in *Nicotiana benthamiana*. Structure and functionality of their isoforms. *Photosynthetica* **49**: 573-580.
- Pietrini F., Zacchini M., Iori V., et al. (2010). Screening of poplar clones for cadmium phytoremediation using photosynthesis, biomass and cadmium content analyses. *International Journal of Phytoremediation* **12** (1): 105-20.
- Pietrosanti L., Pietrini F., Zacchini M., et al. (2009). Phytoremediation of a metal contaminated industrial soil of Porto Margheba by a short rotation forestry stand. *Proceedings of the 11th International Conference on Environmental Science and Technology Chania, Crete, Greece, 3 – 5 September 2009*:
- Portis Jr A.R. (2003). Rubisco activase - Rubisco's catalytic chaperone. *Photosynthesis Research* **75** (1): 11-27.
- Pourrut B., Shahid M., Dumat C., et al. (2011). Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **213** (113-136):
- Prasun R., Richa T., Reddy U. et alok A. (2005). Detecting the heavy metal tolerance level in ectomycorrhizal fungi *in vitro*. *World journal of microbiology & biotechnology* **21** (3): 309-315.
- Pugh R.E., Dick D.G. et Fredeen A.L. (2002). Heavy metal (Pb, Zn, Cd, Fe, and Cu) contents of plant foliage near the anvil range lead/zinc mine, Faro, Yukon Territory. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **52** (3): 273-279.
- Pulford I., Watson C. et McGregor S. (2001). Uptake of chromium by trees: prospects for phytoremediation. *Environmental geochemistry and health* **23** (3): 307-311.
- Pulford I.D., Riddell-Black D. et Stewart C. (2002). Heavy metal uptake by willow clones from sewage sludge-treated soil: The potential for phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation* **4** (1): 59-72.

- Pulford I.D. et Watson C. (2003). Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees - a review. *Environment International* **29** (4): 529-540.
- Punshon T. et Dickinson N. (1997). Acclimation of *Salix* to metal stress. *New phytologist* **137** (2): 303-314.
- Qin G., Meng X., Wang Q. et Tian S. (2009). Oxidative damage of mitochondrial proteins contributes to fruit senescence: A redox proteomics analysis. *Journal of Proteome Research* **8**: 2449-2462.
- Rajkumar M., Sandhya S., Prasad M.N. et Freitas H. (2012). Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances* **30** (6): 1562-74.
- Rascio N. et Navari-Izzo F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science* **180** (2): 169-181.
- Rashid A. et Popovic R. (1990). Protective role of CaCl₂, against Pb²⁺ inhibition in Photosystem II. *FEBS Letters* **271**: 181-184.
- Rashid A., Camm E.L. et Ekramoddoullah A.K.M. (1994). Molecular mechanism of action of Pb²⁺ and Zn²⁺ on water oxidizing complex of photosystem II. *FEBS Letters* **350** (2-3): 296-298.
- Raskin I., Smith R.D. et Salt D.E. (1997). Phytoremediation of metals: Using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology* **8** (2): 221-226.
- Renaut J., Lutts S., Hoffmann L. and Hausman J. F. (2004). Responses of poplar to chilling temperatures: Proteomic and physiological aspects. *Plant Biology* **6** (1): 81-90.
- Renaut J., Hausman J.F. et Wisniewski M.E. (2006). Proteomics and low-temperature studies: Bridging the gap between gene expression and metabolism. *Physiologia Plantarum* **126** (1): 97-109.
- Rosselli W., Keller C. et Boschi K. (2003). Phytoextraction capacity of trees growing on a metal contaminated soil. *Plant and soil* **256** (2): 265-272.
- Ruttens A., Boulet J., Weyens N., et al. (2011). Short rotation coppice culture of willows and poplars as energy crops on metal contaminated agricultural soils. *International Journal of Phytoremediation* **13 Suppl 1**: 194-207.
- Salvucci M.E., Osteryoung K.W., Crafts-Brandner S.J. et Vierling E. (2001). Exceptional sensitivity of Rubisco activase to thermal denaturation *in vitro* and *in vivo*. *Plant Physiol* **127**: 1053-1064.
- Samarakoon A.B. et Rauser W.E. (1979). Carbohydrate Levels and Photoassimilate Export from Leaves of *Phaseolus vulgaris* Exposed to Excess Cobalt, Nickel, and Zinc. *Plant Physiology* **63** (6): 1165-1169.
- Sanchez-Pardo B., Fernandez-Pascual M. et 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. *Environmental and Experimental Botany* **84** (0): 52-60.
- Sanita Di Toppi L. et Gabbriellini R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* **41** (2): 105-130.

- Savenstrand H. et Strid A. (2004). A *Pisum sativum* glyoxysomal malate dehydrogenase induced by cadmium exposure. *DNA Sequence - Journal of DNA Sequencing and Mapping* **15** (3): 206-208.
- Schulz B., Sucker J., Aust H.J., *et al.* (1995). Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* species. *Mycological Research* **99** (8): 1007-1015.
- Schulz B. et Boyle C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research* **109** (6): 661-686.
- Schumann W. (1999). FtsH – a single-chain charonin? *FEMS Microbiology Reviews* **23** (1): 1-11.
- Seidler A. (1996). The extrinsic polypeptides of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1277** (1-2): 35-60.
- Sell J., Kayser A., Schulin R. et Brunner I. (2005). Contribution of ectomycorrhizal fungi to cadmium uptake of poplars and willows from a heavily polluted soil. *Plant and soil* **277** (1/2): 245-253.
- Semane B., Dupae J., Cuypers A., *et al.* (2010). Leaf proteome responses of *Arabidopsis thaliana* exposed to mild cadmium stress. *Journal of Plant Physiology* **167**: 247-54.
- Seregin I.V. et Ivanov V.B. (2001). Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology* **48** (4): 523-544.
- Sergeant K., Spies N., Renaut J., *et al.* (2011). One dry summer: A leaf proteome study on the response of oak to drought exposure. *Journal of Proteomics* **74**: 1385-95.
- Seymour F.A., Cresswell J.E., Fisher P.J., *et al.* (2004). The influence of genotypic variation on metabolite diversity in populations of two endophytic fungal species. *Fungal Genetics and Biology* **41** (7): 721-734.
- Shahid M., Pinelli E. et Dumat C. (2012). Review of Pb availability and toxicity to plants in relation with metal speciation; role of synthetic and natural organic ligands. *Journal of Hazardous Materials* **219-220** (1-12).
- Shanahan J.O., Brummer J.E., Leininger W.C. et Paschke M.W. (2007). Manganese and zinc toxicity thresholds for mountain and Geyer willow. *International Journal of Phytoremediation* **9** (5): 437-452.
- Sharma P. et Dubey R.S. (2005). Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **17** (35-52).
- Sinclair S.A. et Kramer U. (2012). The zinc homeostasis network of land plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1823** (9): 1553-1567.
- Singh V., Bhatt I., Aggarwal A., *et al.* (2010). Proline improves copper tolerance in chickpea (*Cicer arietinum*). *Protoplasma* **245** (1): 173-181.

Singla-Pareek S.L., Yadav S.K., Pareek A., *et al.* (2006). Transgenic tobacco overexpressing glyoxalase pathway enzymes grow and set viable seeds in zinc-spiked soils. *Plant Physiology* **140** (2): 613-623.

Smith S.E. et Read D. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis* (Third Edition). *Academic Press, London.*

Sohn K., Roehm M., Urban C., *et al.* (2005). Identification and characterization of Cor33p, a novel protein implicated in tolerance towards oxidative stress in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* **4** (12): 2160-2169.

Spieß N., Oufir M., Matušikova I., *et al.* (2012). Ecophysiological and transcriptomic responses of oak (*Quercus robur*) to long-term drought exposure and rewatering. *Environmental and Experimental Botany* **77**: 117-126.

Stals M., Carleer R., Reggers G., *et al.* (2010). Flash pyrolysis of heavy metal contaminated hardwoods from phytoremediation: Characterisation of biomass, pyrolysis oil and char/ash fraction. *Journal of analytical and applied pyrolysis* **89** (1): 22-29.

Suer P. et Andersson-Skold Y. (2011). Biofuel or excavation? - Life cycle assessment (LCA) of soil remediation options. *Biomass and Bioenergy* **35** (2): 969-981.

Tam P.C.F. (1995). Heavy metal tolerance by ectomycorrhizal fungi and metal amelioration by *Pisolithus tinctorius*. *Mycorrhiza* **5** (3): 181-187.

Tan Y.-F., O'Toole N., Taylor N.L. et Millar A.H. (2010). Divalent Metal Ions in Plant Mitochondria and Their Role in Interactions with Proteins and Oxidative Stress-Induced Damage to Respiratory Function. *Plant Physiology* **152** (2): 747-761.

Taylor A.F.S. et alexander I.A.N. (2005). The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist* **19** (3): 102-112.

Tkalec M., Prebeg T., Roje V., *et al.* (2008). Cadmium-induced responses in duckweed *Lemna minor* L. *Acta Physiologiae Plantarum* **30** (6): 881-890.

Tout l'Univers (1981). Grande Encyclopédie de Culture Générale entièrement illustrée en couleurs. *Hachette, Le livre de Paris, France.*

Tripathi B.N., Mehta S.K., Amar A. et Gaur J.P. (2006). Oxidative stress in *Scenedesmus* sp. during short- and long-term exposure to Cu²⁺ and Zn²⁺. *Chemosphere* **62** (4): 538-544.

Tsai Y.C.C., Mueller-Cajar O., Saschenbrecker S., *et al.* (2012). Chaperonin cofactors, Cpn10 and Cpn20, of green algae and plants function as hetero-oligomeric ring complexes. *Journal of Biological Chemistry* **287** (24): 20471-20481.

Turnau K. (1998). Heavy metal content and localization in mycorrhizal *Euphorbia cyparissias* from zinc wastes in southern Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **67** (1): 105-113.

Upson R., Read D.J. et Newsham K.K. (2009). Nitrogen form influences the response of *Deschampsia antarctica* to dark septate root endophytes. *Mycorrhiza* **20** (1): 1-11.

- Vamerali T., Bandiera M. et Mosca G. (2010). Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review. *Environmental Chemistry Letters* **8** (1): 1-17.
- Vandecasteele B., Meers E., Vervaeke P., *et al.* (2005). Growth and trace metal accumulation of two *Salix* clones on sediment-derived soils with increasing contamination levels. *Chemosphere* **58** (8): 995-1002.
- Vanderauwera S., Vandenbroucke K., Inze A., *et al.* (2012). AtWRKY15 perturbation abolishes the mitochondrial stress response that steers osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109** (49): 20113-20118.
- VanderLelie D., Schwitzguebel J.-P., Glass D.J., *et al.* (2001). Assessing phytoremediation's progress in the United States and Europe. *Environmental Science & Technology* **35** (21): 446A-452A.
- Vander Mijnsbrugge K., Beeckman H., De Rycke R., *et al.* (2000). Phenylcoumaran benzylic ether reductase, a prominent poplar xylem protein, is strongly associated with phenylpropanoid biosynthesis in lignifying cells. *Planta* **211** (4): 502-509.
- Vangronsveld J., Herzig R., Weyens N., *et al.* (2009). Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research* **16** (7): 765-794.
- Vanobberghen F. (2011). La phytoremediation en Wallonie. *Kluwer Belgique*.
- Van Tichelen K., Colpaert J. et Vangronsveld J. (2001). Ectomycorrhizal protection of *Pinus sylvestris* against copper toxicity. *New Phytologist* **150** (1): 203-213.
- Vassilev A., Schwitzguebel J.P., Thewys T., *et al.* (2004). The use of plants for remediation of metal-contaminated soils. *The Scientific World Journal* **4** (1): 9-34.
- Vervaeke P., Luyssaert S., Mertens J., *et al.* (2003). Phytoremediation prospects of willow stands on contaminated sediment: a field trial. *Environmental pollution* **126** (2): 275-282.
- Vervaeke P., Tack F.M., Lust N. et Verloo M. (2004). Short- and longer-term effects of the willow root system on metal extractability in contaminated dredged sediment. *Journal of Environmental Quality* **33** (3): 976-83.
- Vetter J. (2005). Mineral composition of basidiomes of *Amanita* species. *Mycological Research* **109** (6): 746-750.
- Villiers F., Ducruix C., Hugouvieux V., *et al.* (2011). Investigating the plant response to cadmium exposure by proteomic and metabolomic approaches. *Proteomics* **11** (9): 1650-1663.
- Vinit-Dunand F., Epron D., Alaoui-Sosse B. et Badot P.-M. (2002). Effects of copper on growth and on photosynthesis of mature and expanding leaves in cucumber plants. *Plant Science* **163** (1): 53-58.
- Vizier J.-F. (1988). La toxicité ferreuse dans les sols de rizières. Importance du problème, causes et mécanismes mis en jeu. Conséquences pour l'utilisation des sols. . In : Raunet M. (ed.) *Bilan hydrique et minéral d'un bas-fond sur les Hautes-Terres de Madagascar : rapport d'avancement Juin 1988*.

Vyslouzilova M., Tlustos P., Szakova J. et Pavlikova D. (2003). As, Cd, Pb and Zn uptake by *Salix* spp. clones grown in soils enriched by high loads of these elements *Plant Soil Environment* **49** (5): 191-196.

Vysloužilova M., Puschenreiter M., Wieshammer G. et Wenzel W.W. (2006). Rhizosphere characteristics, heavy metal accumulation and growth performance of two willow (*Salix x rubens*) clones. *Plant, Soil and Environment - UZPI* **52** (8): 353-361.

Wagner R., Aigner H., Pružinska A., et al. (2011). Fitness analyses of *Arabidopsis thaliana* mutants depleted of FtsH metalloproteases and characterization of three FtsH6 deletion mutants exposed to high light stress, senescence and chilling. *New Phytologist* **191** (2): 449-458.

Wales R., Newman B.J., Pappin D. et Gray J.C. (1989). The extrinsic 33 kDa polypeptide of the oxygen-evolving complex of photosystem II is a putative calcium-binding protein and is encoded by a multi-gene family in pea. *Plant Molecular Biology* **12** (4): 439-451.

Wang W., Tsuneda A., Gibas C.F. et Currah R.S. (2007). *Cryptosporiopsis* species isolated from the roots of aspen in central Alberta: Identification, morphology, and interactions with the host, *in vitro*. *Canadian Journal of Botany* **85** (12): 1214-1226.

Wang J., Li W., Zhang C. et Ke S. (2010). Physiological responses and detoxification mechanisms to Pb, Zn, Cu and Cd in young seedlings of *Paulownia fortunei*. *Journal of Environmental Sciences* **22** (12): 1916-1922.

Weitner A. (2007). These de doctorat : Analyse dendrochimique par spectrométrie de rayonnement X : application à l'étude de la nutrition des arbres et des variations spatiales et temporelles de l'environnement. *UMR Ecologie et Ecophysiologie Forestières INRA-UHP, France*.

Witters N., Van Slycken S., Ruttens A., et al. (2009). Short-Rotation Coppice of Willow for Phytoremediation of a Metal-Contaminated Agricultural Area: A Sustainability Assessment. *Bioenergy Research* **2** (3): 144-152.

Woo E.J., Marshall J., Baully J., et al. (2002). Crystal structure of auxin-binding protein 1 in complex with auxin. *EMBO J* **21**: 2877-2885.

Xia Y., Ning Z., Bai G., et al. (2012). Allelic variations of a light harvesting chlorophyll a/b-binding protein gene (Lhcb1) associated with agronomic traits in barley. *PLoS ONE* **7**: e37573.

Yamamoto Y. (2001). Quality control of photosystem II. *Plant and Cell Physiology* **42** (2): 121-128.

Yamamoto Y., Aminaka R., Yoshioka M., et al. (2008). Quality control of photosystem II: Impact of light and heat stresses. *Photosynthesis Research* **98** (1-3): 589-608.

Yoon J., Cao X., Zhou Q. et Ma L.Q. (2006). Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of the Total Environment* **368** (2-3): 456-64.

Yusuf M., Fariduddin Q., Hayat S. et Ahmad A. (2011). Nickel: An overview of uptake, essentiality and toxicity in plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **86** (1): 1-17.

Zacchini M., Pietrini F., Scarascia Mugnozza G., *et al.* (2009). Metal Tolerance, Accumulation and Translocation in Poplar and Willow Clones Treated with Cadmium in Hydroponics. *Water, Air, and Soil Pollution* **197** (1-4): 23-34.

Zalesny R.S. et Bauer E.O. (2007). Evaluation of *Populus* and *Salix* continuously irrigated with landfill leachate I. Genotype-specific elemental phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation* **9** (4): 281-306.

Zhao J.P. et Su X.H. (2010). Patterns of molecular evolution and predicted function in thaumatin-like proteins of *Populus trichocarpa*. *Planta* **232**: 949-962.

Zhao H., Wu L., Chai T., *et al.* (2012). The effects of copper, manganese and zinc on plant growth and elemental accumulation in the manganese-hyperaccumulator *Phytolacca americana*. *Journal of Plant Physiology* **169** (13): 1243-1252.

Zhou S., Sauve R. et Thannhauser T.W. (2009). Proteome changes induced by aluminium stress in tomato roots. *Journal of Experimental Botany* **60** (6): 1849-1857.

Zoghalmi L.B., Djebali W., Abbas Z., *et al.* (2011). Metabolite modifications in *Solanum lycopersicum* roots and leaves under cadmium stress. *African Journal of Biotechnology* **10** (4): 567-579.