



**HAL**  
open science

# Réponses de plusieurs espèces de mélèzes et du sapin de Douglas aux éléments traces : Étude de mécanismes de tolérance et des capacités d'accumulation

Amandine Bonet

## ► To cite this version:

Amandine Bonet. Réponses de plusieurs espèces de mélèzes et du sapin de Douglas aux éléments traces : Étude de mécanismes de tolérance et des capacités d'accumulation. Sciences de la Terre. Université de Limoges, 2016. Français. NNT : 2016LIMO0018 . tel-01331016

**HAL Id: tel-01331016**

**<https://theses.hal.science/tel-01331016v1>**

Submitted on 13 Jun 2016

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

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

**Université de Limoges**  
**École Doctorale Gay Lussac (ED 523)**  
**LCSN EA 1069**

Thèse pour obtenir le grade de  
**Docteur de l'Université de Limoges**  
Discipline / Spécialité : Sciences pour l'Environnement / Eau, sol et environnement

Présentée et soutenue par  
**Amandine Bonet**

Le 29 Février 2016

**Réponses de plusieurs espèces de mélèzes et du sapin de Douglas  
aux éléments traces**

**Étude de mécanismes de tolérance et des capacités d'accumulation**

Thèse dirigée par : Pr. Vincent Gloaguen ; Dr. Céline Faugeron - Girard et Dr. Gaëlle Saladin

*JURY :*

*Président du jury*

M. Jean Claude Mollet, Professeur, Université de Rouen.

*Rapporteurs*

M. Michel Mench, Directeur de Recherche INRA, Université de Bordeaux.

M. Stanley Lutts, Professeur, Université de Louvain la Neuve.

*Examineurs*

Mme. Marie - Anne Lelu-Walter, Directrice de Recherche INRA, Val de Loire, site Orléans.

M. Vincent Gloaguen, Professeur, Université de Limoges.

Mme. Gaëlle Saladin, Maître de Conférences, Université de Limoges.

Mme. Céline Faugeron, Maître de Conférences, Université de Limoges.



« Un bon scientifique est un détective sur la piste de la nature ».

John Darnton

*La conspiration de Darwin*

« Science sans conscience n'est que ruine de l'âme ».

François Rabelais

*Pantagruel*



## Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à l'aboutissement de ce travail. Tout d'abord, je tiens à adresser mes remerciements à Mr Michel Mench, Directeur de recherche INRA de l'Université de Bordeaux, à Mr Stanley Lutts, Professeur de l'Université de Louvain la Neuve, ainsi qu'à Mme Marie-Anne Lelu-Walter, Directrice de recherche INRA de l'Université d'Orléans et à Mr Jean Claude Mollet, Professeur à l'Université de Rouen qui me font l'honneur d'examiner et de juger ce mémoire.

Mes remerciements s'adressent également au Professeur Vincent Sol, Directeur du LCSN, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et m'avoir permis d'effectuer des stages dans le cadre du Master. Un grand merci au Professeur Vincent Gloaguen, Directeur Adjoint du laboratoire et également co-Directeur de cette Thèse. Je n'oublierai jamais le jour où, alors que j'étais à mille lieues de m'imaginer faire une Thèse, vous m'aviez donné celles de Chris et de Cédric à lire. Vous saviez déjà que la phytoremédiation m'avais passionnée pendant vos cours et que je ne devais plus douter de moi et foncer. Merci également pour votre bonne humeur et votre grand optimisme lorsque le mien flanchait. Un grand merci à ma co-Directrice Céline Faugeron qui malgré mes nombreuses questions sur « l'Univers des parois » a su m'aider à le démystifier ; merci pour ta patience, ta disponibilité et tes conseils qui m'ont aidée à avancer tout au long de ce projet.

Mes plus sincères et profonds remerciements à ma co-Directrice Gaëlle Saladin pour son investissement total et son soutien sans faille, qui a toujours su trouver le temps et le courage de m'accompagner dans ce travail. Tout au long de ce projet, tu m'as apporté tes compétences scientifiques, ton aide, tes idées, tes critiques constructives et ton expérience qui m'ont aidée précieusement à me construire en tant que baby chercheur ; tu m'as également fait confiance et fait partager ta passion pour la recherche, tu as été une oreille attentive et une épaule et tu as su trouver les bons mots dans les moments difficiles, tu es également un vrai modèle « *in vivo* » pour moi, mon Mentor quoi ! La liste est encore longue mais je vais arrêter là car je viens de faire une phrase de 6 lignes sans point qui a le don de t'énervier. Bref, je n'y serais jamais arrivée sans toi ! Merci de m'avoir supportée (dans tous les sens du terme), je te dois beaucoup, alors un énorme BIOCHAR de MERCI à toi ma Chef, ma Boss. Je te remercie de tout cœur pour tout ce que tu m'as transmis, pour tes qualités humaines, pour ton humour aussi perché que le mien et les nombreux fous rires, pour tous ces merveilleux moments partagés au labo, aux broyeurs,

aux congrès, en Belgique, à Périgueux, à l'OB, à la serre...ahhh la serre... ! Tu as ma plus profonde et sincère reconnaissance.

Je n'oublie pas non plus les personnes qui ont accepté avec beaucoup de gentillesse de m'aider sur différents points de ma Thèse. Mes très sincères remerciements vont à Monsieur Stanley Lutts et son équipe pour leur contribution dans ce travail dans la quantification des polyamines ; cette collaboration fût très agréable autant humainement que scientifiquement. Un grand merci à Madame Marie-Anne Lelu-Walter qui nous a, à plusieurs reprises, gracieusement fourni des masses proembryogènes de mélèze et apporté sa collaboration et de nombreux conseils en culture *in vitro*. J'adresse aussi un grand merci à Damien Guillaumot pour son aide sur les extractions de protéines cytosoliques et pariétales ainsi qu'à Catherine Riou pour ses nombreux conseils scientifiques, sa bonne humeur rayonnante et ses talents de siffleuse qui m'ont bercée tout au long de ma Thèse. Merci aussi à Monsieur Phillippe Bressollier pour son aide en HPLC et les connaissances qu'il m'a apportée dans ce domaine. J'ai également une attention particulière pour Maryline Soubrand, Emmanuel Joussein, Grégoire Pascaud et Patrice Fondanèche quant à leur contribution scientifique et technique en étude de sol et en SAA. Merci aussi, à Evelyne Poli pour son enthousiasme, sa gentillesse, son implication et surtout sa grande patience à m'expliquer le fonctionnement de l'IR et à m'aider pour les tests que j'ai pu réaliser avec cet appareil.

Mes remerciements s'adressent également à Nicolas Genevois, mon petit goret de compagnie, pour avoir veillé et contribué à mon engraissement passif tout au long de cette Thèse avec ses petits gâteaux faits maisons, et également pour avoir partagé toutes ses denrées avec moi. Merci pour ton soutien sans faille et nos moments de réflexion scientifique « phytoremédiation » ainsi que pour ton aide précieuse en SAA ; merci d'avoir partagé tes astuces de Mc Gyver avec moi et de m'avoir aidée à être moins médiévale en informatique... Je n'oublierai jamais tous ces week-ends et soirées de rédaction au labo si romantiques à boire des litres de thé bio ! Et puis évidemment, un grand merci à Christelle Gady, ma Cricri, pour toutes ses attentions au quotidien, pour sa bonne humeur et son soutien dans les bons comme dans les mauvais moments, pour son investissement et son aide précieuse dans mes manipes pas toujours agréables à faire. Désolée de t'avoir infligé ces longs moments de solitude et pour toutes les séquelles occasionnées... Impossible de ne pas avoir le sourire rien qu'en repensant à tout ce que Gaëlle, Nicolas, toi et moi avons partagé dans cette aventure : Guppies Team Forever !

Mes très sincères et amicaux remerciements à mes collègues Romain, Zineb, Claire, Manon, Dorothée, Michèle, Olivier, Guillaume, Amandine (alias Maïté), Mohammad, Salim, ShiShi, Mac, pour leur compagnie et leur bonne humeur au quotidien ! Grâce à vous, ces années se sont déroulées dans un cadre de travail agréable. J'ai rencontré beaucoup de personnes qui m'ont apporté du réconfort par les discussions, les rires, les barbecues, les pauses café et cigarettes. La Thèse est également une aventure humaine ! Merci à *Cedricus Caius* pour ses nombreux coups de mains techniques, scientifiques et tous les festins TRGiens et les mots fléchés résolus à la pause déjeuner. Merci à toi ma Rézazguette pour tout ce que tu as fait pour moi, toujours avec cœur et générosité, pour ton aide précieuse en chimie et ta patience « supraporphirique », car avec moi tu as eu pas mal de boulot ! Tu as toujours les « mots clés » pour me soutenir, m'encourager et ne rien lâcher quelle que soit la difficulté. Merci à Audrey, Rachida, Florent, Frédo, Sarah et Emilie pour leurs regards attentifs et bienveillants, leurs sourires et leur soutien moral et scientifique au quotidien. Une énorme pensée et un gros merci à toi ma Jiji pour m'avoir plus que supportée et soutenue, pour tous ces bons moments et ces soirées à refaire le monde, à « tripper » science, à débattre sur tout et rien à la fois, merci pour tous ces gros « hugs » au quotidien et les fractures osseuses occasionnées, merci pour ta présence chaleureuse et ces beaux voyages. Et puis merci à toi mon mignonnet pour ta bienveillance constante, ta douceur apaisante et tes encouragements permanents, sache que mon coffre sera toujours grand ouvert pour toi ! Un gros ronron de merci à mes petits chatons de Bonnac pour le couvert, l'hébergement et surtout le soutien et les bons moments partagés ensemble au quotidien. Enfin, mes pensées sont pour toi Catherine Jumarie, car si je suis arrivée jusqu'ici c'est en grande partie grâce à toi. J'ai fait mes premiers pas dans la recherche à tes côtés et je ne t'en remercierai jamais assez...

MERCI à mes parents et à mon frère qui m'ont toujours soutenue dans mes aventures et qui ont toujours cru en moi. Même si par moment je les perdais en cours de route, ils ont toujours essayé de comprendre « ce que je faisais exactement » ! Vous avez toujours été là pour moi, j'ai enfin fini par passer à travers toutes ces années d'études, enfin je l'espère car vous me connaissez bien, quand on croit que c'est fini et bien non, y'en a encore ! Une pensée pour mon Elodo Patricia, loin des yeux mais jamais du cœur mais surtout un gros gros merci à toi ma Dédé qui a supporté mes changements d'humeur, mes coups de blues, mes moments de doute ; tu as toujours su m'apporter ce réconfort unique et ces mots magiques qui apaisent. Merci pour ton soutien indéniable et toutes ces jolies attentions au quotidien. Et bien évidemment, merci à toi mon Loulou pour tes nombreux conseils scientifiques (et pas que),



pour ta patience et ton implication dans tous les domaines de ma vie, nous avons eu la preuve que la distance n'altère en rien la qualité de notre amitié qui m'est extrêmement précieuse.

J'espère que ce travail est à la hauteur de votre confiance et de vos sentiments à mon égard. Qu'il me soit aussi permis d'associer à ces remerciements toutes les personnes non citées qui, d'une façon ou d'une autre ont participé à mes travaux. Parfois, un sourire, un café ou une cigarette partagés le temps d'un cours moment suffisent à rebooster la machine !

## Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>





# **SOMMAIRE**



# SOMMAIRE

## ABRÉVIATIONS

## LISTE DES TABLEAUX

## LISTE DES FIGURES

## LISTE DES COMMUNICATIONS

## INTRODUCTION GÉNÉRALE.....1

## INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....7

## **Première partie : La contamination métallique des sols et les méthodes de dépollution par phytoremédiation.....7**

### **I. Les ET dans les sols.....7**

1. Localisation des ET dans les constituants du sol.....8

2. Utilisations des ET et origines des pollutions métalliques.....9

### **II. Surveillance des sols pollués.....12**

1. Organismes français.....12

2. Bases de données nationales concernant les sites pollués.....13

3. Base de données et organismes européens.....15

### **III. Contexte réglementaire des sols pollués.....15**

1. Distinction entre sol contaminé et sol pollué.....15

2. Les sols pollués face au droit français : une législation encore opaque.....16

### **IV. Évaluation du degré de contamination d'un sol : une tâche complexe.....17**

1. Des valeurs seuils difficiles à apprécier.....17

2. Risques de transferts entre les différents constituants du sol et les organismes vivants.....19

### **V. Impact des ET sur la santé humaine.....20**

1. De leur émission à l'exposition des organismes vivants.....20

2. Effets toxicologiques des ET et valeurs toxicologiques de référence (VTR).....21

### **VI. La phytoremédiation des ET : une technologie alternative de dépollution des sols.....23**

1. Contexte, enjeux et méthodes de dépollution des sols.....23

2. La phytoremédiation, une alternative plus écologique à la dépollution des sols.....24

2.1. Principe général.....24

2.2. La phytoremédiation en France et en Europe.....25

2.3. Possibilités d'application.....	26
2.3.1. Application <i>in situ</i> .....	26
2.3.2. Application <i>ex situ</i> .....	26
3. Les différents procédés de phytoremédiation.....	27
3.1. La phytostabilisation.....	28
3.2. La phytodégradation.....	30
3.3. La phytovolatilisation.....	30
3.4. La phytoaccumulation ou phytoextraction.....	31
3.4.1. Phytoextraction assistée.....	32
3.4.2. Phytoextraction continue.....	36
3.4.3. Évaluation de la performance de la phytoextraction.....	37
3.4.4. Valorisation de la biomasse issue de la phytoextraction.....	37
4. Avantages et limites de la phytoremédiation.....	40
4.1. Avantages.....	40
4.2. Limites et contraintes.....	41

## **Deuxième partie : Toxicité des ET et mécanismes de tolérance**

### **des végétaux.....43**

#### **I. Effet toxiques des ET et tolérance des plantes.....43**

1. Phytotoxicité des ET.....	43
1.1. Effets des ET sur la croissance.....	44
1.2. Altération d'activités enzymatiques.....	46
1.3. ET et stress oxydant.....	46
2. Les plantes tolérantes aux pollutions métalliques.....	49

#### **II. Les différents paramètres contribuant à l'absorption racinaire.....52**

1. La spéciation : un paramètre capital à l'absorption des ET.....	52
2. Amélioration de la phytodisponibilité des ET.....	54
2.1. Par les plantes.....	55
2.2. Par les micro-organismes du sol.....	55

#### **III. Mécanismes d'absorption racinaire, de transport et d'accumulation des ET dans la plante.....57**

1. Transport transmembranaire.....	58
2. Translocation des ET vers les parties aériennes.....	61
3. Répartition des ET à l'échelle de la plante entière.....	63

#### **IV. Compartimentation des ET au niveau intracellulaire.....65**

1. Association des ET à divers ligands.....	65
---	----

1.1. Les acides organiques.....	65
1.2. Les acides aminés libres et leurs dérivés.....	67
1.2.1. L'histidine.....	67
1.2.2. La proline.....	68
1.2.3. La nicotianamine.....	69
1.3. Les oligopeptides riches en cystéine.....	70
1.3.1. Le glutathion.....	71
1.3.2. Les phytochélatines.....	72
1.4. Les polyamines libres.....	73
1.5. Les protéines chaperonnes.....	77
2. Séquestration dans la vacuole et devenir du complexe ET – ligand.....	79
3. Autres lieux de séquestration des ET.....	81
<b>V. Compartimentation des ET au niveau pariétal.....</b>	<b>82</b>
1. Structure de la paroi.....	82
2. Principaux constituants de la paroi.....	85
2.1. Les polysaccharides.....	85
2.1.1. La cellulose.....	85
2.1.2. Les hémicelluloses.....	86
2.1.3. Les pectines.....	87
2.1.3.1. Le domaine homogalacturonane.....	88
2.1.3.2. Le domaine rhamnogalacturonane de type I.....	89
2.1.3.3. Le domaine rhamnogalacturonane de type II.....	89
2.1.4. Biosynthèse des polysaccharides pariétaux.....	91
2.2. Les lignines.....	92
2.3. Les protéines pariétales.....	94
2.3.1. Les protéines structurales.....	94
2.3.2. Les enzymes.....	95
2.4. Autres composés pariétaux.....	100
3. Piégeage pariétal des ET.....	101
3.1. Niveau d'efficacité de piégeage.....	101
3.2. Les composés pariétaux fixant les ET.....	101
3.3. Modifications quantitatives de la paroi en réponse aux ET.....	102
3.4. Modifications qualitatives de la paroi en réponse aux ET.....	103



## **Troisième partie : Objectifs, présentation des ET et des modèles**

### **végétaux sélectionnés et démarche expérimentale.....107**

#### **I. Objectifs généraux.....107**

#### **II. Présentation des ET retenus pour l'étude.....108**

##### 1. Présentation du cadmium et de ses effets sur les plantes..... 108

###### 1.1. Généralités.....108

###### 1.2. Utilisations et principales sources d'émissions.....109

###### 1.3. Toxicité connue vis-à-vis des plantes.....110

##### 2. Cas d'une pollution multi-métallique.....111

#### **III. Intérêt des espèces ligneuses pour la phytoaccumulation.....114**

##### 1. Les arbres hyperaccumulateurs d'ET.....114

##### 2. Les conifères : des candidats intéressants pour la phytoextraction ?.....117

##### 3. Effets des ET sur les conifères.....118

###### 3.1. Effets sur la croissance et le développement.....118

###### 3.2. Défense des conifères face au stress oxydant.....119

#### **IV. Présentation des conifères sélectionnés.....120**

##### 1. Le Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco).....121

##### 2. Les mélèzes.....122

###### 2.1. Le mélèze d'Europe (*Larix decidua* Mill.).....123

###### 2.2. Le mélèze du Japon (*Larix kaempferi* (Lamb.) Carrière).....124

###### 2.3. Le mélèze hybride (*Larix x eurolepis* Henry).....125

###### 2.4. Bilan comparatif des trois espèces de mélèze.....127

#### **V. Démarche expérimentale.....128**

##### 1. Présentation des types de culture et intérêts.....128

###### 1.1. Culture *in vitro*.....128

###### 1.2. Germinations en serre.....129

###### 1.3. Arbres en serre.....130

##### 2. Relation entre les modèles et les objectifs recherchés.....130

## **MATÉRIELS ET MÉTHODES.....135**

### **I. Matériel végétal et traitements.....135**

#### 1. Etapes de culture *in vitro* du modèle mélèze hybride.....135

##### 1.1. Prolifération.....136

##### 1.2. Maturation des embryons somatiques.....136

##### 1.3. Germination et croissance des plantules.....137

##### 1.4. Exposition des plantules au cadmium.....137

2. Germination des graines de mélèzes et de Douglas et semis sous serre.....	138
2.1 Origine des graines.....	138
2.1.1. Mélèzes d'Europe et du Japon.....	138
2.1.2. Douglas.....	138
2.2. Stratification des graines.....	139
2.2.1. Mélèzes d'Europe et du Japon.....	139
2.2.2. Douglas.....	139
2.3. Conditions de culture et récolte des plantules exposées au cadmium.....	140
2.4. Conditions de culture et récolte des plantules de Douglas ayant poussé sur des sols issus d'anciens sites miniers.....	141
3. Culture sous serre de mélèzes âgés de 2 ans.....	141
3.1. Origine des mélèzes.....	141
3.2. Conditions de culture, traitements et récoltes.....	142
<b>II. Paramètres d'évaluation du métabolisme carboné.....</b>	<b>143</b>
1. Dosage des pigments photosynthétiques.....	143
2. Dosage de l'amidon.....	144
3. Dosage des glucides solubles totaux.....	144
<b>III. Paramètres d'évaluation du métabolisme azoté.....</b>	<b>145</b>
1. Dosage des acides aminés libres totaux.....	145
2. Dosage de la proline libre.....	145
3. Dosage des protéines solubles totales.....	146
<b>IV. Évaluation du niveau d'oxydation (dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique).....</b>	<b>146</b>
<b>V. Dosage de molécules intracellulaires impliquées dans le piégeage du cadmium.....</b>	<b>147</b>
1. Dosage des groupes thiols totaux non protéiques.....	147
2. Dosage des polyamines libres.....	148
2.1. Extraction.....	148
2.2. Dansylation.....	148
3. Caractérisation et quantification.....	150
<b>VI. Extraction des protéines intracellulaires et pariétales et dosage de l'activité pectine méthylestérase.....</b>	<b>151</b>
1. Extraction des protéines intracellulaires.....	151
2. Extraction des protéines pariétales.....	151
3. Dosage de l'activité pectine méthylestérase.....	152
3.1. Réaction enzymatique.....	152
3.2. Dosage du méthanol.....	152

<b>VII. Extraction et quantification des constituants pariétaux.....</b>	<b>154</b>
1. Protocole général d'extraction des pectines.....	154
1.1. Extraction par l'éthanol.....	155
1.2. Élimination de l'amidon.....	155
1.3. Extraction séquentielle des pectines.....	155
2. Méthode d'analyse des glucides.....	156
2.1. Dosages colorimétriques.....	156
2.1.1. Dosage des oses neutres au phénol sulfurique.....	156
2.1.2. Dosage des acides uroniques.....	156
2.1.3. Méthode de correction pour quantifier les oses neutres et les acides uroniques.....	156
2.2. Détermination de la composition monosaccharidique par chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	157
2.2.1. Préparation des échantillons.....	157
2.2.2. Méthanolyse.....	157
2.2.3. Triméthylsilylation.....	158
2.2.4. Identification et quantification par CPG des méthylglycosides Triméthylsilylés.....	159
2.3. Évaluation du degré de méthylestérification des pectines par le dosage du méthanol.....	159
2.4. Évaluation du degré de méthylestérification des pectines par infrarouge.....	160
<b>VIII. Dosage du cadmium dans les plantes et les substrats de culture.....</b>	<b>161</b>
1. Préparation des échantillons.....	161
1.1. Obtention des fractions intracellulaires et pariétales.....	161
1.2. Obtention des différentes fractions du sol.....	162
1.2.1. Extraction au CaCl <sub>2</sub> .....	162
1.2.2. Extraction au Rhizo-A.....	163
1.2.3. Extraction par l'EDTA.....	163
2. Méthodes de minéralisation.....	163
2.1. Minéralisation micro-ondes.....	163
2.2. Micro-minéralisation.....	164
3. Dosage des ET par spectrométrie d'absorption atomique.....	165
3.1. Dosage du Cd en mode flamme.....	165
3.2. Dosage du Cd, de l'As, du Pb et de Sb en mode four.....	165
4. Détermination des teneurs totales en As, Pb et Sb des sols par spectrométrie de fluorescence à rayons X.....	166
<b>IX. Analyses statistiques.....</b>	<b>166</b>

**RÉSULTATS ET DISCUSSION.....171**

**Chapitre 1 : Réponses du mélèze hybride cultivé *in vitro***

**et exposé au cadmium.....175**

Publication n°1 : **Physiological responses of the hybrid larch**

**(*Larix x eurolepis* Henry) to cadmium exposure and distribution**

**of cadmium in plantlets.....177**

**Interprétation et discussion des principaux résultats obtenus.....195**

**Chapitre 2 : Réponses au cadmium du sapin de Douglas et de**

**trois espèces de mélèzes cultivés en serre.....201**

**RESULTATS - *Première partie***

**Distribution du Cd dans les différents organes et comparaison**

**du potentiel de phytoextraction entre les espèces.....203**

**I. Comparaison entre les plantules de Douglas et deux espèces de mélèzes.....203**

1. Effets du Cd sur la croissance.....203

2. Répartition du Cd dans les différents organes.....206

**II. Comparaison entre trois espèces de mélèzes avec le modèle « arbre ».....208**

Publication n°2: **Cadmium distribution in three larch species and**

**comparison of phytoextraction efficiency.....209**

**Synthèse des principaux résultats obtenus.....227**

**RESULTATS - *Deuxième partie***

**Identification de composés potentiellement impliqués dans le piégeage du Cd....229**

**I. Piégeage du Cd au niveau intracellulaire.....229**

1. Effet du Cd sur la production des thiols totaux non protéiques.....229

2. Effet du Cd sur la teneur en polyamines.....230

**II. Adsorption du Cd au niveau pariétal.....231**

1. Optimisation de l'extraction des pectines pour des échantillons disponibles en faible quantité.....232

1.1. Estimation du rendement en pectines extraites.....232

1.2. Analyse qualitative des pectines extraites.....235

2. Effet du Cd sur la composition pectique des écorces et du bois néoformés.....237

2.1. Effet du Cd sur la teneur en pectines et leur pourcentage d'acides uroniques.....	237
2.1.1. Etude des fractions pectiques issues des écorces.....	237
2.1.2. Etude des fractions pectiques issues du bois.....	240
2.2. Effet du Cd sur la composition monosaccharidique des pectines.....	243
2.2.1. Etude des fractions pectiques issues des écorces.....	243
2.2.2. Etude des fractions pectiques issues du bois.....	246
3. Détermination du DME des fractions pectiques.....	249
3.1. Résultats obtenus par la méthode de dosage colorimétrique du méthanol.....	249
3.2. Résultats obtenus par la méthode infrarouge.....	251
4. Effet du Cd sur l'activité PME.....	256

## **DISCUSSION - Première partie**

### **Effet du Cd sur la croissance des conifères et la distribution de l'ET.....259**

#### **I. Le Cd affecte peu la croissance et le développement des plantules et des arbres.....259**

#### **II. Comparaison de l'efficacité de phytoextraction du Cd.....262**

##### 1. Comparaison entre les différentes espèces de plantules.....262

##### 2. Comparaison entre les différentes espèces d'arbres.....263

##### 3. Comparaison des capacités d'extraction du Cd entre les différents modèles.....266

## **DISCUSSION - Deuxième partie**

### **Réponses physiologiques à l'exposition au Cd : stratégies mises en**

### **place pour tolérer le stress métallique.....269**

#### **I. Stratégies mises en place au niveau intracellulaire.....269**

#### **II. Stratégies mises en place au niveau extracellulaire.....271**

##### 1. Régulation de l'activité PME.....271

##### 2. Adsorption du Cd par les pectines.....273

###### 2.1. Effet du Cd sur les écorces néoformées.....273

###### 2.2. Effet du Cd sur le bois néoformé.....276

## **Chapitre 3 : Réponses de plantules de Douglas cultivées sur**

## **des sols contaminés provenant d'anciens sites miniers.....283**

Publication n°3: **Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) plantlets responses**

### **to As, Pb and Sb-contaminated soils from former mines.....285**

### **Interprétation et discussion des principaux résultats obtenus.....303**

<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>309</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>321</b>
<b>SITES INTERNET.....</b>	<b>375</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>379</b>



## ABREVIATIONS

<b>2,4-D</b>	acide 2,4 - dichlorophénoxy acétique
<b>ABA</b>	acide abscissique
<b>Abs</b>	absorbance
<b>ACN</b>	acétonitrile
<b>AcOg</b>	acide organique
<b>ADC</b>	arginine décarboxylase
<b>ADP</b>	adénosine diphosphate
<b>AGPs</b>	arabinogalactan proteins ou protéines à arabinogalactanes
<b>AIB</b>	acide indole butyrique
<b>AIH</b>	agmatine iminohydrolase
<b>AO</b>	alcool oxydase
<b>APX</b>	ascorbate peroxydase
<b>Ara</b>	arabinose
<b>AsV</b>	arsenate
<b>AsIII</b>	arsenite
<b>ASS</b>	acide sulfosalicylique
<b>ATB</b>	acide 2-thiobarbiturique
<b>ATP</b>	adénosine triphosphate
<b>ATR</b>	attenuated total reflection (réflexion totale atténuée)
<b>AU</b>	acide uronique
<b>BAP</b>	benzylAminoPurine
<b>BDGSE</b>	Base de Données Géographique des Sols d'Europe
<b>BSA</b>	albumine de sérum bovin
<b>BTEX</b>	benzène, toluène, ethylbenzène, xylène
<b>CA</b>	milieu de maturation
<b>CAX</b>	Calcium Antiporter eXchanger
<b>CCH</b>	Copper CHaperone
<b>CCS</b>	Copper Chaperone for Superoxide dismutase
<b>CDF</b>	protéine Cation Diffusion Facilitator
<b>CEC</b>	capacité d'échange cationique
<b>CESA</b>	cellulose synthase
<b>CIV</b>	culture <i>in vitro</i>
<b>CLPH</b>	chromatographie liquide haute performance
<b>CNGC</b>	Cyclinc Nucleotide Gate Channel
<b>COPT</b>	protéine COPper Transporter
<b>COX</b>	Cytochrome OXYdase
<b>CPG</b>	chromatographie en phase gazeuse
<b>Cys</b>	cystéine
<b>DC</b>	division cellulaire
<b>Dha</b>	acide 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosarique (Dha)
<b>DME</b>	degré de méthylestérification



<b>DMSO</b>	diméthylsulfoxyde
<b>DO</b>	densité optique
<b>DP</b>	degré de polymérisation
<b>DTNB</b>	acide 5,5'-dithiobis-2-nitro-benzoïque
<b>DTPA</b>	acide diéthylène triamine penta-acétique
<b>DTT</b>	dithiothréitol
<b>γ-EC</b>	γ-glutamylcystéine
<b>γ-ECS</b>	γ-glutamylcystéine synthétase
<b>EDDS</b>	éthylène diamine disuccinate
<b>EDTA</b>	éthylène diamine tetra acetic acid (acide Ethylène Diamine Tétra Acétique)
<b>EGTA</b>	éthylène glyco-O,O'-bis-[2-amino-ethyl]-N,N,N',N',-tetra acetic acid
<b>ERO</b>	espèces réactives de l'oxygène
<b>ET</b>	éléments traces
<b>FBC</b>	facteur de bioconcentration
<b>FPGN</b>	fond pédogéologique naturel
<b>FT</b>	facteur de translocation
<b>Fuc</b>	fucose
<b>Gal</b>	galactose
<b>Gal.A</b>	acide galacturonique
<b>GCS</b>	glutamylcystéine synthétase
<b>GH</b>	glycosyl-hydrolase
<b>Glc</b>	glucose
<b>Glc. A</b>	acide glucuronique
<b>GPX</b>	glutathion peroxydase
<b>GRPs</b>	protéines riches en glycine ou glycine-rich protein
<b>GS</b>	glutathion synthétase
<b>GSH</b>	glutathion (forme réduite)
<b>GST</b>	glutathion-S-transférase
<b>GT</b>	glycosyl-transférase
<b>HAP</b>	hydrocarbures aromatiques polycycliques
<b>HEPPS</b>	acide sulfonique -4-(2-hydroxyethyl)-piperazine-1-propane
<b>HG</b>	homogalacturonane
<b>HMA</b>	heavy metal ATPases
<b>HMT</b>	heavy metal tolerance
<b>HMW</b>	high molecular weight
<b>HPLC</b>	high pressure liquid chromatography (chromatographie liquide à haute pression)
<b>HSPs</b>	heat shock proteins
<b>HTC</b>	hydroxycinnamoyl transferases
<b>IRT</b>	iron regulated transporter
<b>ISDI</b>	installations de stockage de déchets inertes
<b>ISDND</b>	installations de stockage de déchets non dangereux
<b>Kdo</b>	acide 3-deoxy-D-manno-octulosonique
<b>LCT</b>	low affinity Cation Transporter

<b>LMW</b>	low molecular weight
<b>Man</b>	mannose
<b>MB</b>	milieu de base
<b>MDA</b>	malondialdéhyde
<b>ME</b>	mélèze d'Europe
<b>MF</b>	matière fraîche
<b>MH</b>	mélèze hybride
<b>m-HDP</b>	méta-hydroxydiphényle
<b>MJ</b>	mélèze du Japon
<b>MRP</b>	multidrug resistance associated-proteins
<b>MS</b>	matière sèche
<b>MT</b>	métallothionéine
<b>NA</b>	nicotianamine
<b>NAC</b>	N-acétylcystéine
<b>NADH</b>	nicotinamide adénosine dinucléotide (forme réduite)
<b>NADPH</b>	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
<b>NAS</b>	nicotianamine synthase
<b>NBD</b>	nucleotide binding domain
<b>NCPAH</b>	N-carbamoylputrescine amidohydrolase
<b>NIPs</b>	nodulin26-like intrinsic proteins
<b>Nramp</b>	natural resistance-associated macrophage protein
<b>NTA</b>	acide nitrilotri-acétique
<b>ODC</b>	ornithine décarboxylase
<b>OPT</b>	oligopeptide transporters
<b>ON</b>	oses neutres
<b>P</b>	phosphore
<b>PA</b>	parties aériennes
<b>PAST</b>	PAleontological STatistics
<b>PCs</b>	phytochélatines
<b>PCB</b>	polychlorobiphényles
<b>PCy</b>	plastocyanine
<b>PC(s)</b>	phytochélatine(s)
<b>PCS</b>	phytochélatine synthase
<b>PCy</b>	plastocyanine
<b>PEC</b>	pectines extraites à l'eau chaude
<b>PEP</b>	phosphoenol pyruvate
<b>PME</b>	pectine méthylestérase
<b>POxa</b>	pectines extraites à l'oxalate d'ammonium
<b>PRPs</b>	protéines riche en proline ou proline-rich proteins
<b>PS</b>	parties souterraines
<b>Put</b>	putrescine
<b>PVPP</b>	polyvinylpyrrolidone
<b>RG-I</b>	rhamnogalacturonane I
<b>RG-II</b>	rhamnogalacturonane II

<b>Rha</b>	rhamnose
<b>RuBP</b>	ribulose 1,5-biphosphate
<b>SAA</b>	spectométrie d'absorption atomique
<b>SAM</b>	S-adenosylméthionine
<b>SAMDC</b>	S-adenosylméthionine décarboxylase
<b>SOD</b>	superoxyde dismutase
<b>Spd</b>	spermidine
<b>SPDS</b>	spermidine synthase
<b>Spm</b>	spermine
<b>SPMS</b>	spermine synthase
<b>ST</b>	sucres totaux
<b>T°(A)</b>	temperature ambiante
<b>TAH</b>	teneur agricole habituelle
<b>TBARS</b>	acide thiobarbiturique
<b>TCA</b>	acide trichloroacétique
<b>TCA'</b>	tolerable concentration in air (concentration tolerable dans l'air)
<b>TCE</b>	trichloroéthylène
<b>TFA</b>	acide trifluoroacétique
<b>TNB</b>	acide 5-thio-2-nitrobenzoïque
<b>TNP</b>	thiols non protéiques
<b>SISE</b>	Système d'Information des Sols d'Europe
<b>VTR</b>	valeur toxicologique de référence
<b>XG</b>	xyloglucanes
<b>XRF</b>	analyse par fluorescence à rayons X
<b>Xyl</b>	xylose
<b>YSL</b>	protein Yellow Stripe Like
<b>ZIP</b>	zinc regulated transporter - iron regulated transporter-like protein
<b>ZRT</b>	zinc regulated transporter

### **Agences et Organismes agréés**

<b>ADEME</b>	Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
<b>AEE</b>	Agence Européenne de l'Environnement
<b>ANR</b>	Agence Nationale de la Recherche
<b>ATSR</b>	Agency for Toxic Substance and Disease Registry (Agence d'enregistrement des substances toxiques et des maladies) (Etats Unis)
<b>BRGM</b>	Bureau de Recherches Géologiques et Minières
<b>CEN</b>	Comité Européen de Normalisation
<b>CIRC</b>	Centre Internationale de Recherche sur le Cancer)
<b>CGDD</b>	Commissariat général au développement durable
<b>COST</b>	Coopération européenne dans le domaine de la Recherche Scientifique et Technique
<b>DRIRE</b>	Direction Régionale de l'Industrie, de la Recherche et de l'Environnement

<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture)
<b>FPGN</b>	Fond Pédogéochimique Naturel
<b>ICPE</b>	Installation Classée pour l'Environnement
<b>IDF</b>	Institut pour le Développement Forestier
<b>INERIS</b>	Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
<b>INRA</b>	Institut National de la Recherche Agronomique
<b>InVS</b>	Institut National de Veille Sanitaire
<b>IRD</b>	Institut de recherche pour le développement
<b>IRSN</b>	Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire
<b>ISO</b>	Organisme International de Normalisation
<b>LCSN</b>	Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles
<b>MEDD</b>	Ministère de l'Écologie et du Développement Durable
<b>OEHHA</b>	Office of Environmental Health Hazard Assessment (États Unis)
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>ONF</b>	Office National des Forêts
<b>RIVM</b>	Institut national de la santé publique et de l'environnement (Pays Bas)
<b>RME</b>	Institut français « Risques Majeurs et protection de l'Environnement »
<b>SEPA</b>	State Environment Protection Administration (Agence chinoise de protection de l'environnement)
<b>US EPA</b>	United States Environmental Protection Agency (Agence de protection de l'environnement des Etats-Unis)



# LISTE DES TABLEAUX

<b>Numéro</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
1	Utilisation actuelle courante des métaux dans l'industrie.	9
2	Pourcentage de contribution des différentes sources d'enrichissement des sols en certains ET.	11
3	Valeur limite de concentration en certains ET dans les sols d'après l'arrêté du 8 Janvier 1998, basé sur la norme AFNOR NFU 44-041 de 1985.	17
4	Concentrations limites admissibles des ET (mg. kg <sup>-1</sup> ) dans les sols selon les différents pays et / ou organismes.	18
5	Teneurs moyennes ubiquitaires de différents ET dans les sols français.	19
6	Liste non exhaustive de quelques effets toxiques de certains ET sur la santé humaine.	21
7	VTR des effets à seuil de certains ET.	22
8	Exemples de divers amendements chimiques employés en phytoaccumulation aidée.	34
9	Effets du pH et du potentiel d'oxydo-réduction sur la mobilité des ET du sol.	53
10	Texture du sol en fonction de la taille des particules qui le constitue.	54
11	Liste non exhaustive des éléments en compétition avec les ET au niveau du transport membranaire et type de transport associé aux ET.	58
12	Classification des métallothionéines.	78
13	Comparaison de la concentration en ET dans les organes aériens d'arbres et d'herbacées hyperaccumulant des ET.	115
14	Espèces ligneuses hyperaccumulatrices d'au moins un ET.	116
15	Comparaison de l'adaptabilité du mélèze d'Europe, du mélèze du Japon et du mélèze hybride à la réserve en eau du sol adaptée au cas du Limousin.	127
16	Comparaison qualitative des principales caractéristiques des trois espèces de mélèze.	127

17	Tableau résumant l'origine des graines et des jeunes arbres des trois espèces de mélèzes.	142
18	Programme d'élution des échantillons de polyamines dansylées.	151
19	Paramètres utilisés pour le dosage du Cd, de l'As, du Pb et de Sb par spectroscopie d'absorption atomique en mode four.	166
20	Pourcentage moyen de matière sèche dans les différents organes des plantules.	206
21	Comparaison de la quantité moyenne de Cd accumulée par plantule dans les différents organes et pourcentage de répartition du Cd.	208

**Publication 2: Cadmium distribution in three larch species and comparison of phytoextraction efficiency.**

	<b>1. Concentration of Cd in soil and bioavailability as a function of time and Cd treatment.</b>	215
	<b>2. Dry weight of underground and aerial organs in larches exposed or not to Cd for one growing season.</b>	217
	<b>3. Concentration of Cd in organs of hybrid larch (HL), European larch (EL) and Japanese larch (JL) after 9 months of exposure to Cd.</b>	219
	<b>4. Comparison of efficiency between hybrid larch (HL), European larch (EL) and Japanese larch (JL) for Cd phytoextraction after 9 months of exposure.</b>	221
22	Degré de méthylestérification (DME) des pectines extraites des écorces des trois espèces de mélèze.	249
23	Degré de méthylestérification (DME) des pectines extraites du bois des trois espèces de mélèze.	250
24	Comparaison des paramètres évalués en phytoextraction entre les plantules de Douglas et de MJ.	262
25	Comparaison des paramètres évalués en phytoextraction entre les différentes espèces d'arbres en serre.	264
26	Comparaison des paramètres évalués en phytoextraction entre le modèle plantule et le modèle arbre d'une même espèce pour le Douglas et le MJ.	267

27	Tableau récapitulatif des changements quantitatifs et qualitatifs observés sur les PEC et les POxa issues des écorces des 3 espèces de mélèzes suite à une exposition au Cd.	275
28	Tableau récapitulatif des changements quantitatifs et qualitatifs observés sur les PEC et les POxa issues du bois de 3 espèces de mélèzes suite à une exposition au Cd.	277
<b>Publication 3: Douglas fir (<i>Pseudotsuga menziesii</i>) plantlets responses to As, Pb and Sb-contaminated soils from former mines.</b>		
	1. Physicochemical characteristics of both composite soils in the selected zones L1, L2 and P.	291
	2. Effect of TE on Douglas fir growth.	293
	3. Accumulation and distribution of As, Pb and Sb in Douglas firs. Seeds were sown on soils from L1, L2 and P and plantlets were harvested ten weeks later.	296
29	Liste des produits	391





## LISTE DES FIGURES

Numéro	Titre	Page
1	Localisation des ET dans le sol.	8
2	Origine des ET dans le sol.	10
3	Présence globale des différents contaminants identifiés dans les sols français indiqués par le MEDDE.	14
4	Procédés de phytoremédiation.	28
5	Schéma représentant les deux stratégies de phytoaccumulation : la phytoextraction continue et la phytoextraction induite par des chélateurs.	32
6	Formules chimiques de deux phytosidérophores : les acides avénique et mugénique.	35
7	Valorisation post-récolte des plantes utilisées pour la phytoextraction d'ET.	39
8	Sites de production des formes réactives de l'oxygène (ERO) dans la cellule végétale.	47
9	Intermédiaires réduits de l'oxygène.	47
10	Familles de transporteurs impliqués dans l'absorption des principaux métaux essentiels au développement des plantes.	59
11	Transport radial dans la racine.	62
12	Formules semi-développées de deux acides organiques : l'acide oxalique et l'acide malique.	66
13	Formules semi-développées de l'histidine, de la nicotinamine et de la proline.	67
14	Formules semi-développées du glutathion et des phytochélatines.	71
15	Représentation schématique illustrant la voie de biosynthèse du glutathion (GSH) à partir de ses acides aminés constitutifs.	71
16	Illustration de la voie de biosynthèse des PCs.	73
17	Modèle du complexe entre l'ion $Cd^{2+}$ et une molécule de PC ( $n = 2$ ).	73

18	Formules semi-développées de la putrescine, de la spermidine et de la spermine.	74
19	Schéma de biosynthèse des polyamines dans une plante.	75
20	Représentation schématique de la formation et de l'accumulation de divers complexes ligand - ET, notamment des complexes PC - ET à haut poids moléculaire (HMW pour High Molecular Weight) dans les vacuoles à partir de l'exemple des ions Cd <sup>2+</sup> .	80
21	Représentation schématique de la paroi et de ses trois niveaux d'organisation.	83
22	Représentation schématique de l'organisation des polymères au sein de la paroi primaire.	84
23	Représentation schématique de la paroi secondaire lignifiée.	84
24	Structure du cellobiose.	85
25	Représentation schématique des trois domaines (HG, RG-I et RG-II) constitutifs des pectines et de leurs agencements possibles au sein de la paroi.	88
26	Représentation schématique de la structure en « boîte à œufs » ou « egg box ».	89
27	Schéma représentatif de la structure polysaccharidique d'un RG-II.	90
28	Schéma représentatif d'un dimère de RG-II formé <i>via</i> une liaison diester de borate se formant entre les résidus apiose des chaînes A de chaque sous-unité de RG-II.	91
29	Schéma décomposé du complexe CESA représentant la synthèse des microfibrilles de cellulose par celui-ci.	92
30	Structure hypothétique d'une lignine extraite à partir de sciure de bois de peuplier.	93
31	Structure des trois principaux monomères de la lignine.	93
32	Déméthylestérification des pectines par la pectine méthylestérase (PME).	97
33	A/ Schéma représentatif du mécanisme d'action d'une PME « salt-dependent ». B/ Schéma représentatif du mécanisme d'inhibition de l'activité d'une PME « salt-dependent » lors d'un excès de cations.	98
34	Configuration du site de la Petite Faye (L) divisé en 2 zones (L1 et L2).	112

35	Configuration du site de Pontgibaud (P).	113
36	Forêt de sapins de Douglas.	120
37	Aire naturelle de répartition du sapin de Douglas (a) et sa distribution géographique en France (b).	121
38	Aire naturelle du mélèze d'Europe et distribution géographique en France.	124
39	Aire naturelle du mélèze du Japon et distribution géographique en France.	125
40	Etapas de l'embryogenèse somatique et du développement de jeunes plantules de mélèze en culture <i>in vitro</i> .	135
41	Protocole de germination des graines de Douglas, de mélèze d'Europe et de mélèze du Japon.	140
42	Schéma de découpe d'un mélèze du Japon ayant poussé un an en serre en condition témoin.	143
43	Réaction du DTNB avec les fonctions thiols.	147
44	Mécanisme de la réaction de dansylation des polyamines libres et principe de séparation des polyamines dansylées.	149
45	Principe du dosage du méthanol estimé par la transformation du méthanol en formaldéhyde par l'intermédiaire de l'alcool oxydase.	153
46	Étapes d'extraction des pectines du bois et des écorces de mélèzes.	154
47	Étapes de la méthanolyse permettant d'aboutir à la formation de O-méthylglycosides.	158
48	Méthode de triméthylsilylation des O-méthylglycosides.	158
49	Principe de saponification des pectines méthylestérifiées afin de libérer et quantifier le méthanol (estimation du DME).	160
<b>Publication 1: Physiological responses of the hybrid larch (<i>Larix x eurolepis</i> Henry) to cadmium exposure and distribution of cadmium in plantlets.</b>		
	<b>1. Effect of Cd on shoot (a) and root (b) biomass of hybrid larch after 2 and 4 weeks of treatment.</b>	<b>183</b>
	<b>2. Effect of Cd on carbon nutrition of hybrid larch after 2 and 4 weeks of exposure.</b>	<b>184</b>

	<b>3. Effect of Cd on nitrogen nutrition of hybrid larch after 2 and 4 weeks of exposure.</b>	186
	<b>4. Effect of Cd on shoot (a) and root (b) thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) content in hybrid larch after 2 and 4 weeks of treatment.</b>	187
	<b>5. Accumulation of Cd in shoots (a) and roots (b) of hybrid larch after 2 and 4 weeks of treatment.</b>	188
50	Effet du Cd sur la croissance des plantules de Douglas, de mélèze du Japon et de mélèze d'Europe.	204
51	Effet du Cd sur la matière fraîche et la matière sèche des plantules.	205
52	Comparaison de la concentration de Cd accumulée dans les organes des plantules.	207
	 <b>Publication 2: Cadmium distribution in three larch species and comparison of phytoextraction efficiency.</b>	
	<b>1. Effect of Cd exposure on larch growth.</b>	216
	<b>2. Concentration of Cd in two-year-old larches exposed for 9 months to this TE.</b>	220
53	Effet du Cd sur la teneur en thiols non protéiques totaux (TNP) dans les différents organes des plantules.	230
54	Effet du Cd sur la teneur en polyamines (putrescine, spermidine et spermine) dans les aiguilles et les racines de plantules de mélèze du Japon.	231
55	Comparaison des rendements d'extraction des pectines des écorces à T0.	233
56	Comparaison des teneurs en sucres totaux (ST) des différentes fractions pectiques à T0.	234
57	Comparaison des pourcentages d'acides uroniques (AU) des différentes fractions pectiques à T0.	234
58	Comparaison de la composition monosaccharidique des fractions pectiques à T0.	235

59	Evolution de la teneur en sucres totaux (ST) des fractions pectiques des écorces en réponse à l'exposition au Cd.	237
60	Evolution du pourcentage d'acides uroniques (AU) des fractions pectiques des écorces en réponse à l'exposition au Cd.	239
61	Evolution de la teneur en sucres totaux (ST) des fractions pectiques du bois en réponse à l'exposition au Cd.	240
62	Evolution du pourcentage d'acides uroniques (AU) des fractions pectiques du bois en réponse à l'exposition au Cd.	242
63	Composition monosaccharidique des fractions pectiques des écorces en réponse à l'exposition au Cd.	244
64	Evolution du rapport Rha / Gal. A des fractions PEC et POxa des écorces en réponse au Cd.	245
65	Composition monosaccharidique des fractions pectiques du bois en réponse à l'exposition au Cd.	247
66	Evolution du rapport Rha / Gal. A des fractions PEC et POxa du bois en réponse au Cd.	248
67	Courbe d'étalonnage permettant d'estimer le DME des échantillons à analyser.	252
68	Spectres IR en mode ATR des échantillons d'acide galacturonique (DME = 0) traités (trait rouge) ou non (trait noir) à pH 6.	252
69	Spectres IR en mode ATR de pectines d'agrumes (DME = 85 %) traitées (trait rouge) ou non (trait noir) à pH 6.	253
70	Spectres IR à transformée de Fourier des 3 échantillons étalons de DME égal à 0 (trait noir), 21,25 (trait bleu) et 85 % (trait rouge) après traitement à pH 6.	254
71	Spectres IR à transformée de Fourier de 2 échantillons de pectines POxa extraites d'écorces non exposées au Cd (trait noir) et exposées à 25 mg Cd. kg <sup>-1</sup> (trait rouge) après traitement à pH 6.	255
72	Spectres IR à transformée de Fourier de 2 échantillons de pectines PEC extraites du bois non exposées au Cd (trait noir), et exposées à 25 mg Cd. kg <sup>-1</sup> (trait rouge) après traitement à pH 6.	255
73	Teneurs en protéines totales dans les différents organes des plantules.	257
74	Activité spécifique de la PME dans les différents organes des plantules.	258

**Publication 3: Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) plantlets responses to As, Pb and Sb-contaminated soils from former mines.**

	1. Effect of TE on Douglas fir phenotype.	292
	2. Content of photosynthetic pigments in needles of Douglas firs after ten weeks on control soil (white bars) or TE-contaminated soils from L1 (hatched lines), L2 (horizontal lines) or P (dots).	293
	3. TBARS content in needles and roots of Douglas firs after ten weeks on control soil (white bars) or TE-contaminated soils from L1 (hatched lines), L2 (horizontal lines) or P (dots).	294
	4. Total soluble carbohydrate (A) and starch (B) contents in needles and roots of Douglas firs after ten weeks on control soil (white bars) or TE-contaminated soils from L1 (hatched lines), L2 (horizontal lines) or P (dots).	294
	5. Contents of total soluble proteins (A), total free amino acids (B), free proline (C) and NPT (D) in needles and roots of Douglas firs after ten weeks on control soil (white bars) or TE-contaminated soils from L1 (hatched lines), L2 (horizontal lines) or P (dots).	295
75	Différentes techniques de traitement <i>ex situ</i> et <i>in situ</i> des sols pollués.	379
76	Cônes femelle de mélèze d'Europe pollinisés artificiellement par pistolet souffleur (d'après Riou-Nivert, 2001).	389

# LISTE DES COMMUNICATIONS

## Publications scientifiques :

**Bonet A.**, Pascaud G., Faugeron C., Soubrand M., Joussein E., Gloaguen V and Saladin G.  
« Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) plantlets responses to As, Pb and Sb-contaminated soils from former mines». International Journal of Phytoremediation (DOI : 10.1080/15226514.2015.1086297).

**Bonet A.**, Lelu-Walter M.A., Faugeron C., Gloaguen V and Saladin G.  
« Physiological responses of hybrid larch (*Larix × eurolepis henry*) to cadmium exposure and efficiency of phytoextraction ». Environmental Science and Pollution Research (DOI: 10.1007/s11356-016-6094-6).

**Actuellement en soumission: Bonet A.**, Faugeron C., Gloaguen V and Saladin G.  
« Comparison of cadmium phytoextraction efficiency by three larch species ». Chemosphere.

## Communication orales et par affiches :

**Journées Thématiques Substances Naturelles et Ressources Forestières (11-13 Mai 2015, Marrakech, Maroc).**

- ✓ Communication orale : « Modifications de la composition pariétale du bois et des écorces du mélèze du Japon exposés à une pollution au cadmium ». **Bonet A.**, Saladin G., Gloaguen V. et Faugeron C.
- ✓ Communication par affiche : « Comparison of cadmium accumulation in three larch species for potentiel use in phytoremediation ». **Bonet A.**, Faugeron C., Gloaguen V et Saladin G.

**11<sup>th</sup> International Phytotechnologies Conference (30 Septembre - 3 Octobre 2014, Crète, Héraklion).**

- ✓ Communication par affiche : « Efficiency of cadmium accumulation in european and hybrid larch for use in phytoremediation ». **Bonet A.**, Faugeron C., Gloaguen V. et Saladin G.

**Journée du GEIST (4 Septembre 2014, Limoges, France).**

- ✓ Communication par affiche : « Étude de l'accumulation du cadmium chez un mélèze hybride (*Larix × eurolepis*) et le mélèze d'Europe (*Larix decidua*) en vue de leur utilisation en phytoremédiation ». **Bonet A.**, Faugeron C., Gloaguen V. et Saladin G.



**24<sup>ème</sup> Journée scientifique « Stolon » (27-29 Août 2014, Limoges, France).**

- ✓ Communication par affiche : « Étude de l'accumulation du cadmium chez un mélèze hybride (*Larix × eurolepis*) en vue de son utilisation en phytoremédiation ». **Bonet A.**, Faugeron C., Gloaguen V. et Saladin G.

**Colloque du Chapitre Saint-Laurent, Québec (Canada).**

- ✓ Communication par affiche (Québec, Mai 2010) : « Une exposition chronique au Cd perturberait-elle l'expression d'enzymes de biotransformation lors de la différenciation entérocytaire des cellules Caco-2 ? ». **A. Bonet.** et C. Jumarie.
- ✓ Communication orale (Montréal, Mai 2011) : « Effets du cadmium ingéré sur l'expression des enzymes de biotransformation entérocytaires ». **Bonet A.** et C. Jumarie.

# **INTRODUCTION**

## **GENERALE**



# INTRODUCTION GÉNÉRALE

Depuis le siècle dernier, le développement de nos sociétés modernes a été marqué par un accroissement de la dispersion dans l'environnement de molécules qui s'avèrent toxiques pour les organismes et perturbent donc le bon fonctionnement des écosystèmes. Parmi ces molécules, les « métaux lourds », appelés plus communément aujourd'hui « éléments traces » (ET), sont particulièrement étudiés. Les ET initialement présents dans le sol proviennent du fond géochimique naturel de celui-ci mais les activités humaines diminuent leur temps de résidence dans la roche et représentent la principale source de leur introduction et circulation dans les différents compartiments environnementaux. Les pollutions liées aux ET sont majoritairement dues à l'essor des activités minières et métallurgiques du siècle dernier mais aussi à l'utilisation intensive de produits contenant des ET (produits phytosanitaires, peintures, composants électroniques, batteries, piles...).

Le sol, de part les interfaces multiples qu'il établit avec la lithosphère, l'atmosphère, l'hydrosphère et la biosphère, occupe une place centrale dans l'équilibre des écosystèmes. L'accumulation et la mobilité des ET dans ce compartiment peut entraîner un risque potentiel pour la santé humaine ainsi que celle de la faune et de la flore par le biais de la chaîne alimentaire (Harris *et al.*, 1996 ; Prince *et al.*, 2001 ; Clemens, 2006). Parmi ces ET, certains sont essentiels au bon fonctionnement des processus vitaux des organismes vivants mais peuvent se révéler toxiques voire létaux lorsqu'ils sont présents en forte concentration (Hänsch et Mendel, 2009). D'autres ne sont pas essentiels à la vie et s'avèrent toxiques à l'état de traces (Mendoza-Cózatl et Moreno-Sánchez, 2005). Le risque de toxicité est dû au phénomène de bioconcentration qui se caractérise par le passage d'un contaminant donné au maillon trophique supérieur avec souvent un accroissement de sa concentration (McLean *et al.*, 2009). Cette accumulation est dangereuse pour les organismes vivants et notamment pour la santé humaine avec la manifestation de nombreuses maladies telles que des retards de développement, des malformations, des dommages rénaux, des cancers, des effets sur le système nerveux central et la mort dans certains cas (De Burbure *et al.*, 2006 ; Alomary et Belhadj, 2007).

En fonction de leur concentration dans les sols, les ET peuvent se révéler toxiques, notamment chez la plupart des végétaux qui les absorbent *via* leur système racinaire (Gardea-

Torresdey *et al.*, 2005). Certaines plantes ont développé des stratégies afin d'être capables de survivre, de s'adapter, de tolérer et de maintenir leur développement sur des sols contaminés en ET. Les propriétés naturelles de protection mises en place par ces plantes sont exploitées aujourd'hui dans le domaine de la phytoremédiation. Cette dernière s'appuie sur un ensemble de technologies permettant d'extraire, de contenir ou de dégrader des polluants organiques ou des polluants inorganiques (ces derniers n'étant pas biodégradables) *via* l'utilisation de plantes vasculaires, d'algues (phycoremédiation) ou de champignons formant des mycorhizes avec le système racinaire des plantes (mycoremédiation) (Moussavou Moudouma, 2010). Ces divers procédés permettent de dépolluer non seulement des sols mais aussi des eaux et peuvent également participer à l'assainissement de l'air.

La phytoremédiation, jugée plus conforme aux enjeux du développement durable par rapport aux méthodes conventionnelles (excavation du sol et traitements hors du site contaminé), se développe de plus en plus sur les marchés de traitement et de gestion des sites pollués (friches industrielles, parcelles agricoles...). En effet, les phytotechnologies représentent une alternative et/ou un complément plus écologique et économique que les techniques classiques pour dépolluer les milieux contaminés. Elles font également l'objet d'un intérêt croissant de la part des industriels, soucieux de leur image et désireux de réduire leurs investissements en termes de coûts de traitement de leurs rejets. En ce qui concerne les ET, un procédé de phytoremédiation nommé phytoaccumulation ou phytoextraction utilise certaines espèces végétales pour extraire les polluants du sol puis les séquestrer dans les parties aériennes (Hall et Williams, 2003). Cette technique peut s'opérer directement sur le milieu à dépolluer, la récolte ultérieure des plantes étant moins destructrice pour le milieu que l'excavation des sols à décontaminer.

Le sujet de cette Thèse s'inscrit dans un axe de recherche développé par le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN) de l'Université de Limoges autour de la phytoremédiation des ET, s'intégrant ainsi dans la thématique de la valorisation des agro-ressources végétales et à l'interface de la chimie et de la biologie. Depuis plusieurs années, le laboratoire valorise les espèces ligneuses, et plus particulièrement les conifères largement distribués en région Limousin. Différentes études ont permis de caractériser puis progressivement de modéliser les propriétés d'adsorption de certains ET (Zn, Pb, Fe, Cu, Cr, Cd) en solution par des écorces d'arbres chimiquement modifiées ou non (Gloaguen et Morvan,

1997 ; Martin-Dupont *et al.*, 2002 et 2006 ; Martin-Dupont, 2003 ; Astier, 2010 ; Astier *et al.*, 2010 et 2012 ; Hachem *et al.*, 2012). Ces travaux ont notamment conduit au développement d'un filtre d'écorces modifiées de sapin de Douglas pour la décontamination d'eaux contenant des radionucléides (Jauberty *et al.*, 2011). Ils ont aussi montré que les écorces brutes de sapin de Douglas présentent intrinsèquement de bonnes capacités d'adsorption des ET. Une autre approche concerne l'étude de l'absorption des ET par la plante entière. Elle a permis de caractériser, d'une part, des mécanismes de piégeage au niveau pariétal et intracellulaire et, d'autre part, l'influence de la présence d'ET sur l'évolution des compositions chimiques des parois cellulaires et, notamment, de sa composante polysaccharidique (Astier, 2010 ; Moussavou Moudouma, 2010 ; Moussavou Moudouma *et al.*, 2013 ; Astier *et al.*, 2014). Ces deux approches s'intéressent plus particulièrement aux arbres pour deux raisons : l'utilisation d'écorces permet de valoriser des produits connexes de la filière bois, et les arbres pourraient constituer à terme des candidats efficaces pour la phytoremédiation.

Ce travail de Thèse s'inscrit dans cette seconde approche. L'utilisation de plantes pour dépolluer des sites contaminés par des ET étant un procédé en plein essor (faible coût, préservation du site), les espèces ligneuses, de part leur importante biomasse et leur système racinaire développé pourraient absorber les ET plus profondément dans le sol par rapport aux espèces herbacées, constituant ainsi des modèles de choix pour ce type de technologie. L'objectif de la Thèse est, à l'échelle de la plante entière, de comprendre les mécanismes d'accumulation et de mobilité des ET (lieux de stockage préférentiels) et, à l'échelle cellulaire, d'étudier les interactions chimiques avec les composés organiques qui permettent d'en atténuer les effets toxiques. Cette interaction entre les ET et les composés organiques commence à la périphérie de la cellule, au niveau de la paroi riche en polysaccharides et polyphénols, et se poursuit dans le compartiment intracellulaire sur des molécules spécifiques (oligopeptides riches en cystéines, acides aminés, acides organiques, polyamines). Ainsi, les mécanismes de régulation de la synthèse des composés impliqués dans cette adsorption ont été étudiés à la fois sur des plantes cultivées *in vitro* (réponses reproductibles liées à l'utilisation d'un clone) ainsi que sur des plantes cultivées en serre (plus proches des conditions naturelles). En raison d'une part de leur forte représentativité en région Limousin et d'autre part, de résultats préliminaires qui suggèrent leur capacité de phytoaccumulation, nous avons sélectionné le sapin de Douglas et les 3 espèces régionales de mélèze (le mélèze hybride et ses deux parents, le mélèze d'Europe et le mélèze du Japon). La majeure partie de cette étude s'est focalisée sur le cadmium, un ET

souvent présent dans les sols, non essentiel pour les plantes et particulièrement toxique à faible dose. Par ailleurs, un autre objectif de cette thèse étant d'évaluer l'utilisation potentielle de ces espèces ligneuses en phytoextraction, nous avons également travaillé sur des sols contaminés en plusieurs ET et provenant d'anciens sites miniers du Limousin et d'Auvergne (il est en effet peu fréquent de trouver des sites pollués par un seul ET).

**INTRODUCTION**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**





## Première partie :

# **La contamination métallique des sols et les méthodes de dépollution par phytoremédiation**

Les sols représentent une importante ressource économique puisqu'ils constituent un support à l'activité anthropique et permettent la production de 90 % de l'alimentation humaine et animale (site internet 1). C'est également un substrat important riche en éléments nutritifs pour les végétaux mais aussi pour de nombreux organismes vivants. Cependant, cette ressource est menacée par des pollutions liées à différents domaines d'activités : agriculture, transports, gestion des déchets, chimie, pétrochimie, mines, métallurgie...

## **I. Les ET dans les sols**

L'expression « métaux lourds » a longtemps été employée mais progressivement abandonnée car les métaux lourds désignaient aussi bien des métaux (Zn, Cu, Hg, Cd, Ni, Fe, Al, Co...) que des métalloïdes (antimoine, arsenic, tellure...). L'appellation « éléments traces » (ET) est préférable à celle de métaux lourds. Conventionnellement, en sciences de la Terre, les ET appartiennent à la famille des éléments traces regroupant les 80 éléments chimiques constitutifs de la croûte terrestre continentale et dont la concentration est pour chacun inférieure à 0,1 % (Baize, 2009). Ils ne représentent que 0,6 % du total alors que les 12 éléments majeurs (O, Si, Al, Fe, Ca, Na, K, Mg, Ti, H, P, Mn) représentent 99,4 %. Tous les ET sont présents naturellement dans le sol. On les retrouve dans tous les compartiments environnementaux mais généralement en faibles concentrations. Certains sont des oligo-éléments (Cu, Zn, Fe, Mo...), c'est-à-dire des éléments indispensables (en faible quantité cependant) au fonctionnement des processus biologiques, tandis que d'autres ne sont pas requis pour ces processus (Cd, Pb, Hg, Sn...). Dans les organismes vivants, il est estimé que la concentration en ET est en-dessous de 0,01 % de la matière sèche (MS) (Mench et Baize, 2004).

## 1. Localisation des ET dans les constituants du sol

Les sols représentent la partie supérieure de la croûte terrestre et se composent d'éléments vivants et inertes en interactions complexes (Sirven, 2006). Ils sont constitués d'une superposition et juxtaposition d'horizons (ou couches). Chaque horizon représente un volume homogène et les caractéristiques physico-chimiques, biologiques et morphologiques varient fortement d'un horizon à l'autre (Girard *et al.*, 2005). Les sols sont constitués de trois phases : une phase solide (minérale et organique), une phase liquide (solution du sol) et une phase gazeuse (air, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>...). Bien qu'ils soient très divers, les sols contiennent en moyenne 25 % d'air, 25 % d'eau, 45 % de composés minéraux et 5 % de composés organiques ainsi qu'un grand nombre d'organismes vivants de toutes tailles (bactéries, champignons, vers, arthropodes, gastéropodes...) qui interagissent fortement avec les racines des végétaux et les autres constituants du sol (Bliefert et Perraud, 2001).

Les ET se répartissent entre la phase solide et la phase liquide des sols. L'eau est le constituant majeur de la solution du sol. En général, la quantité de contaminant existant dans la solution du sol ne représente qu'un infime pourcentage de la totalité du polluant. Les ET sont en effet essentiellement retenus dans la phase solide du sol au niveau de laquelle ils se répartissent dans les différentes fractions organiques et minérales (Perrono, 1999). On les retrouve sous forme échangeable dans les argiles et la matière organique (ou MO) (forme facilement absorbée par les plantes et ayant donné lieu au terme de phytodisponibilité), sous forme de complexes ou associés à des molécules organiques (oxalate, malate...), inclus dans des phases cristallines, adsorbés sur des particules d'oxydes ou d'hydroxydes de Fe, d'Al et de Mn ou encore retenus dans les débris d'organismes vivants qui les contenaient (figure 1).

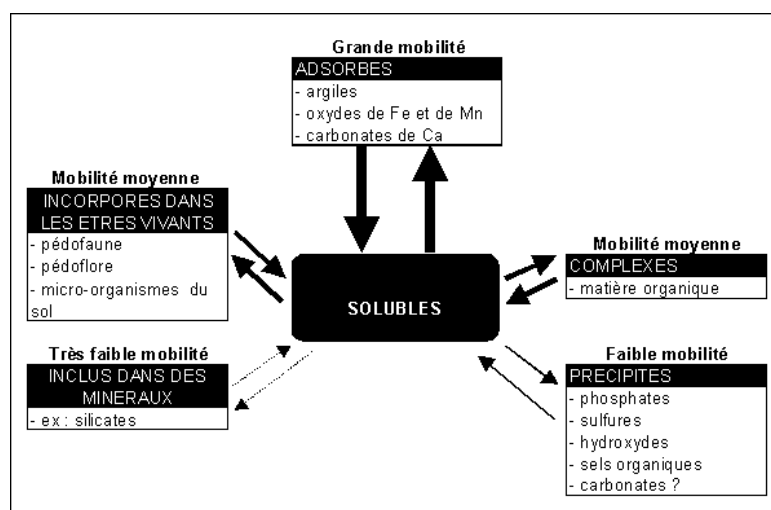


Figure 1. Localisation des ET dans le sol (adapté de Juste *et al.*, 1995).

La nature des matériaux du sol (argiles, carbonates de calcium, oxydes, MO) auxquels sont associés les ET ainsi que la forme de ces derniers jouent un rôle dans leur mobilité (voir chapitre II, section III.1. de l'introduction bibliographique).

## 2. Utilisations des ET et origines des pollutions métalliques

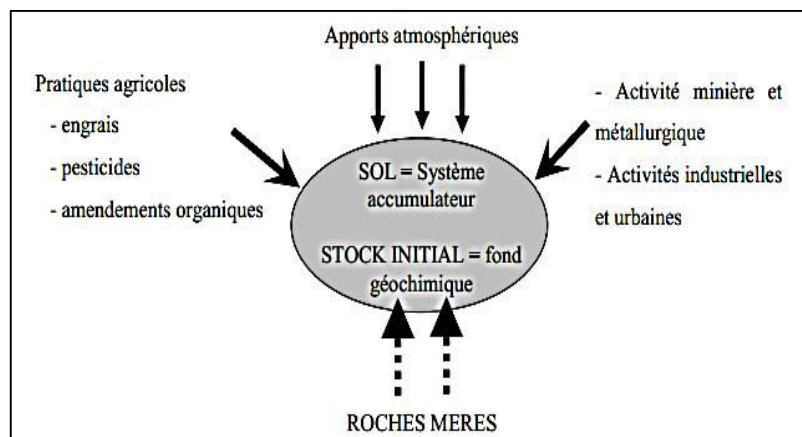
La découverte de propriétés intéressantes des ET a contribué au développement des sociétés industrielles et à l'utilisation de ces éléments dans de nombreuses applications industrielles, médicales et agricoles. Les ET ont également un rôle stratégique dans les relations internationales. En effet, la carence en certaines ressources minières, notamment en Europe, a motivé la colonisation de territoires mieux dotés en richesses naturelles (Hocquard, 2005). Le tableau 1 résume les utilisations industrielles courantes de divers ET et leur abondance moyenne naturelle dans la croûte terrestre.

**Tableau 1.** Utilisation actuelle courante des métaux dans l'industrie (adapté de Sirven, 2006).

<b>Élément et abondance moyenne dans la croûte terrestre</b>	<b>Utilisations</b>
Cd (0,1 ppm*)	- piles (70 %) - pigments (13 %) - autres usages industriels (17 %)
Co (25 ppm)	- superalliages (72,6 %) - aimants (9 %) - céramiques (9,6 %) - chimie (5,4 %) - autres (3,4 %)
Cr (100 ppm)	- acier inoxydable (65 %) - chimie et réfractaires (20 %) - utilisations métallurgiques diverses (15 %)
Cu (50 ppm)	- constructions électriques (55 %) - bâtiment (20 %) - équipements industriels (10 %) - transports (5 %) - autres (10 %)
Ni (75 ppm)	- acier inoxydable (65 %) - alliages (15 %) - revêtements de surfaces (7,5 %) - autres (12,5 %)
Pb (10 ppm)	- batteries (70 %) - laminés et munitions (10 %) - chimie (10 %) - autres (10 %)

\* ppm : partie par million (ou mg. kg<sup>-1</sup> de sol sec).

Les teneurs en ET mesurées aujourd'hui dans les sols résultent de processus naturels et anthropiques (figure 2). Les ET naturellement présents dans les sols sont issus de l'héritage du fond géochimique. Les processus géologiques et les cycles biologiques les redistribuent naturellement dans l'environnement par le lessivage, l'érosion de surface, l'illuviation (accumulation dans un horizon de sol de métaux provenant d'un autre horizon) ou encore par voie atmosphérique *via* les incendies de forêts, éruptions volcaniques, embruns, poussières provenant de l'érosion éolienne des roches... (Nriagu, 1989 ; Baize, 2006).



**Figure 2.** Origine des ET dans le sol, d'après Robert et Juste (1999).

La présence d'ET dans les sols peut être également liée aux activités humaines, ces dernières pouvant être à l'origine de diverses pollutions :

- ✓ Pollution minière : les concentrations en ET y sont localement très élevées. L'acidification des eaux due à l'oxydation des sulfures présents dans les stériles et les résidus miniers favorise le lessivage et donc le transport des ET sous forme dissoute. Ainsi, ces rejets peuvent entraîner des répercussions significatives sur la qualité de l'eau et des sols.
- ✓ Pollution de proximité : elle concerne les zones contaminées à la suite des activités des entreprises et industries environnantes comme la sidérurgie, la métallurgie, les incinérateurs, les stations d'épuration ou encore l'accumulation de produits phytosanitaires contenant des ET.

Les activités humaines (urbaines, industrielles et agricoles) diminuent le temps de résidence des ET dans la roche et représentent la source principale de leur introduction dans les différents

compartiments environnementaux (eau - air - sol). Les principales sources anthropiques de pollution des sols sont majoritairement dues aux activités de transformation primaire des ET mais une part non négligeable provient des activités agricoles. Les traitements phytosanitaires participent à un enrichissement notable des sols en ET comme par exemple la « bouillie bordelaise », un fongicide contenant du sulfate de cuivre. Les gisements de minerais phosphatés constituent également des secteurs d'accumulation d'ET dont beaucoup d'entre eux accompagnent le phosphate lors des traitements de concentration destinés à produire des engrais. C'est par exemple le cas du cadmium, du chrome, du zinc, du nickel, du manganèse ou du cobalt qui sont présents à l'état d'impuretés dans ces engrais fabriqués à partir de minerais phosphatés (Robert et Juste, 1997 ; Perrono, 1999). Par ailleurs, l'emploi d'amendements organiques traditionnels comme le fumier ou les lisiers contribue à l'accroissement de la teneur en ET du sol. Ces derniers sont souvent riches en zinc car ils résultent de compléments alimentaires (surtout pour l'élevage porcin) pour pallier aux problèmes d'appétit, de diarrhée, de retard de croissance ou de parakératose pouvant apparaître chez l'animal (Revy *et al.*, 2003). L'importance relative des différentes voies d'enrichissement anthropique des sols en certains ET est résumée dans le tableau 2.

**Tableau 2.** Pourcentage de contribution des différentes sources d'enrichissement des sols en certains ET (d'après Feix et Wyart, 1998).

SOURCES	ET			
	Cd	Cu	Pb	Zn
Déchets agricoles	20 %	55 %	12 %	61 %
Engrais	38 %	1 %	10 %	1 %
Retombées atmosphériques	40 %	16 %	68 %	18 %
Déchets urbains	2 %	28 %	19 %	20 %

Les ET peuvent également provenir de poussières et d'aérosols issus de l'activité industrielle, des chauffages urbains, d'incinérations de déchets domestiques ou du trafic automobiles par exemple. Ainsi, ils se déposent sur les sols, sur les végétaux et sur les eaux de surface sous forme de précipitations sèches (transport par les vents) ou humides (pluie, neige, grêle), ou par interception de particules en suspension (brouillards) (Bliefert et Perraud, 2001 ; Sirven, 2006).

Selon Rollin et Quiot (2006), depuis ces 50 dernières années, il a été constaté une augmentation de 300 % de la consommation de métaux et un relargage accru d'ET tels que le Cd, le Cu, le Zn, le Cr, le Pb et le Hg.

## **II. Surveillance des sols pollués**

La préservation et la gestion durable des sols fait intervenir de nombreux organismes. Certains ont pour mission de localiser et de répertorier les sites pollués par les activités industrielles et interviennent ainsi dans le diagnostic précis et le suivi de l'évolution de ces derniers. Sur ces diagnostics, d'autres organismes vont intervenir afin de décontaminer les sites, limiter les pollutions futures et gérer les risques.

### **1. Organismes français**

L'Agence de l'Environnement et de la Maitrise de l'Énergie (ADEME) est un établissement public placé sous tutelle conjointe du ministère de l'Écologie, du Développement Durable et de l'Énergie (MEDDE) et du ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Son action concerne divers domaines tels que la gestion des déchets, la préservation des sols, l'efficacité énergétique et les énergies renouvelables, la qualité de l'air et la lutte contre le bruit.

L'Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS) est un établissement public placé sous la tutelle du MEDDE. Son domaine d'expertise en matière de prévention l'amène à intervenir dans différents programmes de recherche visant à mieux comprendre les phénomènes susceptibles de conduire aux situations de risques ou d'atteintes à l'environnement et à la santé. Ses compétences scientifiques et techniques sont mises à disposition des pouvoirs publics, des entreprises et des collectivités locales afin de les aider à prendre les décisions les plus appropriées pour une amélioration de la sécurité environnementale.

Le Bureau de Recherches Géologiques et Minières (BRGM) est l'établissement public impliqué dans les applications des sciences de la Terre pour gérer les ressources et les risques du sol et du sous-sol. Il met à disposition les outils nécessaires à la gestion du sol, du sous-sol et des ressources, et à la prévention des risques et des pollutions.

Ces organismes travaillent souvent en partenariat sur de nombreux projets. Par exemple, en 2001, a été créé le Groupement d'Intérêt Scientifique Sol (GIS Sol). Celui-ci regroupe le Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt, le MEDDE, l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), l'ADEME, l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et l'Inventaire Forestier National (IFN). Il a pour mission d'organiser la concertation et la coopération entre ses membres dans le but de concevoir, orienter, coordonner et de s'assurer que se réalisent dans les meilleures conditions, des actions d'inventaire géographique des sols, de suivi opérationnel de leurs qualités, de création et de gestion d'un système d'information répondant aux demandes des pouvoirs publics et de la société. Le GIS s'assure également de la coordination avec les programmes européens de même nature.

## **2. Les bases de données nationales concernant les sites pollués**

La France a été l'un des premiers pays européens à mener des inventaires des sites pollués d'une façon systématique avec un premier inventaire réalisé en 1978. Depuis environ deux siècles, son histoire industrielle a vu l'accumulation de sites et d'activités dont beaucoup ont été transformées ou ont cessé. Le BRGM a alors été missionné par le MEDDE pour mettre en œuvre BASIAS (Base des Anciens Sites Industriels et Activités de Service). Cette base de données complète celle de l'inventaire national commencé en 1978 concernant les sites industriels ou de services, anciens ou actuels, ayant eu une activité potentiellement polluante. Celle-ci est accessible librement *via* un site internet (site internet 2). Elle a été créée par un arrêté ministériel de 1998 (Arrêté du 10 Décembre 1998 relatif à la création d'une base de données sur les sites industriels et d'activités de service anciens) sous l'égide du ministère chargé de l'Environnement (site internet 3). Ce recensement est conduit de façon systématique au niveau départemental puis compilé dans BASIAS. En 2012, BASIAS enregistrait près de 257 000 sites potentiellement pollués (source : Commissariat général au développement durable (CGDD), 2013).

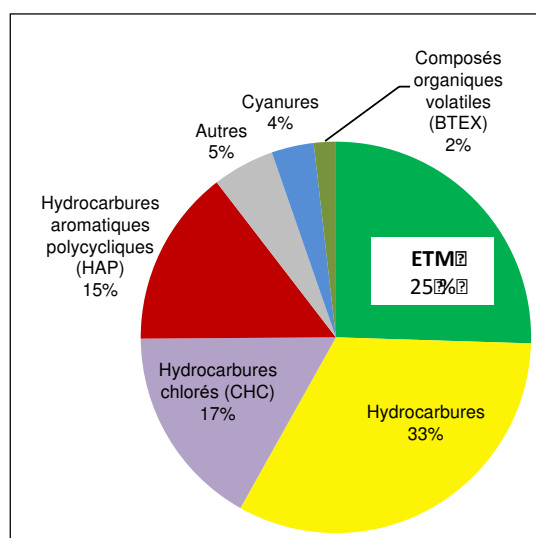
L'Etat a également mis en place depuis 1994 une autre base de données complémentaire des sites faisant l'objet de surveillance et de mesures de gestion des sols. Il s'agit de la base de données BASOL qui regroupe les sites et sols pollués (ou potentiellement pollués) appelant une action des pouvoirs publics, à titre préventif ou curatif. Elle est disponible sur internet (site internet 4) et est complétée par les Préfectures et les Directions Régionales de l'Environnement,



de l'Aménagement et du Logement (DREAL), lesquelles regroupent depuis 2007 les anciennes Directions Régionales de l'Environnement (DIREN), Directions Régionales de l'Industrie, de la Recherche et de l'Environnement (DRIRE) et Directions Régionales de l'Équipement (DRE). En 2015, plus de 6200 sites ont été recensés. Depuis Mai 2005, les sites n'appelant plus d'action de la part des pouvoirs publics chargés de la réglementation sur les installations classées, ont été transférés de BASOL dans BASIAS.

Enfin, un portail d'information national appelé « Sites-Pollués » informe sur les sites et sols potentiellement pollués par des contaminations chimiques ou radioactives (site internet 5). Celui-ci est animé par plusieurs organismes publics d'État tels que l'ADEME, le BRGM, l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), l'INERIS et l'institut français « Risques Majeurs et protection de l'Environnement » (RME).

En France, les hydrocarbures représentent à eux seuls 33 % des polluants présents dans le sol, suivis de près par les ET (25 %) puis les hydrocarbures chlorés (CHC) (17 %) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (15 %) (figure 3). Selon BASOL, environ 15 % des sites pollués contiennent du Pb, 13 % du Cr et 10 % de l'As (Rollin et Quiot, 2006).



**Figure 3.** Présence globale des différents contaminants identifiés dans les sols français indiqués par le MEDDE (site internet 6).

BTEX : benzène, toluène, éthylbenzène, xylène.

### **3. Base de données et organismes européens**

Le programme SISE (Système d'Information des Sols d'Europe) est un programme de l'Union Européenne pour lequel l'INRA participe d'une part en tant que collaborateur pour le territoire français et d'autre part en tant qu'animateur scientifique pour l'ensemble de l'Europe en partenariat avec le Bureau Européen des Sols de la Commission (Centre commun de recherche basé à Ispra en Italie). C'est en 2003 que le Comité Européen de Normalisation (CEN) a mis en place un comité technique de caractérisation des sols ayant pour objectifs d'élaborer une normalisation européenne harmonisée sur la qualité des sols. Il existe une Base de Données Géographique des Sols d'Europe (BDGSE) regroupant ces informations. En raison de son passé industriel, la contamination des sols européens est une préoccupation primordiale. En 2006, l'Agence Européenne de l'Environnement (AEE) estimait à environ 3 millions le nombre de sites sur lesquels ont eu lieu par le passé des activités polluantes en Europe. Plus de 8 % de ces sites (soit 242 000 sites) étaient reconnus comme contaminés et comme nécessitant des mesures urgentes de réhabilitation. Les contaminants les plus couramment rencontrés dans ces sites étaient alors des métaux et métalloïdes (près de 40 %) et des hydrocarbures (un tiers des sites) (Commissariat général au développement durable, 2013).

### **III. Contexte réglementaire des sols pollués**

L'usage courant et les risques associés à ces ET conduit à une évolution progressive de leur réglementation. Les sols ne bénéficient pas de la même protection et du même cadre juridique que des éléments comme l'air et l'eau. Au niveau européen mais aussi français, il n'existe pas de directive portant directement sur la protection des sols et il faut se référer aux textes sur l'eau, l'air, les déchets, et plus globalement sur la protection de l'environnement, qui protègent partiellement ou indirectement les sols.

#### **1. Distinction entre sol contaminé et sol pollué**

Étant donné qu'il existe des divergences notables selon les pays mais aussi selon les disciplines, aucun accord international ne permet d'établir une distinction entre sol contaminé et sol pollué comme le propose l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO). Dans les deux cas, on constate une nette augmentation de la teneur en la substance potentiellement dangereuse. Cependant, on parle le plus souvent de contamination lorsqu'aucun effet négatif n'est observé sur un quelconque compartiment de l'écosystème étudié, et de pollution quand au

moins un effet négatif est observé sur un ou plusieurs compartiment(s) de l'écosystème étudié (Chassin *et al.*, 1996).

## **2. Les sols pollués face au droit français : une législation encore opaque**

Le sol fait surtout l'objet de réglementations en tant que bien et propriété foncière et la législation européenne n'a pas encore donné de cadre spécifique à la protection des sols. Il est alors nécessaire de se référer aux différentes directives traitant de la protection de l'environnement afin de définir le cadre législatif de la protection des sols (Coste et Itard, 2006). En effet, la problématique « pollution des sols » apparaît dans divers textes relatifs :

- A l'eau :

- Directive 86/278/CEE du Conseil du 12 Juin 1986 concernant les boues d'épuration en agriculture.
- Directive 75/440/CEE du Conseil du 16 Juin 1975 concernant la qualité requise des eaux superficielles destinées à la production d'eau alimentaire.
- Directive 80/68/CEE du Conseil du 17 décembre 1979 touchant la protection des eaux souterraines contre la pollution causée par certaines substances dangereuses.

- A la gestion des déchets :

- Directive 75/439/CEE du Conseil, du 16 Juin 1975 liée à l'élimination des huiles usagées.
- Directive 75/439/CEE du Conseil du 16 Juin 1975) relative à la mise en décharge des déchets.

- A la pollution atmosphérique :

- Directive 1999/13/CE du Conseil du 11 mars 1999 relative à la réduction des composés organiques volatils.

De plus, la thématique « sol » n'existant pas en tant que telle, il n'y a pas non plus en droit français de cadre juridique spécifique. Il est donc nécessaire de se référer à diverses réglementations, notamment à celle relative aux installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE) et celles spécifiques aux thèmes de l'eau, de l'air, des déchets, des matières fertilisantes et des produits phytosanitaires (Coste et Itard, 2006).

## IV. Évaluation du degré de contamination d'un sol : une tâche complexe

### 1. Des valeurs seuils difficiles à apprécier

Pour connaître le degré de contamination d'un sol, il est nécessaire de préalablement déterminer son Fond Pédo-Géochimique Naturel (FPGN) local qui correspond à la concentration naturelle d'un élément chimique présent. Celui-ci est issu uniquement de l'évolution naturelle géologique et pédologique en absence de tout apport lié aux activités humaines (Baize, 2006). Il concerne les horizons profonds des sols agricoles et les sols forestiers mais il n'est plus possible pour les horizons de surface labourés qui ont été touchés par des contaminations diffuses (apports d'ET liés aux pratiques agricoles *via* des fertilisants, des amendements, des épandages mais aussi liés aux retombées atmosphériques). Dans ce dernier cas, on détermine alors la teneur agricole habituelle (TAH) correspondant à la gamme de concentrations observées le plus fréquemment dans ces horizons de sols agricoles.

Il n'existe pas de réglementation proprement dite concernant les sols mais les résultats sont souvent confrontés aux valeurs seuils d'une réglementation concernant l'épandage des boues, la Norme AFNOR U 44-041 de 1985 qui fixe pour un élément donné, des limites de teneurs totales dans le sol au-delà desquelles on ne doit plus épandre des boues de stations d'épuration (tableau 3). A ce jour, les valeurs limites sont toutes exprimées en teneurs totales. Cependant, la teneur totale en un élément permet de connaître le stock de celui-ci à un instant donné mais ne distingue pas ce qui est d'origine naturelle de ce qui est apporté par l'activité humaine. En effet, le métal lié aux apports anthropiques présente sûrement des risques supérieurs au métal « naturel », celui-ci étant souvent immobilisé sous des formes relativement inertes.

**Tableau 3.** Valeur limite de concentration en certains ET dans les sols d'après l'arrêté du 8 Janvier 1998, basé sur la norme AFNOR NFU 44-041 de 1985.

ET	Valeur limite (mg. kg <sup>-1</sup> )
Cd	2
Co	30
Cr	150
Cu	100
Ni	50
Pb	100
Zn	300

Par ailleurs, il est également difficile de se fier à une valeur seuil unique dans la mesure où les sols peuvent être de différente nature (argileux, limoneux, sableux...) et donc posséder des propriétés physico-chimiques et granulométriques très différentes. En effet, Baize (1995) indique qu'au sein d'un même sol, et en dehors de toute contamination anthropique, les teneurs en ET peuvent être variables, notamment dans le cas de sols à forte différenciation texturale. Il a montré également que les teneurs en ET sont corrélées aux teneurs en argile et que pour un même taux d'argile, les teneurs en ET varient non seulement en fonction de la nature lithologique de la roche mère mais aussi en fonction de l'histoire pédologique du sol.

Les concentrations limites admissibles de divers ET dans les sols peuvent être très variables selon les différents pays et organisations (tableau 4). Cette variation peut être fondée sur les caractéristiques du sol mais aussi sur le contexte climatique, géologique et pédologique ainsi que sur les différentes méthodes d'échantillonnage et d'analyse adoptées par les pays/organisations pour fixer des limites admissibles. Par exemple, la limite admissible pour l'As est fixée à 75 mg. kg<sup>-1</sup> par l'US EPA (Agence de protection de l'environnement des États-Unis), 30 mg. kg<sup>-1</sup> par la SEPA (Agence chinoise de protection de l'environnement) et 20 mg. kg<sup>-1</sup> par l'OMS et la FAO (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture). Pour le Cu et le Ni, les limites admissibles sont quant à elles similaires pour presque tous les pays et les organisations, tandis que le Cd, le Cr et le Pb montrent de grandes variations dans leurs limites admissibles respectives fixées par différent(e)s organisations et / ou pays.

**Tableau 4.** Concentrations limites admissibles des ET (mg. kg<sup>-1</sup>) dans les sols selon les différents pays et / ou organismes (d'après Khan *et al.*, 2015).

<b>ET</b>	<b>Commission de régulation de l'Union Européenne (COM, 2006)</b>	<b>US EPA (2005)</b>	<b>FAO/OMS (2001)</b>	<b>SEPA (Chine) (1995, 2005)</b>
<b>As</b>	-	75	20 <sup>a</sup>	30
<b>Cd</b>	3	85	0,3	0,6
<b>Cr</b>	100	3000	100 <sup>a</sup>	200
<b>Cu</b>	100	-	100 <sup>a</sup>	100
<b>Ni</b>	50	-	50 <sup>a</sup>	50
<b>Pb</b>	100	420	100 <sup>a</sup>	300

(a : d'après Ewers, 1991)

Pour ces multiples raisons, les valeurs limites doivent être utilisées avec précaution et plutôt servir de signal d’alerte au-dessus duquel une étude plus détaillée est nécessaire (Baize, 1995). Ainsi, il paraît plus correct de parler de valeurs ou concentrations ubiquitaires en ET plutôt que de valeurs seuils. La concentration ubiquitaire est la concentration mesurée pour des sols éloignés de toute source de pollution connue et représentant une sorte de « bruit de fond » environnemental (tableau 5).

**Tableau 5.** Teneurs moyennes ubiquitaires de différents ET dans les sols français.

Éléments	Teneur ubiquitaire (mg. kg <sup>-1</sup> de sol sec)	Source
Cd	0,2	INERIS (2014)
Cr	3 à 100	Juste <i>et al.</i> (1995)
Cu	10 à 40	Juste <i>et al.</i> (1995)
Ni	20	ATSR (2005)
Pb	5 à 60	Juste <i>et al.</i> (1995) ; ATSR (2007) ; IUCLID (1996)
Zn	10 à 300	HSDB (2000)

## 2. Risques de transferts entre les différents constituants du sol et les organismes vivants

Même si les valeurs seuils d’une norme fournissent une approximation quant à la notion de danger éventuel sur la santé humaine et environnementale, la teneur totale en un élément ne renseigne pas sur sa mobilité dans le sol ni sur sa biodisponibilité vis-à-vis des organismes vivants. Afin d’estimer les risques de transferts, une caractérisation approfondie des sols est donc fondamentale : granulométrie, pH, capacité d’échange cationique, calcaire, carbone, abondance des oxydes de Fe ou Mn... (Baize, 2009). De nombreux facteurs vont influencer la solubilisation des ET ou au contraire leur précipitation ou leur adsorption : le pH du sol, le potentiel d’oxydo-réduction, la température et l’humidité du sol, les composés minéraux, l’apport de matière organique, la présence de micro-organismes (Nowak *et al.*, 2003 ; Laperche *et al.*, 2004). La spéciation d’un ET, c’est-à-dire les différentes formes physico-chimiques sous lesquelles l’ET peut se trouver dans le sol, est d’une grande importance. Elle conditionne sa mobilité et sa biodisponibilité, deux paramètres extrêmement importants pour évaluer leur impact toxicologique. Les paramètres influençant la spéciation seront davantage développés dans la seconde partie de cette introduction (chapitre 2, III.1).

## **V. Impact des ET sur la santé humaine**

### **1. De leur émission à l'exposition des organismes vivants**

Les voies de contamination de l'Homme sont l'ingestion de produits (végétaux ou animaux) contaminés, la consommation d'eau contaminée, la contamination cutanée et l'inhalation de composés volatiles ou de poussières émises par les sols et les activités anthropiques. Quel que soit le mode de contamination, les éléments s'accumulent dans l'organisme (sang, foie, cerveau, reins...) et sont éliminés très lentement. En cas d'exposition, ces éléments peuvent alors entraîner des effets majeurs sur la santé pouvant se traduire par des altérations spécifiques d'un organe, d'un système ou d'une fonction (fonction reproductrice par exemple) mais aussi par la détérioration de processus biochimiques ou biologiques (mutagénicité, cancer) (Moussavou Moudouma, 2010). Les effets varient selon plusieurs paramètres : la voie de contamination, la dose reçue, la fréquence et la durée d'exposition, l'âge et le sexe. L'INERIS met à disposition sur son site internet des fiches de données toxicologiques et environnementales de diverses substances chimiques qui sont régulièrement actualisées (site internet 7).

Cependant, la toxicité d'un élément varie selon sa spéciation. Le Cr (VI) est par exemple connu pour être beaucoup plus dangereux que le Cr (III). En effet, les manifestations toxiques du Cr sont en général attribuées aux dérivés hexavalents. Le Cr (III) est un composé naturel de l'organisme présent à l'état de trace indispensable pour le métabolisme du cholestérol, des graisses et du glucose. Il possède néanmoins une action toxique car, même si aucune étude n'a encore rapporté les effets du Cr (III) seul chez l'Homme, il a été observé lors d'exposition au Cr (VI) que celui-ci était totalement ou partiellement réduit en Cr (III) (INERIS, 2005).

La Directive européenne 99/45/CE définit dans l'article 2 les différentes catégories s'appliquant à la toxicité des ET : irritante, mutagène, cancérogène, toxique pour la reproduction et très toxique. Les effets toxiques ne sont pas forcément irréversibles et on distingue deux sortes de toxicité : la toxicité chronique pour laquelle les effets apparaissent plus de 6 mois après l'absorption de petites quantités, et la toxicité aiguë pour laquelle les effets apparaissent quelques jours après une absorption unique de substance. Le tableau 6 recense les effets connus de certains ET sur l'organisme humain.

**Tableau 6.** Liste non exhaustive de quelques effets toxiques de certains ET sur la santé humaine (fiches toxicologiques INERIS).

<b>ET</b>	<b>EFFET(S)</b>	<b>Source</b>
<b>As</b>	Troubles hépatiques et gastro-intestinaux, troubles neurologiques et cardiovasculaires, anémie, lésions cutanées, toxique pour la reproduction, cancérigène.	INERIS (2010)
<b>Cd</b>	Cancérigène, hypertension, dommages sur le foie et les reins, troubles respiratoires, ostéoporose.	INERIS (2014)
<b>Cr</b>	Cancérigène sous forme Cr (VI), pathologies respiratoires, troubles rénaux et gastro-intestinaux, eczéma.	INERIS (2005)
<b>Ni</b>	Maladies respiratoires, allergies de peau, cancérigène.	INERIS (2006)
<b>Pb</b>	Toxique pour la reproduction, anémie, troubles du système nerveux et dysfonctions rénales.	INERIS (2003)

*NB* : les effets toxiques sur les végétaux seront développés dans le second chapitre de ce mémoire de Thèse.

## **2. Effets toxicologiques des ET et valeurs toxicologiques de référence (VTR)**

L'INERIS rapporte les listes de valeurs toxicologiques de référence (VTR) à partir des bases de données des 6 organismes et agences internationales reconnues : l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'Agence américaine d'inventaire de substances toxiques et des maladies (ATSDR), l'Agence américaine pour la protection de l'environnement (US EPA), l'Institut national de la santé publique et de l'environnement des Pays-Bas (RIVM), Santé Canada et l'Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA, État-Unis). Les VTR caractérisent le lien entre une exposition à une substance toxique et un effet néfaste observé. Elles sont spécifiques d'une substance et de sa spéciation, d'un effet donné, d'une voie de contamination et d'une durée d'exposition. Elles servent d'indice toxicologique tolérable au-delà duquel des effets néfastes sur l'organisme sont observés. Les VTR de quelques ET sont présentées dans le tableau 7.



**Tableau 7.** VTR des effets à seuil de certains ET (d'après Bisson *et al.*, 2009).

ET	Sources	Voie d'exposition	Valeur de référence	Année de révision
As	US EPA	Orale	RfD : $3 \cdot 10^{-4}$ mg. kg <sup>-1</sup> . j <sup>-1</sup>	1993
	RIVM	Inhalation	TCA' : $10^{-3}$ mg. m <sup>3</sup>	2001
	RIVM	Orale	TDI : $10^{-3}$ mg. kg <sup>-1</sup> . j <sup>-1</sup>	2001
Cd	RIVM	Orale	TDI : $5 \cdot 10^{-4}$ mg. kg <sup>-1</sup> . j <sup>-1</sup>	1999
	US EPA	Orale (eau)	RfD : $5 \cdot 10^{-4}$ mg. kg <sup>-1</sup> . j <sup>-1</sup>	1994
		Orale (alimentaire)	RfD : $10^{-3}$ mg. kg <sup>-1</sup> . j <sup>-1</sup>	1994
Cu	OMS	Orale	TDI : 0,5 mg. kg <sup>-1</sup> . j <sup>-1</sup>	2006
	RIVM	Inhalation	TCA : 1 µg. m <sup>-3</sup>	2001
		Orale	TDI : 0,14 mg. kg <sup>-1</sup> . j <sup>-1</sup>	2001
Ni	RIVM	Inhalation	TCA : $5 \cdot 10^{-5}$ mg. m <sup>3</sup>	2001
		Orale	TDI : 50 µg. kg <sup>-1</sup> . j <sup>-1</sup>	2001
Pb	RIVM	Orale	TDI : $3,6 \cdot 10^{-3}$ mg. kg <sup>-1</sup> . j <sup>-1</sup>	2001
Zn	RIVM	Orale	TDI : 0,5 mg. kg <sup>-1</sup> . j <sup>-1</sup>	2001

NB : la circulaire de la DGS de Mars 2006 concernant le choix des VTR recommande par défaut de retenir celles de l'US EPA lorsqu'elles sont disponibles.

Deux types de VTR sont distingués :

- ✓ Les VTR des effets à seuil à partir desquelles un effet survient et s'intensifie avec l'augmentation de la dose administrée. En dessous de ces dernières, le risque est considéré comme nul. Ce sont généralement des effets non cancérogènes et non génotoxiques (Bisson *et al.*, 2009 ; Moussavou Moudouma, 2010). Selon les organismes, il existe plusieurs VTR. L'ATSR parle de MRL (« Minimal Risk levels » ou niveaux de risque minimal), l'US EPA de RfD (« Reference Doses » ou doses de référence) ou de TDI (« Tolerable Daily Intake » ou Dose journalière admissible (DJA)) pour l'OMS, Santé Canada ou RIVM.
- ✓ Les VTR des effets sans seuil à partir desquelles un effet apparaît de manière identique quelle que soit la dose perçue, et donc dont l'intensité de l'effet ne dépend pas de la dose. Cependant, la probabilité de survenue croît avec la dose reçue. Cette notion d'absence de seuil est souvent associée aux effets cancérogènes et génotoxiques (Bisson *et al.*, 2009 ; Moussavou Moudouma, 2010).

Des efforts sont actuellement entrepris dans plusieurs pays pour contrôler les rejets de polluants, de même que pour accélérer le traitement de la pollution existante par des techniques appropriées, dans le but de préserver l'Homme et les écosystèmes.

## **VI. La phytoremédiation des ET : une technologie alternative de dépollution des sols**

### **1. Contexte, enjeux et méthodes de dépollution des sols**

La prise de conscience du risque écologique lié aux sols pollués a émergé relativement tard, il y a 30 à 40 ans, après plus de deux siècles de développement industriel effréné. Plus récemment, vers la fin du XX<sup>ème</sup> siècle, le déclin du secteur industriel a mené à la fermeture de nombreuses exploitations et donc à l'élévation du nombre de friches industrielles. De plus, une pression démographique et donc foncière pèse de manière croissante en zone urbanisée incitant alors à la reconversion de ces friches. Les sites présentant des risques majeurs pour la santé et l'environnement se trouvent donc aux centres des préoccupations sociétales et doivent être dépollués. Dans les années 90, la politique de gestion des sols pollués par les activités industrielles visait à recenser et hiérarchiser ses sites selon leur degré de pollution mais elle évolue aujourd'hui vers une évaluation du risque en fonction de leur usage.

Différentes méthodes ont donc été mises en place pour décontaminer les sols. Les techniques dites traditionnelles ou conventionnelles de traitement des sols pollués sont classées en quatre grandes catégories : les procédés physicochimiques, les procédés thermiques, les procédés biologiques et le confinement. Elles se distinguent par leur mode de mise en œuvre qui peut être *ex situ* ou *in situ* (voir annexe 1). Le coût de mise en œuvre de ces différentes techniques est soumis à une forte variabilité car il dépend fortement des conditions de chantiers (caractéristiques du sol et dimensions du site, localisation et accès au site, nature et concentrations des polluants...). Il n'existe pas un coût fixe pour une technique de dépollution car celui-ci est toujours adapté aux particularités du site, aux besoins et aux usages futurs. De même, l'importance des volumes traités et les délais de traitement imposés sont des paramètres pouvant faire varier largement le coût d'une technique donnée (Ernst et Young, 2014).

Depuis environ deux décennies, les techniques de dépollution évoluent avec le passage progressif des techniques dites traditionnelles aux techniques de biodégradation ainsi que leur cohabitation. Face aux enjeux écologiques, l'article 43 de la loi Grenelle II concernant la réhabilitation des sols pollués, indique que « les techniques de dépollution par les plantes seront de préférence utilisées ». Il devient ainsi capital de limiter les risques liés aux sols pollués en développant des solutions durables et/ou complémentaires à celles déjà existantes, et notamment des techniques alternatives moins dispendieuses et plus écologiques.

## **2. La phytoremédiation, une alternative plus écologique à la dépollution des sols**

### **2.1. Principe général**

Depuis les années 80, la phytoremédiation est un ensemble de technologies prometteuses en plein essor pour le traitement de diverses classes de polluants (pesticides, composés explosifs, hydrocarbures, radionucléides, ET...). Le terme « phytoremédiation » est une combinaison de deux mots : phyto (du grec : plante) et remedium (du latin : pour corriger ou supprimer un mal). Le concept de la phytoremédiation (comme phytoextraction) a été suggéré par Chaney (1983). Celle-ci utilise la capacité naturelle d'espèces végétales, d'algues (phycoremédiation) mais également de champignons (mycoremédiation) à contenir ou dégrader des polluants organiques et/ou inorganiques contenus dans les trois compartiments environnementaux air - eau - sol (Greipsson, 2011). Les composés organiques peuvent être dégradés tandis que les polluants inorganiques peuvent seulement être dilués, concentrés ou déplacés mais pas transformés en produits moins toxiques car ils ne sont pas biodégradables (Rudolph, 2011). La phytoremédiation s'est davantage généralisée en Europe depuis les années 90 mais a d'abord connu une plus forte expansion dans les années 80 en Amérique du Nord (États-Unis et Canada) (Origo *et al.*, 2012).

La phytoremédiation est applicable en zone urbaine et rurale sur une large gamme de sols pollués (agricoles, friches industrielles, sédiments excavés...). Elle intervient dans la réhabilitation des terrains contaminés et donc dans leur reconversion (aménagement agricole, urbain ou de loisirs) (Origo *et al.*, 2012). Elle impacte de façon positive les fonctions et la structure du sol, et est jugée plus conforme aux enjeux du développement durable que les méthodes traditionnelles et se révèle également bien moins onéreuse (Bert *et al.*, 2012). Même si elle n'est adaptée que pour une pollution modérée et présente une contrainte concernant la

durée des traitements, elle offre une alternative aussi bien écologique que paysagère et financière par rapport aux techniques de dépollution traditionnelles (excavation, traitements physico-chimiques...). Ainsi, cette technologie contribue à la reconversion d'un site pollué en espace vert, rehaussant l'esthétisme du paysage et facilitant ainsi la tâche des décideurs de l'aménagement raisonné du territoire.

## **2.2. La phytoremédiation en France et en Europe**

Le marché de la phytoremédiation est seulement naissant en France. D'après les études d'Ernst et Young (2012 et 2014) pour l'ADEME, en 2008, aucun volume de terre n'a été traité par les techniques de phytoremédiation en France tandis qu'en 2010, environ 5800 tonnes ont été traitées par des phytotechnologies. Les techniques de phytoremédiation sont mises en oeuvre essentiellement sur des terrains privés à la fois par des organismes du secteur public et par des industriels du secteur privé. Depuis quelques années, de nombreuses collectivités sont de plus en plus séduites par ces « technologies vertes » et lancent de nombreux appels d'offres pour des aménagements de sites pollués (Bert *et al.*, 2012).

Au niveau européen, les scientifiques ont recensé environ 80 essais en phytoremédiation (dont 12 en France). Ces essais sont conduits dans le cadre de projets de recherche sur d'anciens sites miniers, des friches industrielles, des sols agricoles ainsi que sur des sols excavés pollués par des ET sur des surfaces allant de quelques m<sup>2</sup> à quelques dizaines d'ha. Ces projets sont orientés selon deux axes complémentaires : i) un aspect fondamental visant à acquérir des connaissances approfondies concernant les mécanismes de stabilisation, de tolérance et d'accumulation des plantes afin notamment de les améliorer, ii) un aspect appliqué afin d'optimiser les techniques utilisées ainsi que la valorisation de la biomasse récoltée.

L'ensemble de ces recherches est majoritairement développé et valorisé par le réseau européen de chercheurs COST (Coopération européenne dans le domaine de la Recherche Scientifique et Technique) (Bert *et al.*, 2012). Ce dernier ne finance pas mais encourage la création de réseaux scientifiques innovants et interdisciplinaires en Europe. Il associe des chercheurs et des experts de diverses disciplines de différents pays européens travaillant sur un même sujet. Les actions du COST sont généralement à l'initiative des chercheurs et parfois de la Commission Européenne. Afin de faciliter aux équipes de chercheurs européens l'accès à des

sites expérimentaux « ateliers » ainsi que la mise en commun des connaissances et retours d'expérience, l'ADEME a créé le réseau SAFIR (Site Atelier Français pour l'Innovation et la recherche pour la gestion des sols). C'est le cas par exemple du projet « Phytener » mis en place en 2009 sur le site de l'ancienne fonderie de Pb Metaleurop Nord, située au cœur du bassin minier du Nord-Pas de Calais (Douay et Bidar, 2015). Celle-ci a rejeté des quantités immenses de poussières entre 1894 et 2004, engendrant ainsi d'importantes contaminations en Cd, Pb et Zn sur plusieurs ha de sols agricoles. Dans ce projet, deux parcelles ont été distinguées : la première sur laquelle ont été plantées différentes espèces de *Miscanthus* (famille des Poacées) et l'autre plusieurs espèces ligneuses (Aulnes, Chênes, Érables et Robiniers). Différents paramètres ou pratiques agricoles (densité de rhizome, fertilisation, mycorhization) sont testés ainsi que la valorisation potentielle de la biomasse produite à des fins énergétiques. Les retours se font pas à pas et nécessitent un recul suffisant.

### **2.3. Possibilités d'application**

Avant de choisir parmi les divers procédés de phytoremédiation existant, il est primordial de bien connaître la nature et la biodisponibilité du polluant pour le végétal mais aussi sa localisation dans le substrat afin d'obtenir un traitement optimal.

#### **2.3.1. Application *in situ***

Elle est employée dans le cas de pollutions peu profondes (eaux et sols de surface) et s'avère souvent la moins coûteuse. Dans ce cas, l'accès au substrat contaminé par le système racinaire des espèces plantées est aisé. Concernant les ET, ils sont la plupart du temps extraits et séquestrés dans la plante et ne sont éliminés du milieu que lors de la récolte de celle-ci afin de récupérer les ET (Ghosh et Singh, 2005) (voir VI.3.2.6.)

#### **2.3.2. Application *ex situ***

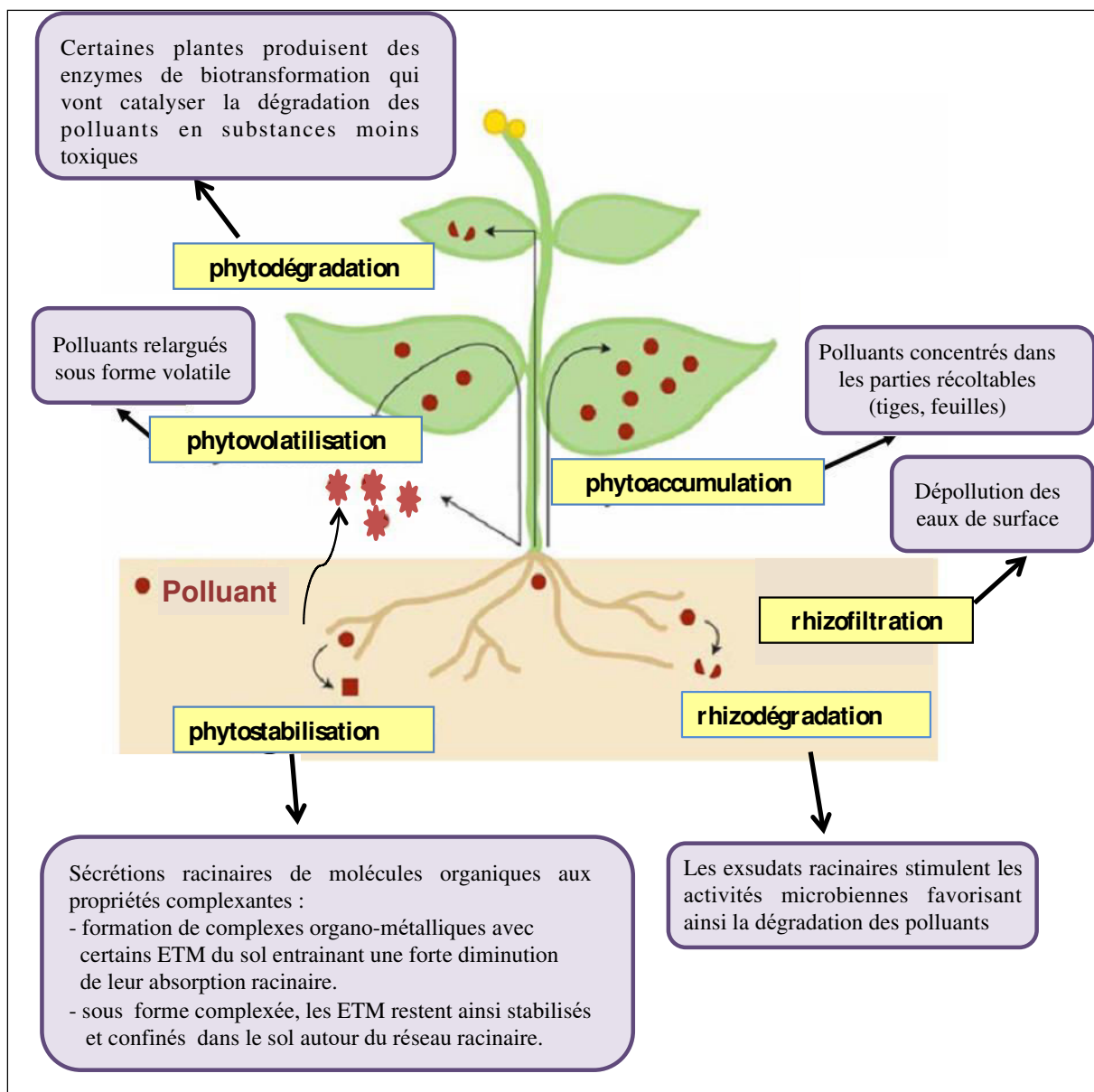
Elle concerne généralement les pollutions profondes (nappe phréatique ou épaisseur de sol polluée importante) souvent peu accessibles au système racinaire des plantes. Elle nécessite une extraction mécanique du substrat contaminé qui est ensuite acheminé vers une zone de traitement dans laquelle il sera mis en contact direct d'espèces végétales sélectionnées. Une fois le polluant extrait et les plantes traitées, le substrat est remplacé sur son site d'origine. Cette méthode est beaucoup plus onéreuse que celle *in situ* (excavation, transport et traitements de la

portion de sol contaminée représentent un certain coût) et trouble davantage l'écosystème du site lors de l'excavation mais aussi lors de la remise sur site du sol traité. Ce type de méthode n'est alors pas plus écologique et économique que les méthodes classiques.

### 3. Les différents procédés de phytoremédiation

La phytoremédiation peut se faire *via* plusieurs grandes méthodes selon le type de polluant et l'espèce végétale utilisée (figure 4) :

- La phytostabilisation a pour but de limiter l'absorption des ET par les plantes et de stabiliser les polluants dans le sol autour du réseau racinaire afin d'empêcher leur dispersion dans l'environnement (Raskin et Ensley, 2000).
- La phytodégradation utilise la capacité de certaines plantes à transformer certains composés organiques polluants en sous-produits moins toxiques pour la plante et ne concerne donc pas les ET (Bert *et al.*, 2012). La rhizodégradation est basée sur le même principe de dégradation de polluants organiques mais fait intervenir des microorganismes du sol dont l'activité de dégradation est stimulée par des exsudats racinaires.
- La phytovolatilisation est une combinaison entre la phytoextraction et la phytodégradation : la plante absorbe un polluant organique ou un ET au niveau de ses racines puis le transfère dans ses parties aériennes au niveau desquelles il sera ensuite transformé puis libéré dans l'atmosphère en une forme volatile moins ou non toxique.
- La phytoaccumulation ou phytoextraction fait intervenir des plantes qui absorbent les polluants du sol ou des eaux par leur système racinaire et les acheminent vers les parties aériennes où ils seront stockés sans être transformés ou dégradés (Rafati *et al.*, 2011). La rhizofiltration est basée sur ce principe mais ce terme est restreint à la décontamination des eaux (Ghosh et Singh, 2005 ; Krischna *et al.*, 2012).



**Figure 4.** Procédés de phytoremédiation d'après Pilon-Smits (2005).

Les polluants (en rouge) peuvent s'accumuler dans la plante en gardant la même forme ou être transformés de diverses façons : stabilisation dans le sol (carré), volatilisation dans l'atmosphère (étoile) ou dégradation dans le sol ou la plante (croissant). Les procédés de dégradation ne sont valables que pour des molécules organiques et pas pour les ET.

### 3.1. La phytostabilisation

Cette technique est utilisée lorsqu'une immobilisation rapide est primordiale, notamment pour la préservation des eaux souterraines et de surface (Gosh et Singh, 2005). Elle permet de rétablir une communauté végétale (espèces tolérantes) sur les sites qui ont été dénudés en raison des niveaux élevés de contamination métallique, mais aussi de réduire le potentiel d'érosion éolienne (et donc la propagation de polluant) ainsi que le lessivage des

contaminants du sol (Raskin et Ensley, 2000). Cette stratégie ne résout pas le problème de pollution mais limite son extension en attendant de mettre en place la phase réelle de décontamination. Ce n'est donc pas une technique de dépollution mais un mode de gestion des sites pollués destiné à immobiliser les polluants dans le sol (Vangronsveld *et al.*, 2009).

L'efficacité de la phytostabilisation est liée à la capacité de sorption d'ET aux racines, de précipitation, de complexation ou de réduction du degré de valence dans la rhizosphère (Wuana et Okieimen, 2011). Le système racinaire, en sécrétant certains composés (notamment des acides organiques comme le citrate, l'oxalate ou le malate) ou enzymes dans le sol, peut réduire la biodisponibilité des ET et donc favoriser leur stabilisation au niveau du sol tout en limitant les dommages potentiels qui pourraient être engendrés en cas d'absorption de ces ET par la plante (Ali *et al.*, 2013). Il a été montré par exemple que l'excrétion racinaire de certaines enzymes entraînait la réduction du Cr (VI) en Cr (III), rendant cet ET moins mobile et moins toxique (Wu *et al.*, 2010a). La littérature donne peu d'exemples de métaux retenus dans le sol par les exsudats racinaires de type acides organiques car ces exsudats ont plutôt l'effet inverse de solubiliser les éléments métalliques. Plusieurs publications font état cependant de la libération par voie racinaire d'acides organiques permettant la stabilisation de l'Al dans le sol. Par exemple, les racines du haricot (*Phaseolus vulgaris*) secrètent du citrate alors que le blé (*Triticum aestivum*) libère essentiellement du malate (Miyasaka *et al.*, 1991 ; Delhaize *et al.*, 1993). Toutefois, certaines espèces peuvent exsuder plus d'un acide comme le seigle (*Secale cereale*) qui excrète à la fois du malate et du citrate (Li *et al.*, 2000). Ces acides organiques sont sécrétés par les racines grâce à des canaux protéiques à anions liés à la membrane plasmique (Ma *et al.*, 2001 ; Pineros et Kochian, 2001).

Les micro-organismes (bactéries, mycorhizes) du sol ont aussi cette capacité de réduction de la biodisponibilité des ET et jouent donc un rôle important dans le cadre de la phytostabilisation (Kumpiene *et al.*, 2009). Afin d'améliorer le procédé, des amendements (ou agents immobilisants) organiques ou minéraux peuvent être ajoutés pour limiter la biodisponibilité des ET. Les plus employés sont des composés phosphatés (phosphate de calcium, apatite), des composés organiques (type compost ou boues), des argiles, des cendres et des produits alcalinisants (chaux) (Bert *et al.*, 2012).



### 3.2. La phytodégradation

Elle se déroule dans la plante elle-même, au niveau des racines et/ou des parties aériennes, impliquant donc l'absorption du polluant au préalable. Elle fait intervenir des enzymes telles que des mono-oxygénases à cytochrome P450 et des glutathion-S-transférases qui sont induites en réponse à la présence des xénobiotiques (Shröder *et al.*, 2007). La phytodégradation peut également s'opérer en dehors de la plante *via* la production d'exsudats riches en enzymes comme des oxydases et des peroxydases (Moussavou Moudouma, 2010 ; Bert *et al.*, 2012 ; Ali *et al.*, 2013). Par ailleurs, les micro-organismes associés aux racines peuvent aussi jouer un rôle dans la dégradation de polluants organiques *via* diverses enzymes (oxydases, peroxydases, laccases, monophénol monooxygénases...) et on parle alors de rhizodégradation (Gramss *et al.*, 1999 ; Criquet *et al.*, 2000). En effet, la pénétration des racines dans le sol favorise son oxygénation et les exsudats racinaires (glucides, acides aminés, flavonoïdes) sécrétés par la plante vont stimuler le développement et la croissance de micro-organismes capables de transformer les polluants. Il a été montré par exemple que les flavonoïdes sécrétés par les racines de certains végétaux peuvent favoriser la croissance de bactéries dégradant les polychlorobiphényles ou PCB (Yadav *et al.*, 2010).

### 3.3. La phytovolatilisation

La capacité de transformer des polluants en molécules non toxiques ou moins toxiques puis de les libérer dans l'atmosphère a essentiellement été étudiée pour les polluants organiques. C'est par exemple le cas de certains composés chlorés comme le trichloroéthylène (TCE) qui peut être libéré sous une forme moins dangereuse. Par exemple, lors d'essais sur terrains, des peupliers hybrides ont été exposés au TCE par injection souterraine et les résultats ont montré que seulement 5 % de celui-ci a été éliminé par évapotranspiration. Par conséquent, la fraction principale a été métabolisée au sein du peuplier en dérivés chlorés (acide di et trichloroacétique, trichloroéthanol) ou entièrement minéralisée en dioxyde de carbone (Orchard *et al.*, 2000 ; Meuser, 2012).

Très peu d'ET peuvent être « traités » par phytovolatilisation, cette capacité de libération atmosphérique n'ayant jusqu'à présent été mise en évidence que pour Se et Hg (Chaney *et al.*, 1997 ; Rugh *et al.*, 1998). L'élément Se peut être trouvé dans des eaux de drainage agricole et dans des effluents des raffineries de pétrole et des centrales électriques. Cet

ET est présent sous plusieurs états d'oxydation, principalement sous forme de séléniate (+VI) et de sélénite (+IV) assimilables par les plantes. Il a été montré que la moutarde indienne pouvait convertir ces deux formes inorganiques en diméthylsélénide, une forme organique volatile 100 fois moins toxique du Se (de Souza *et al.*, 1998 et 1999 ; Meagher, 2000). Concernant Hg, l'efficacité naturelle de phytovolatilisation est faible et le cas le plus souvent cité en exemple est celui d'*Arabidopsis thaliana* sur-exprimant une réductase de l'ion mercurique  $Hg^{2+}$  issue d'une bactérie (Rugh *et al.*, 1996). Cette réductase permet de convertir efficacement  $Hg^{2+}$  en mercure élémentaire  $Hg(0)$ , une forme un peu moins toxique que l'espèce ionique.

Dans le cas des ET, la phytovolatilisation a pour unique avantage de contourner une étape de récolte et d'élimination de la biomasse mais ne résout pas entièrement le problème. En effet, les ET libérés dans l'atmosphère peuvent potentiellement retomber ultérieurement au niveau du sol. C'est d'ailleurs la plus controversée des technologies de phytoremédiation pour les ET (Padmavathiamma et Li, 2007).

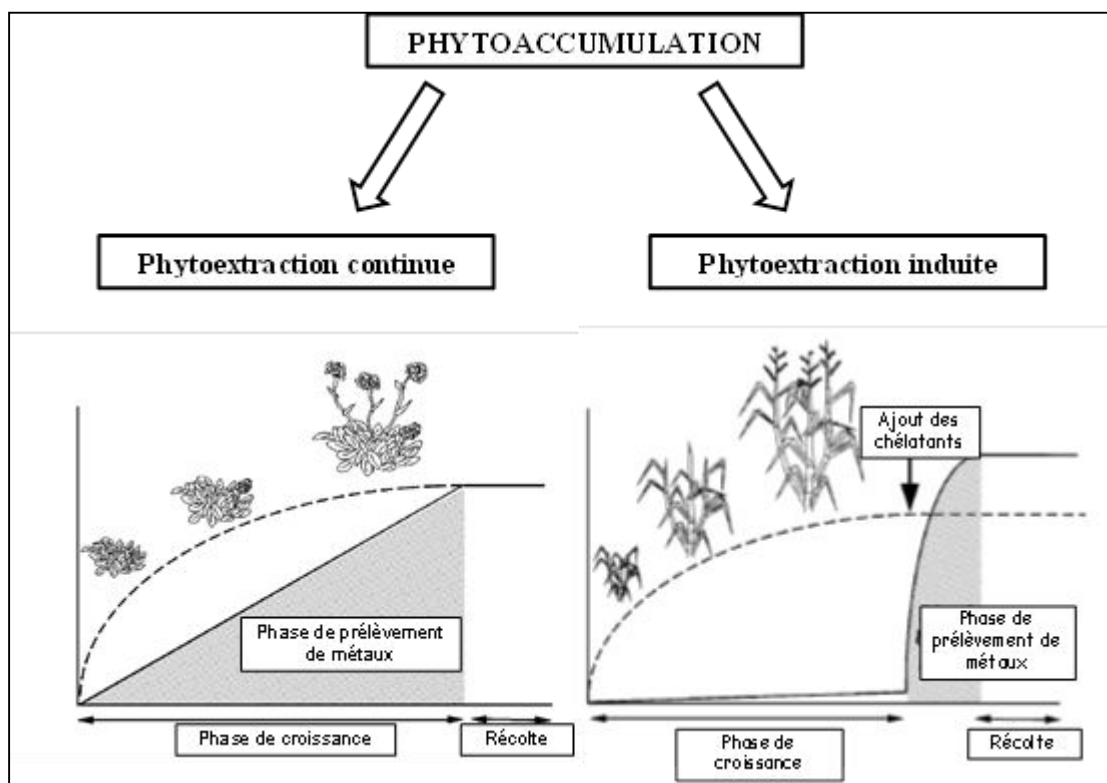
### **3.4. La phytoaccumulation ou phytoextraction**

Ce procédé est principalement utilisé pour les ET et se fait plus rare pour les polluants organiques. Si le polluant reste principalement dans les racines, l'efficacité de cette méthode est alors fortement diminuée, certaines racines ne pouvant pas être arrachées (Tangahu *et al.*, 2011). Il est également à noter que certaines plantes ont la capacité d'accumuler les polluants de l'air à partir des feuilles en raison de leur grande surface d'échange. Les polluants sont d'abord piégés par les poils épidermiques ou trichomes. Une étude réalisée en zone urbaine avec *Canna x generalis* a montré qu'au moins 50 % des particules déposées se trouvaient à la surface de l'épiderme des feuilles (Gawronski *et al.*, 2007). Une partie est éliminée par l'eau de pluie tandis que l'autre pénètre plus profondément dans les couches de cires et est conservée pendant toute la durée de vie de la feuille.

Pour les ET, la phytoextraction a commencé à se développer suite à la découverte d'espèces dites hyperaccumulatrices. Ces espèces sont capables de stocker des quantités importantes d'un ou de plusieurs ET dans les parties aériennes sans effet létal. Les concentrations minimales dans les parties aériennes pour considérer une plante

hyperaccumulatrice ont été fixées à 10 g. kg<sup>-1</sup> MS pour Fe, Mn, U, Zn, 1 g pour Al, As, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Se, 0,1 g pour Cd et 0,001 g pour Hg (Baker et Brooks, 1989 ; Ma *et al.*, 2001 ; Liang *et al.*, 2009 ; van der Ent *et al.*, 2012). Les espèces hyperaccumulatrices sont présentées de manière plus détaillée au chapitre 2, section II.1.

Il se dégage deux stratégies de phytoextraction : la phytoextraction assistée (appelée encore phytoextraction aidée ou induite) et la phytoextraction continue (figure 5). Sur ces deux processus, la phytoextraction assistée est la plus développée et est actuellement mise en œuvre commercialement (Ghosh et Singh, 2005).



**Figure 5.** Schéma représentant les deux stratégies de phytoaccumulation : la phytoextraction continue et la phytoextraction induite par des chélateurs (d'après Salt *et al.*, 1998). La ligne continue représente la concentration de l'ET dans la biomasse aérienne et la ligne en pointillés représente la croissance de la biomasse aérienne au cours du temps.

### 3.4.1. Phytoextraction assistée

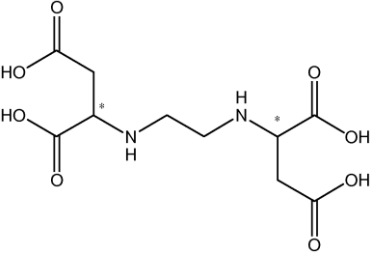
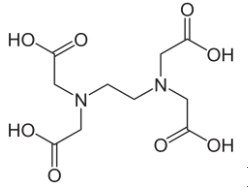
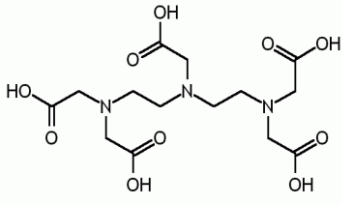
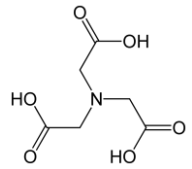
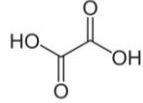
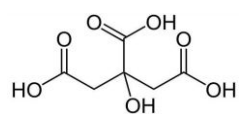
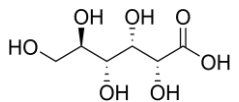
Elle s'effectue par ajout de divers amendements lorsque la plante a atteint un certain niveau de croissance. Ces ajouts permettent d'augmenter les rendements d'extraction de deux manières : soit en favorisant la croissance et donc la biomasse des plantes, soit en rendant davantage biodisponibles les ET présents dans le sol afin de faciliter leur absorption par les

plantes et leur transfert vers les parties aériennes. Il s'agit souvent d'adjonction de chélateurs d'ET qui induisent l'augmentation de la fraction assimilable de l'élément ciblé et favorisent son absorption et son stockage dans le végétal sous forme de complexe chélateur - ET. Néanmoins, cette pratique doit être extrêmement contrôlée car elle peut générer un risque de dispersion des ET vers les nappes phréatiques. Les amendements peuvent être divisés en deux catégories :

- **Les amendements chimiques** sont préférentiellement employés lorsque sont utilisées des plantes non hyperaccumulatrices mais aussi lorsqu'il s'agit d'extraire les éléments traces peu mobiles comme Pb pour lequel il existe très peu d'hyperaccumulatrices (Bert *et al.*, 2012). Par exemple, l'ajout d'agents chélatants tels que l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) et l'acide diéthylène triamine penta-acétique (DTPA) à un sol contaminé en Pb (2,5 g Pb. kg<sup>-1</sup> de sol sec) a permis d'augmenter la concentration de Pb dans les parties aériennes du maïs (*Zea mays*) et du pois (*Pisum sativum*) de 0,5 g. kg<sup>-1</sup> MS à plus de 10 g.kg<sup>-1</sup> MS (Huang *et al.*, 1997). Plusieurs études ont montré que l'EDTA augmentait significativement la translocation du Pb des racines aux organes aériens sous forme complexée Pb - EDTA (Salt *et al.*, 1998 ; Huang et Cunningham, 1996). Une autre étude a montré que le pin de Monterey (*Pinus radiata*) accumulait naturellement 60 à 80 mg Pb. kg<sup>-1</sup> MS mais qu'après ajout d'EDTA, son pouvoir d'absorption avait été multiplié par 5 à 6 (Jarvis et Leung, 2002). D'autres agents chélatants ainsi que des engrais acidifiant le sol (à l'opposé des engrais alcalinisants employés en phytostabilisation) peuvent également être utilisés en phytoaccumulation assistée avec une efficacité variable selon l'espèce végétale et l'ET ciblé (Salt *et al.*, 1998 ; Cooper *et al.*, 1999 ; Evangelou *et al.*, 2007). Une liste non exhaustive d'amendements chimiques régulièrement utilisés est présentée dans le tableau 8.

Parmi les agents chélatants, il est cependant conseillé d'utiliser des molécules biodégradables comme l'EDDS, le NTA ou les acides citrique ou gluconique plutôt que l'EDTA. En effet, ce dernier est faiblement photodégradable et biodégradable et forme des complexes très stables avec certains ET qui sont ainsi facilement lessivables et donc susceptibles d'intégrer la chaîne alimentaire. De plus, des études ont montré la toxicité de l'EDTA sur certains microorganismes et certaines plantes, entraînant alors une diminution de la biomasse aérienne de ces dernières (Epstein *et al.*, 1999 ; Chen et Cutright, 2001 ; Grčman *et al.*, 2001). L'utilisation de l'acide citrique peut être prometteuse car celui-ci est d'origine naturelle, non toxique pour les plantes et facilement biodégradable dans le sol (Smolinska et Krol, 2012).

**Tableau 8.** Exemples de divers amendements chimiques employés en phytoaccumulation aidée (adapté de Bert et al., 2012).

Agent chélatant	Caractéristiques
$\left[ \text{NH}_4^+ \right]_2 \left[ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O}-\text{S}-\text{O}^- \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \right]$ <b>sulfate d'ammonium</b>	Engrais acidifiant
 <b>EDDS</b>	Plus efficace que l'EDTA pour solubiliser Cu et Zn
 <b>EDTA</b>	Plus efficace que l'EDDS pour solubiliser Pb et Cd
 <b>DTPA</b>	
 <b>NTA</b>	Moins efficace que l'EDTA et l'EDDS
<p style="text-align: center;"><b>Acides organiques</b></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div data-bbox="391 1444 582 1601">  <p><b>acide oxalique</b></p> </div> <div data-bbox="614 1444 853 1601">  <p><b>acide citrique</b></p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: center; margin-top: 20px;"> <div data-bbox="391 1635 853 1747">  <p><b>acide gluconique</b></p> </div> </div>	Acides organiques moins efficaces que l'EDTA et l'EDDS

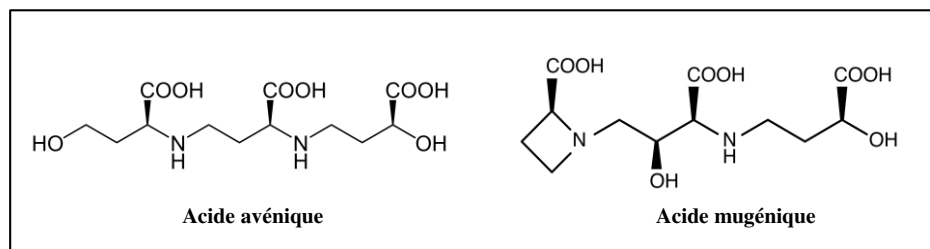
EDDS : éthylène diamine disuccinate

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique

NTA : acide nitrilotri-acétique

DTPA : acide diéthylène triamine penta-acétique

- **Les amendements biologiques** font appel à des bactéries et des champignons mycorhiziens. Certains microorganismes produisent des facteurs de croissance (auxines, gibbérellines, cytokynines) favorisant la croissance du végétal ou des antibiotiques qui vont ainsi inhiber la croissance de pathogènes et donc préserver le développement des plantes. Une étude menée sur le champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius* a mis en évidence la sécrétion par celui-ci de deux antibiotiques antifongiques qui ont été appelés Pisolithin A et B (Tsantrizos *et al.*, 1991). Selon Strenstom *et al.* (1997), les champignons formant des ectomycorhizes agiraient à la fois comme une barrière mécanique (contre les pathogènes qui tenteraient de pénétrer dans la racine) et comme barrière physiologique en dégradant les toxines et les enzymes produites par les pathogènes pour dégrader les tissus des racines. Par ailleurs, certains de ces champignons produisent des composés qui vont augmenter la fraction d'ET facilement assimilable par la plante tels que des acides organiques, des biosurfactants et des sidérophores (chélateurs de Fe synthétisés par les microorganismes en réponse à une carence en celui-ci). Il est à noter que les racines de certaines plantes et notamment celles appartenant à la famille des Poacées produisent des phytosidérophores comme les acides mugénique et avénique (figure 6) qui forment des liaisons de coordination avec le  $Fe^{3+}$  *via* leurs groupements amine et carboxyle (Hopkins, 2003). Le complexe Fe-(phyto)sidérophore est ensuite absorbé par les racines.



**Figure 6.** Formules chimiques de deux phytosidérophores : les acides avénique et mugénique.

NB : pour Chaney, un des premiers à suggérer le concept de phytoextraction en 1983, « cette méthode n'est pas acceptable » (en raison de la lixiviation des ET *via* les agents chélatants ajoutés), « voire impossible », du fait que les plantes utilisées ne possèdent pas la capacité à extraire sélectivement des niveaux anormalement élevés de métaux à partir d'un sol naturel ou de mélanges d'éléments du sol comme cela est le cas avec les véritables espèces hyperaccumulatrices (Chaney *et al.*, 2005 et 2007). C'est un fervent partisan de la phytoextraction continue.

### 3.4.2. Phytoextraction continue

Elle se fait naturellement grâce à l'utilisation de plantes hyperaccumulatrices aux capacités physiologiques et génétiques spécialisées dans l'absorption, la translocation et la tolérance des ET. L'efficacité de la plupart des hyperaccumulateurs métalliques est souvent limitée par leur taux de croissance lent et/ou leur biomasse relativement faible (Tong *et al.*, 2004 ; Ali *et al.*, 2013). De plus, il existe peu d'espèces hyperaccumulatrices de certains ET réputés très toxiques comme As, Cd, Pb ou U. Pour pallier à ces contraintes, la compréhension et l'identification des mécanismes biologiques de l'hyperaccumulation peuvent aider à cibler des plantes efficaces pour cette technique. Dans plusieurs pays, le recours aux plantes génétiquement modifiées est considéré comme une technologie d'avenir. Ainsi, selon Chaney *et al.* (2007), transférer à des plantes hyperaccumulatrices des gènes pouvant augmenter leur biomasse ou améliorer leur adaptation aux sols contaminés présenterait l'avantage d'avoir une biomasse élevée, paramètre intéressant pour augmenter l'efficacité du procédé de phytoextraction.

Les plantes idéales pour la phytoextraction devraient donc avoir un système racinaire dense et profond, une croissance rapide et une biomasse importante, tolérer et accumuler des concentrations élevées d'ET dans leur parties aériennes et être facilement cultivables et récoltables (Tong *et al.*, 2004 ; Bert *et al.*, 2012). De plus, les plantes utilisées devraient être de préférence des espèces locales (mieux adaptées au climat et sans risque de devenir des espèces invasives) et non appétantes pour les herbivores. Elles peuvent être à cycle court afin de favoriser pendant l'année plusieurs récoltes des parties aériennes enrichies en polluant(s), ou pérennes pour éviter des plantations fréquentes (coûteuses en temps et donc en argent). L'utilisation d'arbres plutôt que d'herbacées pour la phytoextraction est de plus en plus étudiée, d'une part pour la profondeur du système racinaire de ces derniers, et d'autre part pour la forte biomasse qui peut être par la suite valorisée dans de nombreux secteurs. Le choix des arbres pour la phytoextraction sera décrit dans la troisième partie de l'introduction bibliographique (« Positionnement du sujet et objectifs ») car ce sont des modèles ligneux qui ont été choisis dans le cadre des travaux de cette Thèse.

### **3.4.3. Évaluation de la performance de la phytoextraction**

L'efficacité de la phytoextraction peut être évaluée par le rendement de la culture (quantité d'ET extraite en kg par ha et par an) et le calcul des facteurs de translocation (FT) et de bioconcentration (FBC). FT indique l'efficacité de la plante à acheminer l'élément accumulé depuis ses racines vers ses parties aériennes (Padmavathiamma et Li, 2007). Il se calcule par le ratio entre la concentration de l'ET dans les parties aériennes et la concentration dans les racines. FBC correspond à l'efficacité de la plante à accumuler dans ses parties aériennes un ET présent dans le sol. Il se calcule par le ratio entre la concentration de l'ET dans les parties aériennes et dans le sol (Zhuang *et al.*, 2007). Il est également possible de le calculer à partir de la fraction biodisponible d'ET. Les plantes ayant un FBC et un FT supérieurs à 1, un système racinaire dense et profond ainsi qu'une forte biomasse, seront donc les plus performantes à la phytoextraction (Yoon *et al.*, 2006 ; Bert *et al.*, 2012). Les espèces hyperaccumulatrices ont un FBC supérieur à 1, atteignant parfois 50 ou 100 (Cluis, 2004). Cependant, comme mentionné précédemment, les espèces hyperaccumulatrices n'ont pas toutes une biomasse suffisante pour être efficaces à grande échelle.

### **3.4.4. Valorisation de la biomasse issue de la phytoextraction**

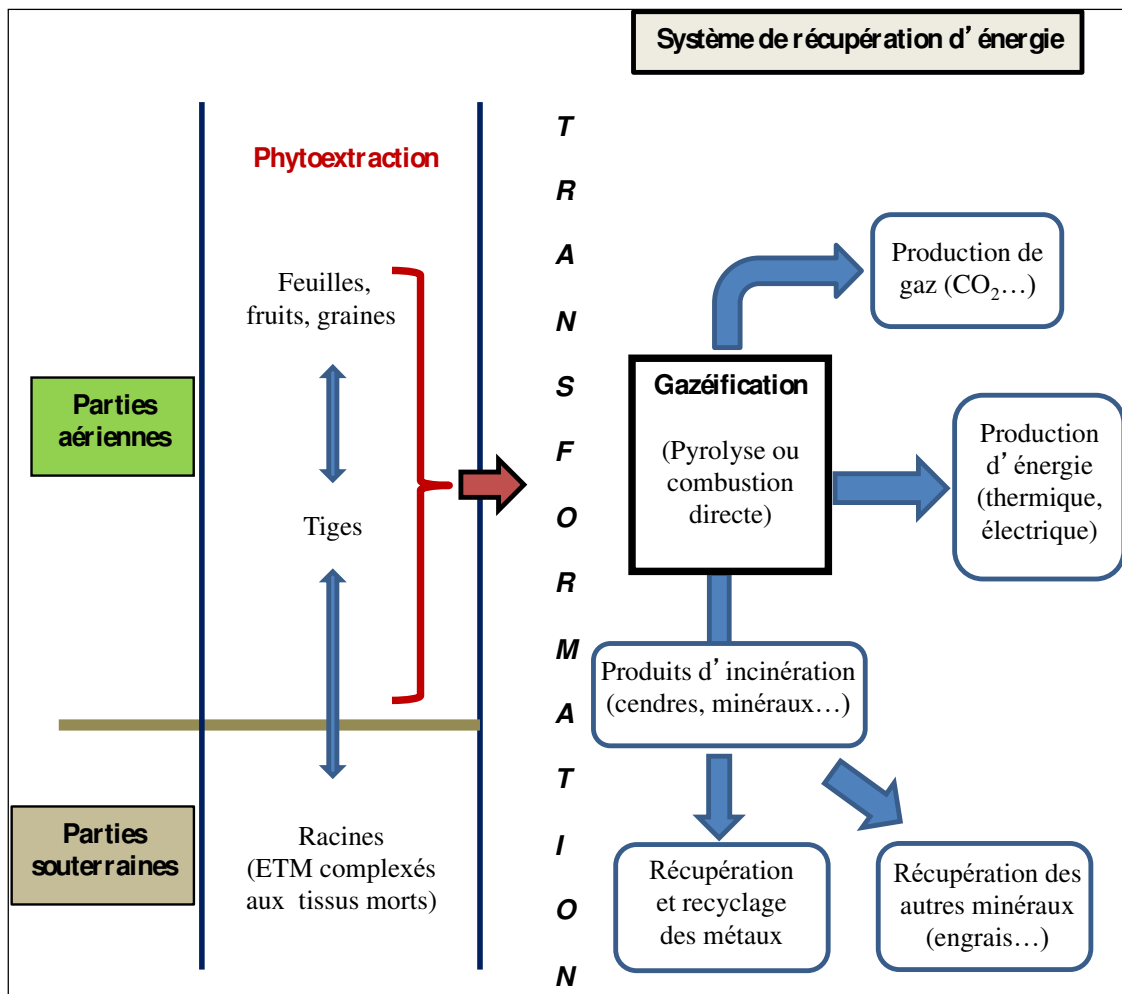
Lors d'un processus de phytoextraction, il est important de prendre en compte le traitement de la biomasse générée par les plantes utilisées. Au-delà du fait qu'elles soient aussi sélectionnées en fonction du ou des polluant(s) à traiter, ces plantes, après récolte et combustion, peuvent être éliminées comme des déchets dangereux et disposées dans un site d'enfouissement sécurisé (Chaney *et al.*, 2005). Ainsi le volume de cendres contaminées à mettre en décharges spécialisées est nettement diminué par rapport au volume de biomasse initiale. Cependant, la phytoremédiation comme technologie d'assainissement du sol est seulement possible lorsque la biomasse produite peut être valorisée afin de diminuer son coût de mise en œuvre (Meers *et al.*, 2010). En phytoremédiation, la phytoextraction est la technologie la plus viable économiquement. Les espèces utilisées pour cette technique peuvent être récoltées et transformées pour de la phytomine (« phytomining » en anglais), un procédé qui consiste à brûler la biomasse végétale ayant accumulé les ET pour, d'une part produire de l'énergie, et d'autre part traiter les cendres restantes (appelées « bio-minerai » ou « bio-ore » en anglais) afin de récupérer et exploiter les ET précieux ou industriellement importants (Brooks *et al.*, 1998 ; Prasad, 2003 ; Sheoran *et al.*, 2011). Néanmoins, la viabilité commerciale de la



phytomine dépend de nombreux facteurs tels que l'efficacité de la phytoextraction et la valeur actuelle du marché des ET traités (Ali *et al.*, 2013).

La phytomine est utilisée commercialement pour le Ni et s'avère plus rentable que les méthodes classiques d'extraction (Chaney *et al.*, 2005). Des essais menés en plein champ avec la Brassicacée *Alyssum murale* ont montré que Ni était très abondant dans celle-ci lors de sa floraison, ce qui a permis de sélectionner le stade de récolte idéal pour une extraction maximale (Bani *et al.*, 2007). Les auteurs ont également montré que la combinaison d'une bonne fertilisation NPK (Azote, Phosphore, Potassium) en présence d'un herbicide (pour se débarrasser des plantes concurrentes) augmentait énormément le rendement d'extraction jusqu'à obtenir 100 kg Ni. ha<sup>-1</sup>. Aussi, par optimisation des différentes étapes d'extraction à partir de cette espèce, le rendement pourrait être augmenté jusqu'à 200 kg. ha<sup>-1</sup>. Le procédé d'extraction fait l'objet d'un brevet international (Brevet : N/Réf : 00 5199-0025). Celui-ci explique le procédé de production d'un sel de Ni à haute valeur économique (plus forte valeur ajoutée que le Ni seul) à partir de plantes hyperaccumulatrices par traitement hydrométallurgique (Barbaroux *et al.*, 2012). Un traitement pyrométallurgique est aussi possible pour récupérer directement le Ni. Les expérimentations sont actuellement au stade pilote en France. De même, il a été montré que la valeur du Ni contenue dans la biomasse d'*A. murale* pouvait dépasser 16 000 \$ par ha, le prix de celui-ci étant de 40 \$ par kg en 2006 (Chaney *et al.*, 2007). Ces plantes constituent ainsi des mines d'un nouveau genre.

L'avantage de la phytomine est aussi la production d'énergie provenant de la pyrolyse de la biomasse (Anderson *et al.*, 1999). Par exemple, la gazéification est une alternative économique très intéressante qui permet de transformer la biomasse en gaz combustible valorisable (figure 7). La biomasse est dans un premier temps séchée puis soumise à une pyrolyse (décomposition de la matière organique sous l'effet de la chaleur en absence d'O<sub>2</sub>) pour être réduite à l'état de charbon de bois. Sous l'effet du chauffage (entre 300 et 700 °C), des gaz volatiles (CO, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>) se forment à l'intérieur à partir de l'hydrogène, de l'oxygène et du carbone présents dans le charbon, puis sont évacuées (Babu et Chaurasia, 2003). Enfin, le gaz combustible de synthèse est récupéré pour être valorisé dans plusieurs utilisations : génération d'électricité et de chaleur, production de biométhane...



**Figure 7.** Valorisation post-récolte des plantes utilisées pour la phytoextraction d'ET (figure adaptée de Ghosh et Singh, 2005).

Les divers procédés de réduction et séparation de la biomasse permettent non seulement de récupérer les ET mais aussi de fournir du gaz et de l'énergie, diminuant ainsi les coûts.

Les technologies modernes actuelles de nettoyage des fumées et gaz issus de ces procédés assurent la capture efficace des ET s'y trouvant (Gosh et Singh, 2005). La plupart des technologies de contrôle concernant les émissions des ET par l'incinération des déchets ménagers peuvent être appliquées à des systèmes de combustion de charbon ou de bois car les processus sont assez similaires (Xu *et al.*, 2003). La majeure partie des ET trouvés dans les fumées existe en tant que particules fines. Cependant, une fraction notable de certains d'entre eux (tels que B, Hg et Se) est volatile et donc existe dans la phase gazeuse (Andren *et al.*, 1975 ; Bergstrom, 1986). Le traitement des fumées fait intervenir diverses techniques, souvent complémentaires :

- Précipitateur électrostatique (ou électrofitre) qui utilise les forces électriques pour séparer les particules solides.
- Filtre à manches : les fumées chargées de poussières sont passées à travers un média filtrant qui va retenir les poussières. Le média filtrant est souvent agencé en manches constituées de grandes chaussettes pouvant être de nature diverse (tissu, feutre...) d'une longueur variant entre 3 et 6 m et d'un diamètre de 150 mm environ.
- La neutralisation des gaz acides et la captation des ET s'opèrent par une sorte de « douche » appelée « lavage des fumées ». Elle consiste en l'injection d'un réactif sec (chaux spongiacale, charbon actif) ou humide (lait de chaux).

Depuis quelques années, d'autres secteurs de valorisation voient le jour comme par exemple la biocatalyse qui consiste à utiliser des molécules naturelles (comme des enzymes par exemple) comme catalyseur. La « chimie verte » est en effet en recherche permanente de nouveaux procédés de catalyse moins polluants. Plusieurs équipes se tournent depuis quelques années vers l'identification et la valorisation de molécules produites par les plantes ayant accumulé de grandes quantités d'ET (Escande *et al.*, 2014).

#### **4. Avantages et limites de la phytoremédiation**

##### **4.1. Avantages**

Les techniques de phytoremédiation fournissent de nombreux avantages. Tout d'abord, elles sont adaptables à la taille des sites à traiter et s'appliquent *in situ* sur une large variété de sites pollués (sols agricoles, friches industrielles, sédiments excavés...) en milieu rural et urbain (Garbisu et Alkora, 2003). D'un point de vue environnemental, elles limitent l'érosion des sols et la propagation des polluants (par lessivage et/ou envol de poussières) et permettent de maintenir ou de restaurer la microflore et la microfaune, donc de préserver une certaine biodiversité (Chaudhry *et al.*, 1998 ; Bert *et al.*, 2012). En effet, ce sont des méthodes de dépollution « douces » qui perturbent peu l'environnement car elles font appel à des ressources naturelles renouvelables (les végétaux) utilisant le soleil comme source d'énergie pour leur croissance. Contrairement à l'emploi de procédés chimiques, il n'y a pas d'impacts négatifs sur la biodiversité ; le fonctionnement du sol est ainsi préservé et réactivé. Les plantations peuvent de plus améliorer l'attractivité d'un site, rehaussant l'esthétisme du paysage tout en n'occasionnant pas de nuisances sonores pendant le traitement (Pilon-Smith, 2005). A ce titre,

les techniques de phytoremédiation sont en adéquation avec les principes du développement durable et bénéficient d'un écho favorable de l'opinion publique (Chaney, 1983 ; Bert *et al.*, 2012).

Outre l'aspect environnemental, la phytoremédiation est aussi l'occasion de développer de nouveaux marchés économiques et de générer des emplois. En effet, les différentes étapes dans les procédés de phytoremédiation font intervenir de nombreux acteurs : économistes, scientifiques, pépiniéristes, semenciers, paysagistes, producteurs d'amendements, les métiers relevant de l'agriculture, des espaces verts et de la foresterie, le secteur de l'énergie... Tous ces corps de métier participent à différents niveaux du déroulement des procédés : mise en place, suivi, entretien quotidien jusqu'à la gestion des récoltes, traitements de la biomasse produite... De plus, les procédés de phytoremédiation, et tout particulièrement la phytoextraction, s'avèrent économiquement viables dans la mesure où ils utilisent beaucoup de méthodes et engins d'exploitation communs avec le secteur agricole (Prasad, 2003 ; Wuana et Okiemen, 2011). Selon Colombano *et al.* (2010), il faut compter entre 20 et 40 € par m<sup>2</sup> de surface de sol traité pour la phytoextraction. Cependant, seul le suivi des phytotechnologies à grande échelle et sur le long terme permettra d'évaluer le positionnement économique de celles-ci par rapport aux autres techniques traditionnelles (Ernst et Young, 2012). En effet, l'analyse économique globale de ces filières reste encore à poursuivre en tenant compte des différents scénarii de valorisation de la biomasse, des coûts liés à leurs diverses étapes de mise en place sur le site, du suivi de leur performance et de leur surveillance sur le long terme. En résumé, la phytoremédiation permet la réhabilitation d'écosystèmes perturbés tout en générant des bénéfices écologiques et socio- économiques.

#### **4.2. Limites et contraintes**

Bien que la phytoremédiation soit une approche prometteuse pour la décontamination des sols par des ET, elle possède également certains désavantages pouvant limiter son application. Le principal point limitant souvent cité dans la littérature est la durée requise pour assainir les sites car elle dépasse de loin celle des autres technologies (Karami et Shamsuddin, 2010 ; Ali *et al.*, 2013). Le temps nécessaire dépend de plusieurs facteurs : le nombre et le type de plantes utilisées, le niveau et le type de pollution, l'étendue et la profondeur du site pollué, la composition du sol, les conditions climatiques... Globalement, il faut des dizaines d'années

pour dépolluer un site là où un traitement conventionnel ne prendrait que 2 ou 3 ans (Kumar *et al.*, 1995 ; Blaylock et Huang, 2000).

L'autre élément limitant est que les procédés de phytoremédiation sont seulement applicables aux sites faiblement ou moyennement pollués afin de permettre une croissance correcte des végétaux cultivés. De plus, la décontamination du sol est fonction de la profondeur occupée par les racines (même si le procédé peut être plus efficace à ce niveau en utilisant des arbres). Il faut également garder à l'esprit que l'extraction des ET n'est que partielle étant donné que les racines n'absorbent que la fraction biodisponible (Bert *et al.*, 2012). Certes, l'ajout de chélatants pour augmenter la biodisponibilité des ET peut lever partiellement ce problème mais il augmente en parallèle le risque de lixiviation des ET s'ils deviennent trop mobiles dans le sol. Enfin, un autre élément à prendre en compte est le fait qu'un site contaminé l'est rarement par un seul polluant. Dans le cas des ET, les sites sont souvent contaminés par un mélange d'ET en concentrations variables et il n'est donc pas évident de trouver une espèce capable d'accumuler en quantité suffisante tous les ET présents (Bonet *et al.*, 2016). Néanmoins, il est possible d'envisager des plantations d'espèces différentes possédant chacune des caractéristiques propres intéressantes pour la dépollution du site en question.

L'essor des activités humaines a causé des dégâts considérables sur l'environnement. Ces activités représentent notamment la source principale d'introduction des ET dans les différents compartiments environnementaux (eau - air - sol) en diminuant leur temps de résidence naturelle dans la roche. La présence d'ET dans le sol engendre de nombreux effets néfastes sur les écosystèmes et notamment sur les plantes. Certaines espèces ont développé des moyens de protection efficaces pour s'en protéger. Ces facultés naturelles sont exploitées en phytoremédiation et notamment en phytoextraction. Cette technique est de plus en plus étudiée et présente de nombreux atouts car c'est une alternative moins coûteuse et plus écologique que les méthodes conventionnelles plus « agressives ». Il est donc important de bien comprendre les divers mécanismes impliqués dans la tolérance de certains végétaux aux ET pour une meilleure exploitation dans la mise en œuvre de la phytoaccumulation.

## Deuxième partie :

### **Toxicité des ET et mécanismes de tolérance des végétaux**

Comme indiqué dans le chapitre précédent de cette introduction bibliographique, les végétaux sont de plus en plus exposés à la pollution métallique, laquelle est principalement dûe au développement des activités anthropiques. Les ET peuvent avoir des effets néfastes sur les plantes mais à l'opposé ces dernières détiennent un large panel de composés de défense et des stratégies de tolérance qui varient en fonction des espèces et des ET. La compréhension des mécanismes de tolérance à ces ET depuis la phase d'absorption racinaire jusqu'au processus de compartimentation au niveau des parties aériennes est nécessaire pour appréhender les possibilités d'optimisation de la phytoextraction.

#### **I. Effet toxiques des ET et tolérance des plantes**

Toutes les espèces végétales ne réagissent pas de la même manière en réponse aux pollutions métalliques. Certaines espèces sont incapables de se défendre et présentent rapidement des symptômes de toxicité tandis que d'autres peuvent se développer sur des sols fortement contaminés en ET sans altérations notables. La tolérance aux ET dépend non seulement de l'espèce végétale mais aussi de l'ET considéré car certains cations métalliques s'avèrent potentiellement plus toxiques que d'autres à concentrations égales.

##### **1. Phytotoxicité des ET**

La phytotoxicité est définie comme étant la capacité d'un composé à engendrer provisoirement ou durablement des dégâts sur les végétaux pouvant entraîner leur mort. Certains ET sont qualifiés d'oligo-éléments (Cu, Zn, Fe, Mo, B, Cl, Ni, Mn), c'est-à-dire des éléments indispensables en petite quantité pour le bon fonctionnement des processus biologiques. Par exemple, les plantes utilisent le Cu comme cofacteur pour une large gamme de voies métaboliques comme la photosynthèse et la respiration mitochondriale. Cet ET intervient notamment dans le métabolisme du carbone et de l'azote, la perception de l'éthylène ou encore la synthèse des lignines en servant de cofacteur de l'amine oxydase (qui génère du peroxyde d'hydrogène pour la lignification) et de la laccase (Yruela, 2005 ; Hänsch et Mendel, 2009 ; Penarrubia *et al.*, 2010). A l'opposé, d'autres ET (Cd, Pb, Hg, Sb) sont considérés

comme ne jouant aucun rôle au sein de la plante. Ces éléments non essentiels possèdent des caractéristiques proches des éléments essentiels et peuvent agir par « mimétisme » non seulement au niveau de l'absorption racinaire mais aussi en interagissant avec de nombreuses molécules dans les cellules végétales (Durand, 2009). Cependant, les ET sont tous potentiellement toxiques pour les plantes qu'ils soient considérés comme essentiels ou non au développement des végétaux. Ainsi à forte concentration, le Cu peut entraîner une toxicité comparable à celle provoquée par des ET qui n'ont pas de fonction connue dans le métabolisme de la plante comme le Cd et le Pb.

Dans cette étude, nous nous intéressons à la pollution métallique et donc à l'excès métallique. Celui-ci est généralement perçu par les plantes comme un facteur de stress provoquant une modification de leurs réactions physiologiques (Sobkowiak et Deckert, 2003 ; Sharma et Dubey, 2005 ; Clemens, 2006 ; Pourrut *et al.*, 2011 ; Fahr *et al.*, 2013). La santé des végétaux est ainsi menacée par ces excès métalliques étant donné qu'ils peuvent les absorber facilement et les accumuler dans différents organes (Sharma et Dubey, 2005). A l'heure actuelle, le Cd est un des ET les plus étudiés car reconnu comme un des plus toxiques, notamment pour les plantes vasculaires (Jones *et al.*, 1993 ; Clemens, 2006). Sa phytotoxicité est en effet 2 à 20 fois supérieure à celle des autres ET à concentration équivalente (Vassilev *et al.*, 1998).

### **1.1. Effets des ET sur la croissance**

L'effet le plus visible d'un excès d'ET sur les plantes est une réduction de la croissance (Hara et Sonoda, 1979 ; Breckle et Kahle, 1992 ; Sobkowiak et Deckert, 2003 ; Finnegan *et al.*, 2012 ; Farid *et al.*, 2013). Les organes qui présentent le plus rapidement un ralentissement de croissance et des modifications morphologiques détectables sont ceux se trouvant en contact direct avec l'ET en excès (Baker et Walker, 1989). Ainsi, pour les plantes qui se développent sur des sols contaminés, les racines sont généralement les premiers organes touchés (Ernst *et al.*, 1992 ; Meharg, 1994 ; Sharma et Dubey, 2005 ; Sun *et al.*, 2010).

Les ET affectent la croissance des plantes en perturbant notamment l'absorption minérale et hydrique au niveau des racines (Barceló et Poschenrieder, 1990 ; Costa *et al.*, 1994 ; Costa et Morel, 1994 ; Rubio *et al.*, 1994 ; Ouariti *et al.*, 1997 ; Vassilev *et al.*, 1998). Le xylème

est un tissu central de l'architecture hydraulique de la plante car il influence la conductivité, le potentiel de croissance et la capacité à faire face à la sécheresse (Zimmermann, 1983 ; Nijssen *et al.*, 2001 ; Solari *et al.*, 2006). Il a été montré que les ET peuvent affecter la structure du xylème en réduisant la taille des vaisseaux conducteurs, leur densité ainsi que de leur conductivité hydraulique, interférant ainsi négativement sur les relations plante - eau (Lamoreux et Chaney, 1977 ; Barceló *et al.*, 1988 ; Kasim, 2006 et 2007 ; de Silva *et al.*, 2012). Concernant la perturbation de la nutrition minérale, il a été montré que le Cd par exemple pouvait interférer avec l'absorption et le transport de plusieurs minéraux essentiels (Ca, Mg, K, P) ainsi qu'avec celui de l'eau. Il entraîne alors une moins grande assimilation de ces derniers (suite à l'effet de compétition) et donc des carences (Das *et al.*, 1997 ; Cheng, 2003). Le Cd réduit également l'absorption d'azote et son transport ascendant dans la plante en inhibant l'activité de la nitrate réductase dans les parties aériennes (Hernandez *et al.*, 1996).

Au niveau cellulaire, la croissance résulte du processus de division et surtout du processus d'élongation, lequel est majoritairement contrôlé par les auxines et par la pression de turgescence, c'est-à-dire la force exercée sur les parois par l'eau ayant pénétré dans la vacuole par osmose (Hopkins, 2003). L'exposition à des ET peut provoquer une inhibition de la division cellulaire, une diminution de l'élongation cellulaire ou les deux processus à la fois (Barceló et Poschenrieder, 1990 ; Arduini *et al.*, 1994 ; Costa *et al.*, 1994 ; Cheng, 2003 ; Fusconi *et al.*, 2006). L'absorption hydrique étant perturbée, la turgescence diminue entraînant une réduction de l'élasticité de la paroi, laquelle conduit ainsi à une diminution de l'élongation cellulaire. Sun *et al.* (2010) ont mis en évidence l'inhibition de l'élongation cellulaire des racines chez *Arabidopsis thaliana* par l'aluminium ( $Al^{3+}$ ). Ce dernier perturberait en effet la distribution de l'auxine en altérant l'expression des gènes *PIN* impliqués dans le transport de ce facteur de croissance. Une diminution de l'extensibilité pariétale peut aussi résulter de la diminution de la synthèse de constituants de la paroi cellulaire (Barceló et Poschenrieder, 1990). En effet, il a été montré que l'Al et le Cr pouvaient altérer la synthèse de certains composés pariétaux au niveau de l'appareil de Golgi (Bennet *et al.*, 1985 ; Vázquez *et al.*, 1987). Il a également été rapporté que les ET peuvent altérer l'assemblage des composants pariétaux (Huck, 1972 ; Barceló et Poschenrieder, 1990). Certains auteurs estiment aussi que l'adsorption des ET par les molécules de la paroi pourrait contribuer à la diminution de l'extensibilité pariétale, affectant ainsi l'élongation cellulaire (Gunsé *et al.*, 1992 ; Zheng *et al.*, 2003).

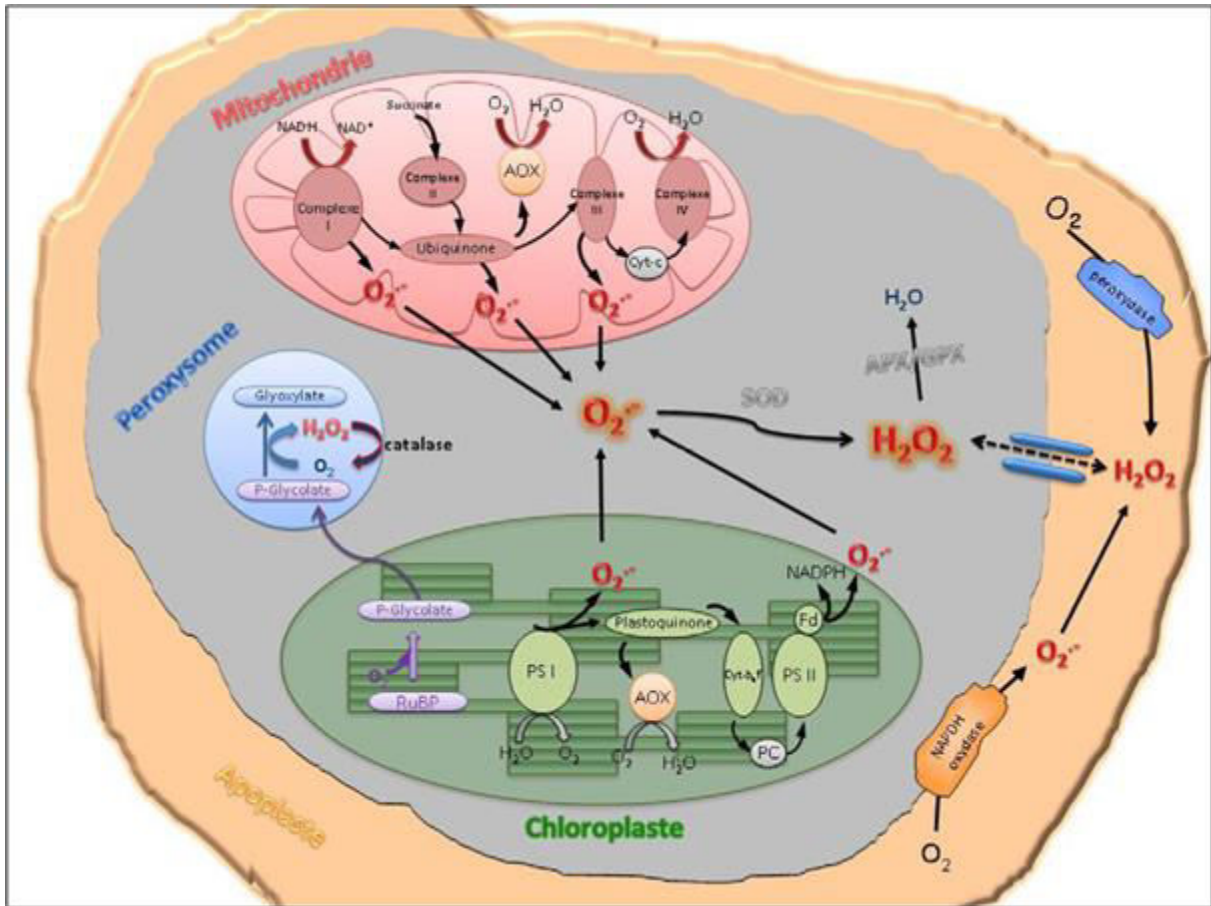


## **1.2. Altération d'activités enzymatiques**

En se liant aux groupes thiols, à des fonctions azotées ou oxygénées des enzymes, certains ET peuvent provoquer des modifications de leur conformation et leur inactivation (Patra *et al.*, 2004 ; Benavides *et al.*, 2005 ; Clemens, 2006 ; Hossain *et al.*, 2012). Certains ET peuvent également se substituer à d'autres ET présents au niveau des domaines catalytiques des enzymes, inhibant ainsi l'activité de ces dernières (Van Assche et Clijsters, 1990 ; Das *et al.*, 1997 ; Durand, 2009). La perte d'activité d'enzymes liée à un excès d'ET dans les cellules perturbe ainsi des processus vitaux comme la photosynthèse, la respiration et perturbe également l'intégrité membranaire (Peixoto *et al.*, 2001 ; Cheng *et al.*, 2003 ; Heckathorn *et al.*, 2004 ; Sandalio *et al.*, 2001 ; Hossain *et al.*, 2012 ; Farid *et al.*, 2013).

## **1.3. ET et stress oxydant**

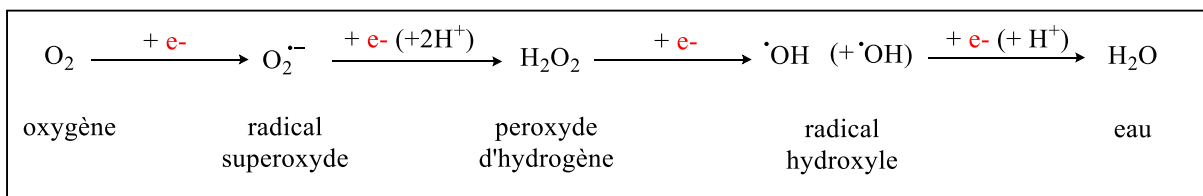
Un déséquilibre entre systèmes producteurs d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et systèmes de défense caractérise l'état de stress oxydant (Halliwell et Gutteridge, 1999). Les ET peuvent induire une surproduction d'ERO pouvant conduire à la mort cellulaire (Halliwell et Gutteridge, 1984 ; Dietz *et al.*, 1999 ; Sandialo *et al.*, 2001 ; Hall, 2002 ; Poschenrieder et Barceló, 2004 ; Parent *et al.*, 2008). Les ERO sont souvent des radicaux libres, c'est-à-dire des espèces chimiques possédant un électron non apparié sur leur couche externe qui leur confère une haute réactivité. Les ERO sont générées lors des procédés de génération d'énergie, c'est-à-dire la respiration dans les mitochondries et la photosynthèse au niveau des chloroplastes (Apel et Hirt, 2004 ; Navrot *et al.*, 2007). Les peroxysomes sont également une source de production d'ERO lors de la conversion du phosphoglycolate (produit dans les chloroplastes) en glyoxylate par la glycolate oxydase (figure 8).



**Figure 8.** Sites de production des formes réactives de l'oxygène (ERO) dans la cellule végétale (d'après Parent *et al.*, 2008).

AOX : oxydase alternative ; APX : ascorbate peroxydase ; cyt : cytochrome ; PCy : plastocyanine ; Fd : ferrédoxine ; GPX : glutathion peroxydase ; NAD(P) (+/H) : nicotianamide adénine dinucléotide (phosphate) (oxydé/réduit) ; PSI (II) : photosystème I (II) ; RuBP : ribulose 1,5-bisphosphate ; SOD : superoxyde dismutase.

Au niveau des mitochondries, la majeure partie de l'oxygène subit une réduction tétravalente (addition de 4 électrons) conduisant à la production d'eau selon la réaction présentée sur la figure 9.



**Figure 9.** Intermédiaire réduits de l'oxygène.

Les cytochromes de la chaîne respiratoire peuvent effectuer une réduction incomplète de l'oxygène conduisant à la production d'ERO. Au niveau des chloroplastes, les chaînes de transfert d'électrons sont également capables de produire de grandes quantités d'ERO lors d'un stress métallique (Parent *et al.*, 2008). Les ERO sont des radicaux superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), perhydroxyle ( $HO_2^{\cdot}$ ), peroxyde ( $RO_2^{\cdot}$ ), alkoxyde ( $RO^{\cdot}$ ) et hydroxyle ( $^{\cdot}OH$ ) ainsi que des formes non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (Parent *et al.*, 2008 ; Gardès-Albert *et al.*, 2003 ; Choudhury *et al.*, 2013).

La toxicité des ERO est aussi liée à leur durée de vie au sein des cellules. Par exemple, la durée de vie de quelques secondes du radical superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  lui permet de diffuser au-delà de son lieu de production. Sa toxicité est principalement due au fait qu'il puisse réagir avec l' $H_2O_2$  et ainsi donner naissance à des radicaux hydroxyle  $^{\cdot}OH$ . Le radical superoxyde peut aussi conduire à la production d' $H_2O_2$  via la superoxyde dismutase (SOD). La durée de vie relativement longue (quelques minutes) de l' $H_2O_2$  lui permet de diffuser loin de son site de production. Sa similitude avec l'eau lui permet de traverser les membranes via les aquaporines (Bienert *et al.*, 2006 et 2007). L' $H_2O_2$  peut à son tour générer le radical hydroxyle  $^{\cdot}OH$  en présence de cations métalliques tels que  $Fe^{2+}$  et  $Cu^{2+}$  (Wardman et Candeias, 1996). Les radicaux hydroxyle  $^{\cdot}OH$  sont des oxydants très puissants de courte durée de vie (quelques nanosecondes) qui diffusent donc peu et réagissent essentiellement sur leur lieu de production. Ils attaquent les molécules se trouvant à proximité comme l'ADN en s'insérant sur les doubles liaisons des bases azotées (Cadet *et al.*, 1999 ; Gardès-Albert *et al.*, 2003). Ils réagissent également avec les acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires et des lipoprotéines, initiant ainsi des chaînes de peroxydation lipidique (Montillet *et al.*, 2005). Les acides aminés constitutifs des protéines sont également sensibles à l'attaque des radicaux hydroxyle. Lorsqu'une protéine dispose d'une fonction enzymatique, les radicaux hydroxyle sont susceptibles d'inactiver, tout au moins en partie, le site actif (Van Assche et Clijsters, 1990 ; Das *et al.*, 1997 ; Durand, 2009).

Il existe d'autres sources de production d'ERO en dehors des mitochondries, des chloroplastes et des peroxysomes. Par exemple la NADPH-oxydase est une enzyme associée à la membrane plasmique catalysant la réaction d'oxydation du NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit) par le dioxygène ce qui produit du  $NADP^+$  (forme oxydée), du  $H^+$  et du  $O_2^{\cdot-}$ . Il a été montré par exemple que des enzymes associées à la paroi cellulaire

pouvaient être responsables de la production d'ERO (Foyer et Noctor, 2005 ; Maisch *et al.*, 2007). C'est le cas des peroxydases de classe III (Blee *et al.*, 2001 ; Takabe *et al.*, 2001 ; Demidchik, 2015) mais également le cas de certaines enzymes dépendantes du pH comme les oxalate oxydases et les amine oxydases (Bolwell et Woftastek, 1997). Ces dernières sont activées par un pH alcalin, ce qui produit de l' $H_2O_2$  en présence d'un agent réducteur. Il a été montré qu'elles étaient impliquées dans l'accumulation apoplastique de l' $H_2O_2$  au cours d'interactions entre différentes espèces de céréales et de champignons (Lane, 2002). En effet, l'alcalinisation de l'apoplaste lors de la reconnaissance d'un éliciteur, active ces enzymes entraînant la production d' $H_2O_2$  en grande quantité, ce qui empêche l'invasion de micro-organismes pathogènes.

## **2. Les plantes tolérantes aux pollutions métalliques**

Certains taxons sont observés majoritairement sur des sites riches en ET, laissant supposer que des processus évolutifs sont impliqués dans cette adaptation aux environnements métallifères. En réponse à de nombreuses années de pression de sélection, il est généralement supposé que le phénomène d'adaptation est progressivement acquis selon le processus classique de l'évolution. Il en découlerait ainsi qu'un petit nombre d'espèces bien spécifiques seraient capables de se développer sur des terrains contaminés. La tolérance des plantes face aux ET est définie comme la capacité à survivre sur un sol qui serait toxique pour d'autres et se manifeste par une interaction entre un génotype et son environnement (Macnair *et al.*, 2000). Les espèces végétales ayant développé divers mécanismes afin de se développer sur des sols métallifères toxiques sont généralement endémiques de ces types de sols et sont appelées métalphytes (Bothe, 2011 ; Sheoran *et al.*, 2011 ; Whiting *et al.*, 2004). Les métalphytes ont la capacité naturelle à tolérer et concentrer les éléments essentiels et non essentiels du sol dans leurs tissus. Ces plantes seraient le résultat de millions d'années de fortes pressions sélectives que les sols chargés en ET ont exercé sur elles (Sheoran *et al.*, 2011).

Pourtant, certaines espèces végétales sont capables de coloniser rapidement des milieux récemment contaminés, sous-entendant l'hypothèse qu'une population adaptée peut émerger rapidement après quelques années, voire même en une seule génération (Wu *et al.*, 1975). Ce phénomène est décrit comme un modèle de microévolution (Macnair, 1993). En plus du phénomène adaptatif, la tolérance peut être également un caractère constitutif. En effet, en

comparant deux clones de *Typha latifolia*, l'un issu d'un terrain contaminé en Zn et l'autre issu d'un terrain non pollué, McNaughton *et al.* (1974) ont constaté que cette espèce montrait une forte tolérance au Zn, Pb et Cd, et ceci sans distinction entre les deux clones. Cette observation a été confirmée pour d'autres espèces telles que *Arabidopsis halleri*, *Calamagrostis epigejos*, *Glyceria fluitans* et *Carex rostrata* (Bert *et al.*, 2000 ; Lehmann et Rebele, 2004 ; Matthews *et al.*, 2004 et 2005).

Les végétaux tolérants ont développé trois stratégies afin de se développer sur les sols métallifères (Raskin *et al.*, 1994 ; Whiting *et al.*, 2004 ; Gosh et Singh, 2005). Celles-ci sont basées sur le rapport entre les teneurs en ET du sol et les teneurs en ET dans les organes aériens des plantes considérées (Baker, 1981). De ce fait, on distingue :

- **Les plantes d' « exclusion métallique »** : ces plantes limitent l'entrée et le transport des ET vers les parties aériennes sur une large gamme de concentrations de ces derniers dans le sol. L'exclusion peut être conduite de différentes façons. Par exemple, une des stratégies consiste en l'adsorption d'ET à la surface racinaire *via* des polysaccharides (notamment aux fonctions acide carboxylique des acides uroniques) constitutifs du mucilage de la surface racinaire et de la paroi cellulaire (Sereguine et Ivanov, 2001 ; Sharma et Dubey, 2005). Cette adsorption racinaire restreint l'absorption des ET dans les racines et constitue une barrière protectrice du système racinaire. Morel *et al.* (1986) ont montré que la capacité des ET à se lier au mucilage décroît dans l'ordre suivant :  $Pb^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+}$ . Selon eux, le mucilage agirait comme une sorte de pré-filtre sélectif pour certains ET, complétant le rôle de la paroi cellulaire dont il dérive. Certaines de ces espèces peuvent contenir de grandes quantités d'ET dans les racines mais les concentrations foliaires restent faibles (Verbruggen *et al.*, 2009).
- **Les plantes « indicatrices »** : ces plantes accumulent activement les ET dans leurs tissus aériens et reflètent généralement les concentrations de ces derniers dans le sol. Elles tolèrent les ET en produisant des composés intracellulaires de liaison aux ET (des chélateurs) ou en les stockant dans des zones non-sensibles (Sheoran *et al.*, 2011).
- **Les plantes « hyperaccumulatrices »** : elles ont la capacité naturelle d'accumuler et tolérer, sans symptômes visibles, un ou plusieurs ET en grande quantité dans leurs tissus aériens ; et cela à des concentrations supérieures à celles retrouvées dans le sol et à celles habituellement mesurées dans les plantes non-accumulatrices (Padmavathiamma et Li,

2007 ; Memon et Schröder, 2009). En effet, elles peuvent présenter des concentrations en ET 100 fois supérieures à celles des espèces non-hyperaccumulatrices (Rascio, 1977 ; Chaney *et al.*, 1997 ; Salt *et al.*, 1998 ; Reeves, 2006). Ces espèces sont donc d'un grand intérêt pour une utilisation potentielle dans la phytoextraction des ET des sols contaminés et en phytomine (Baker *et al.*, 2000 ; Whiting *et al.*, 2004 ; Pilon-Smits, 2005). Un métal est « hyperaccumulé » lorsque sa teneur dans les parties aériennes atteint 0,1 % de la masse sèche (MS) de la plante, soit respectivement 1 g. kg<sup>-1</sup>, et ce quelle que soit la concentration de l'ET dans le sol (Baker et Brooks, 1989). Néanmoins, il existe des exceptions selon l'ET considéré : la teneur est supérieure ou égale à 1 % de la MS de la plante pour Mn, Fe et Zn, 0,1 % pour Co, Cu, Ni, Pb, Al, As, Sb, Se et Tl, 0,01 % pour Cd et seulement 0,001 % pour Hg (Padmavathiamma et Li, 2007 ; Verbruggen *et al.*, 2009 ; Feng *et al.*, 2013). En plus du seuil de concentration en ET, une plante est considérée comme hyperaccumulatrice lorsque son facteur de translocation (FT) est supérieur à 1 (Tangahu *et al.*, 2011 ; Badr *et al.*, 2012).

Plus de 500 espèces végétales hyperaccumulatrices sont connues et se répartissent dans approximativement 45 familles (Baker *et al.*, 2000 ; Prasad et Freitas, 2003 ; Verbruggen *et al.*, 2009 ; Van der Ernt, 2012). Environ 75 % sont des hyperaccumulatrices de Ni (Baker et Brooks, 1989 ; Reeves et Baker, 2000 ; Milner et Kochian, 2008 ; Ali *et al.*, 2013). La famille des Brassicacées est la plus représentée, suivie par les Astéracées, les Caryophyllacées, les Euphobiacées, les Fabacées, les Lamiacées, les Poacées, les Violacées, les Cyperacées, les Cunouniacées et les Flacourtiacées (Prasad et Freitas, 2003 ; Verbruggen *et al.*, 2009). Bien que ces espèces soient dispersées géographiquement et appartiennent à des genres et des familles différentes, les genres *Alyssum* et *Thlaspi* de la famille des Brassicacées sont ceux qui contiennent le plus grand nombre d'hyperaccumulatrices de Ni (Assunção *et al.*, 2003). Des hyperaccumulatrices « extrêmes » de Ni ont également été identifiées dans les genres *Phyllanthus* (Euphorbiacées), *Homalium* (Flacourtiacées), *Geissois* (Cunouniacées) et *Hybanthus* (Violacées) (Baker et Brooks, 1989 ; Reeves, 1992). *Noccaea caerulescens* (tabouret bleu) est probablement l'hyperaccumulatrice la plus connue car elle peut accumuler efficacement le Zn, le Cd et le Ni (Lasat, 2002 ; Assunção *et al.*, 2003). L'hypothèse la plus répandue concernant la raison ou l'avantage de l'hyperaccumulation d'ET (et surtout du Ni) dans les plantes est la défense contre les herbivores (feuilles désagréables au goût ou toxiques)

et les pathogènes (bactéries, champignons, insectes) (Boyd et Martens, 1992 et 1998 ; Meharg, 2005 ; Sarma, 2011 ; Ali *et al.*, 2013).

Quel que soit leur niveau de tolérance ou de sensibilité, les plantes (à l'exception des espèces d'exclusion métallique) absorbent les ET du sol et les transportent vers différents organes pour les compartimenter (avec plus ou moins de succès selon les espèces végétales) en causant le moins d'effets toxiques. Le niveau de tolérance dépend des capacités de défense contre l'oxydation générée par les ET en excès et des composés capables de piéger ces ET au niveau intracellulaire et pariétal. Les molécules capables de piéger les ET sont présentées dans la partie V de ce chapitre. Concernant la lutte contre l'oxydation, les plantes possèdent de nombreuses enzymes comme les superoxydes dismutases (SOD) (cytosoliques : SOD/Cu, Zn ; mitochondriales : SOD/Mn ; chloroplastiques : SOD/Fe), l'ascorbate peroxydase (APX), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX) ou les Glutathion-S-transférase (GST) ainsi que des composés jouant un rôle anti-oxydant comme l'ascorbate, le glutathion (GSH), la proline, les polyamines, les  $\alpha$ -tocophérols, les caroténoïdes, les flavonoïdes ou les alcaloïdes (Sairam *et al.*, 2000 ; Gill et Tuteja, 2010 ; Heidari *et al.*, 2012 ; Demidchik, 2015).

## **II. Les différents paramètres contribuant à l'absorption racinaire**

L'absorption des ET par les plantes dépend de leur phytodisponibilité dans le sol. Celle-ci dépend non seulement des caractéristiques du sol mais aussi des organismes présents dans le sol, lesquels sont capables, de par les molécules qu'ils sécrètent, de modifier la mobilité des ET. Cette modification peut être générée notamment par les microorganismes de la rhizosphère et également par les plantes dont les racines libèrent divers exsudats dans le sol.

### **1. La spéciation : un paramètre capital à l'absorption des ET**

D'après Juste (1995), la mobilité d'un élément est définie comme son aptitude à être transféré vers des compartiments où il est moins retenu. L'élément passe successivement dans des compartiments d'énergie de rétention décroissante pour aboutir dans la solution du sol. Selon Baize (2006), la biodisponibilité est l'aptitude d'une espèce chimique ou d'un élément présent dans le sol à être absorbé par les êtres vivants *via* la solution du sol. Elle implique alors le franchissement d'une barrière biologique (paroi cellulaire, membranes). Dans les sols, l'existence des ET sous différentes formes physico-chimiques est appelée spéciation. Les ET peuvent être sous forme libre, complexés avec un ligand organique ou inorganique, complexés

avec un ligand colloïdal ou macromoléculaire, adsorbés ou incorporés à des particules en suspension, adsorbés ou assimilés par un organisme vivant (Pétre, 2008). La spéciation d'un ET est d'une très grande importance car elle conditionne sa mobilité (ou transfert) dans le milieu mais aussi sa biodisponibilité, deux paramètres extrêmement importants à connaître pour évaluer la capacité d'absorption racinaire et l'impact phytotoxique potentiel (Weber, 2006). La spéciation est contrôlée par un certain nombre de facteurs qui vont influencer sur la solubilisation, la précipitation ou l'adsorption des ET (Perrono, 1999 ; Nowak *et al.*, 2003 ; Laperche *et al.*, 2004) :

- **Le pH du sol** : selon les ET considérés, son abaissement ou son augmentation peut entraîner leur mise en solution (sous forme de sels métalliques) et donc favoriser leur absorption racinaire, ou à l'inverse provoquer la formation de composés insolubles réduisant ainsi leur absorption par les racines. En général, un sol ayant un pH acide a tendance à favoriser la solubilisation des cations métalliques tandis qu'un pH neutre à basique va plutôt favoriser leur précipitation (Perrono, 1999). Néanmoins, tous les ET n'ont pas la même solubilité et donc mobilité aux mêmes valeurs de pH (tableau X).
- **Le potentiel d'oxydo-réduction** : il est lié au degré d'aération du sol, lequel est favorisé par la faune du sol. L'air provenant de l'atmosphère contribue à l'oxydation du sol entraînant la solubilisation de certains ET et donc leur biodisponibilité (Baize, 1997). Les travaux de Förstner (1985) résument le degré de mobilité relative des ET en fonction du pH et du potentiel d'oxydo-réduction (tableau 9).

**Tableau 9.** Effets du pH et du potentiel d'oxydo-réduction sur la mobilité des ET du sol (d'après Förstner, 1985).

Mobilité relative	pH		Potentiel d'oxydo-réduction	
	Neutre - alcalin	Acide	Oxydant	Réducteur
Très haute	Se, Mo	B	B	-
Haute	As	Zn, Cd, Hg, Co, Ni	Mo, Se	-
Moyenne	Mn	Cu, Al, Pb, Cr	Cu, Co, Hg, Ni, Zn, Cd	Mn
Basse	Pb, Fe, Zn, Cd, Tl	Fe(III), Tl	Pb, Tl	Fe, Zn, Co, Ni, Tl
Très basse	Al, Cr, Hg, Cu, Ni, Co	Mo, Se, As	Al, Cr, Fe, Mn	Al, Cr, Hg, Cu, Se, B, Mo, Cd, Pb



- **La température et l'humidité du sol** : elles influent sur l'activité des micro-organismes du sol et donc sur la biodégradation de la matière organique, cette dernière ayant des capacités de piégeage des ET. L'humidité agit dans les processus de précipitation et de solubilisation. L'eau est le constituant majeur de la solution du sol et sert de vecteur d'éléments dissous, de complexes, de particules et alimente les êtres vivants du sol (dont les plantes). Un excès d'hygrométrie peut entraîner un défaut d'aération du sol et donc une modification du potentiel d'oxydo-réduction.
- **Les composés minéraux** : la texture du sol fait référence à la taille et à la proportion des particules minérales qui le composent (tableau 10). Les argiles jouent un rôle important pour les plantes car elles stockent des éléments nutritifs ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ) entre leurs couches (phyllosilicates) ce qui favorise leur phytodisponibilité. L'eau y est d'ailleurs plus abondante que dans les sols sableux.

**Tableau 10.** Texture du sol en fonction de la taille des particules qui le constituent (d'après Richer de Forges *et al.*, 2008).

Nature du composé	Granulométrie
Argile	0 - 2 $\mu\text{m}$
Limon	2 - 50 $\mu\text{m}$
Sable	50 $\mu\text{m}$ - 2 mm
Gravier	2 - 60 mm
Cailloux, galets, roches	60 mm et plus

- **La matière organique** : elle permet d'immobiliser temporairement les ET du sol ayant pour elle une grande affinité. Il s'agit de substances humiques (macromolécules) provenant de la décomposition de débris animaux et végétaux (source importante d'azote pour les plantes). Les composés organiques sont biodégradés ou minéralisés au fil du temps par les micro-organismes (Sirven, 2006).

## 2. Amélioration de la phytodisponibilité des ET

La spéciation des ET n'est pas contrôlée uniquement par des facteurs abiotiques. En effet, les plantes et la faune du sol (macro- et micro-faune) influent également sur la solubilisation des ET en fonction des composés qu'elles libèrent dans le sol.

## 2.1. Par les plantes

Les plantes absorbent les éléments minéraux à partir de la solution du sol, qu'ils soient sous forme libre ou complexée (Ali *et al.*, 2013). Afin de mobiliser ces éléments et de les rendre phytodisponibles, certaines plantes exsudent des chélateurs qui sont impliqués dans la mobilisation des éléments nutritifs dans la rhizosphère (Strom, 1997 ; Farrar et Jones, 2000). Une exsudation accrue d'acides organiques comme mécanisme de résistance au stress métallique a été démontrée chez un certain nombre d'espèces végétales (Rengel, 1997). Ces exsudats sont des acides organiques tels que le malate, l'oxalate et le citrate (Dakora et Phillips, 2002) et vont ainsi abaisser localement le pH de la rhizosphère (Marschner, 1995 ; Renella *et al.*, 2004). De plus, ces composés anioniques ont la capacité de former des complexes avec les cations métalliques (Jones *et al.*, 1996). Tout ceci favorise ainsi la désorption des ET et leur solubilisation dans le sol, les rendant alors plus facilement absorbables par les racines (Krishnamurti *et al.*, 1997 ; Liao et Xie, 2004 ; Moreno Pires *et al.*, 2007). Bao *et al.* (2011) ont ainsi démontré une corrélation entre la sécrétion d'acides organiques par les racines de morelle noire (*Solanum nigrum*), la diminution du pH de la solution du sol et l'augmentation de l'accumulation de Cd dans la plante. Par ailleurs, les racines de certaines plantes et notamment celles appartenant à la famille des Poacées produisent des phytosidérophores comme les acides mugénique et avénique qui, *via* leurs groupements amine et carboxyle, ont la possibilité de former des liaisons de coordination avec le  $Fe^{3+}$ . Le complexe Fe - phytosidérophore est ensuite absorbé par les racines (Hopkins, 2003). Il a été également montré que les racines du sarrasin sécrétaient de l'acide oxalique en réponse à un stress causé par un excès d'Al dans le sol et que les feuilles accumulaient le complexe Al - oxalate (Ma *et al.*, 1997).

## 2.2. Par les micro-organismes du sol

L'action des micro-organismes peut aller dans le sens de la solubilisation des ET s'ils sécrètent des composés acides ou des composés complexants, ou à l'inverse de l'insolubilisation s'ils libèrent des composés conduisant à la formation de sulfures métalliques insolubles (Salt *et al.*, 1995 ; Bural *et al.*, 2000 ; Whiting *et al.*, 2001 ; Wenzel *et al.*, 2003). En effet, selon le type de composés libérés par les micro-organismes dans la rhizosphère, les conditions de pH et d'oxydo-réduction du milieu vont varier (Deschamps *et al.*, 2006). Il a été démontré par exemple que des bactéries chimio-lithotrophes pouvaient améliorer la mobilité des contaminants métalliques par l'acidification des sols (Kelley et Tuovinen, 1988).

Par ailleurs, les champignons mycorhiziens peuvent interagir avec plus de 80 % des plantes terrestres (Leung *et al.*, 2013). Cette association symbiotique a un effet positif sur la nutrition des plantes en améliorant l'absorption des éléments nutritifs et des ions métalliques (Khan *et al.*, 2000). Ces champignons peuvent non seulement transformer des composés organiques du sol en éléments disponibles pour les racines, mais aussi augmenter la surface d'absorption de la rhizosphère en contact avec le sol et donc avec les nutriments. Il a été montré que l'inoculation d'une espèce de saule (*Salix x dasyclados*) par le champignon ectomycorhizien *Paxillus involutus* favorisait la biomasse racinaire et aérienne de l'arbre mais aussi l'absorption et le stockage de Cd (22 %) et de Zn (48 %) au niveau aérien par rapport au saule témoin non mycorhizé (Baum *et al.*, 2006). De même, Babu *et al.* (2014) ont montré que le champignon *Trichoderma sp. PDR1-7* en symbiose avec *Pinus sylvestris* avait pu augmenter la solubilisation des ET et la disponibilité des éléments nutritifs du sol. Les auteurs ont montré que ce champignon représentait un réel avantage pour les plantules de pin car ces dernières se développaient mieux avec une plus forte teneur en chlorophylle, une activité accrue des enzymes antioxydantes et une diminution de malondialdéhyde (produit de la peroxydation des lipides et bioindicateur d'un stress oxydant). Néanmoins, les résultats ont montré que dans les parties aériennes, seule l'accumulation du Pb et du Zn avait été stimulée (de 30 et 45 %, respectivement) alors que le transport d'As, Cd, Cu et Ni vers les parties aériennes n'avait pas été modifié malgré une augmentation de la concentration racinaire de ces ET. Une autre étude a été réalisée en testant l'effet de deux champignons (*Rhizopogon roseolus* et *Suillus bovinus*) sur du pin maritime de 5 mois exposé pendant 6 mois à 30 mg Cd. kg<sup>-1</sup> (Sousa *et al.*, 2012). Les auteurs ont montré que *R. roseolus* était le plus intéressant car il était en mesure de réduire la teneur en Cd dans les racines de 60 % et d'augmenter de 35 % la teneur en Cd dans les parties aériennes sans modifier la croissance du pin.

Cependant, l'utilisation des micro-organismes en phytoremédiation peut présenter des limites car certains catalysent des réactions d'oxydo-réduction conduisant à une diminution de la mobilité des ET dans le sol (Lasat, 2002). Par exemple, une inhibition de la translocation du Zn dans les parties aériennes a été mise en évidence dans des plants de maïs associés à des mycorhizes (Khan *et al.*, 2000). Cependant, cette inhibition semble être spécifique de l'hôte car des mycorhizes n'ont pas affecté la translocation du Zn dans la fétuque (*Festuca arrundinaceae*) (Shetty *et al.*, 1994). Dhillion (1992) a indiqué que « la préférence de l'hôte » est une caractéristique importante de l'association symbiotique. Les travaux de Sousa *et al.* (2012)

mentionnés précédemment indiquaient un effet bénéfique du champignon *R. roseolus* pour réduire la quantité de Cd dans les racines du pin (*P. pinaster*) et augmenter le stockage de celui-ci au niveau aérien. Cependant, ils ont publié une autre étude montrant que cet effet positif dépendait du génotype du pin (Sousa *et al.*, 2014). En effet, ils ont constaté que *R. roseolus* n'avait pas augmenté significativement la teneur en Cd dans les parties aériennes du génotype sauvage. Ils ont aussi constaté une teneur racinaire réduite en Cd de 23 % au lieu de 60 % pour le génotype sélectionné.

Par ailleurs, la limitation d'accumulation d'ET par les plantes mycorhizées n'est pas uniquement liée à l'influence du champignon sur la solubilisation des ET dans le sol. En effet, les champignons peuvent aussi stocker ces ET, limitant ainsi l'absorption racinaire (Krznaric *et al.*, 2010). Weissenhorn et Leyval (1995) ainsi que Joner et Leyval (1997) ont indiqué que le Cd restait séquestré dans les hyphes de *Glomus mosseae* et que l'absorption de cet ET par les racines du trèfle (*Trifolium subterraneum*) était limitée en raison de son piégeage par le champignon. La liaison d'ET à la paroi cellulaire des hyphes a été proposée comme un mécanisme par lequel les champignons ectomycorhiziens protègent la plante contre la toxicité des ET (Galli *et al.*, 1994). Ainsi, l'efficacité des mycorhizes pour améliorer la phytoextraction n'est pas toujours prouvée car variable selon les espèces végétales, le champignon associé et l'ET (Galli *et al.*, 1993 ; Godbold *et al.*, 1998 ; Jentschke *et al.*, 1998 et 1999 ; Kozdroj *et al.*, 2007 ; Leung *et al.*, 2013). Cependant, le piégeage d'ET par les mycorhizes peut être un aspect intéressant dans le cas de mise en place d'une phytostabilisation car le lessivage des ET peut être ainsi limité. La rétention d'ET par les champignons et les racines des plantes mycorhizées a été mise en évidence par exemple pour l'association *Pinus sylvestris* / *Laccaria bicolor* en réponse au Ni et Cd ou l'association *Pinus sylvestris* / *Suillus luteus* en réponse au Cd (Ahonen-Jonnarth et Finlay, 2001 ; Krznaric *et al.*, 2009).

### **III. Mécanismes d'absorption racinaire, de transport et d'accumulation des ET dans la plante**

Lorsque les ET sont phytodisponibles (en fonction des caractéristiques du sol et des exsudats libérés par les racines et les micro-organismes de la rhizosphère), leur pénétration dans la plante par voie racinaire et leur distribution au sein des différents organes de la plante fait intervenir plusieurs familles de transporteurs.

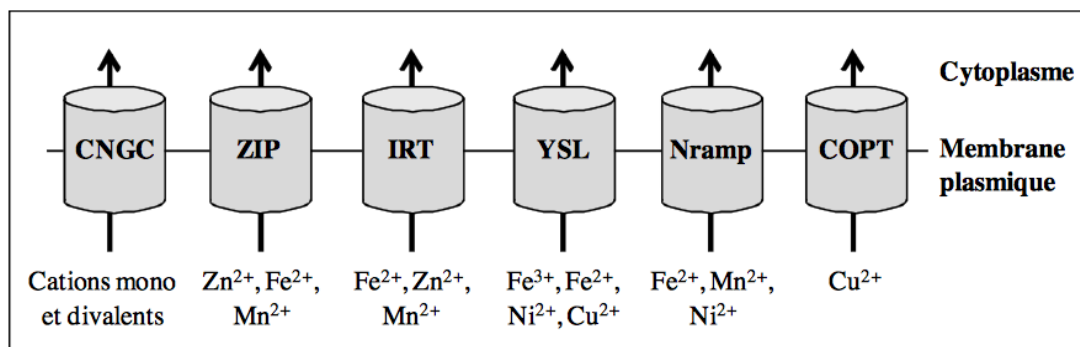
## 1. Transport transmembranaire

Le passage des ET à travers la membrane plasmique peut se faire de façon passive par simple diffusion ou par certains canaux ioniques en fonction du gradient de concentration mais peut aussi mettre en jeu un système de transport actif, lequel fait intervenir notamment des pompes dépendantes de l'adénosine triphosphate (ATP). Il est très difficile de généraliser le transport membranaire pour l'ensemble des ET car 1) ces derniers n'entrent pas tous en compétition avec les mêmes éléments, et 2) certains ET entrent passivement alors que d'autres sont transportés activement et d'autres font intervenir ces deux modes de transport (tableau 11).

**Tableau 11.** Liste non exhaustive des éléments en compétition avec les ET au niveau du transport membranaire et type de transport associé aux ET (d'après Trakal *et al.*, 2015).

ET sous leur forme absorbée	Eléments en compétition	Type de transport
$(AsO_4)^{3-}$	P	Actif
$H_3BO_3$	-	Passif
$Cd^{2+}$	Ca, Mg	Actif et passif
$Co^{2+}$	Cd, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, Ni, S, Zn	Actif
$Cr^{6+} > Cr^{3+} > CrO_4^{2-}$	Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P, S	Actif pour $Cr^{3+}$ et passif pour $Cr^{6+}$
$Cu^{2+}$	Ca, Cd, Cr, Fe, Mn, Mo, N, Ni, P, Se, Zn	Actif et passif
$Fe^{2+} > Fe^{3+}$	Ca, P	Actif
$Hg^{2+}$	K	Actif et passif
$Mn^{2+}$	Mg, Ca	Actif et passif
$MoO_4^{2+}$	-	Actif
$Ni^{2+} > Pb(NO_3)_2$	Mg	Passif
$Pb^{2+}$	Ca, Cd, Zn	Passif
$Zn^{2+}$	As, Ca, Cd, Cu, Fe, Mg, N, P	Actif

Plusieurs familles de transporteurs permettent la pénétration des principaux ET essentiels au cycle de développement des végétaux. Les principaux transporteurs sont schématisés sur la figure 10.



**Figure 10.** Familles de transporteurs impliqués dans l'absorption des principaux métaux essentiels au développement des plantes (d'après Moussavou Moudouma, 2010).

Cyclic Nucleotide-Gated Channel : CNGC ; Zinc regulated transporter- Iron regulated transporter-like Protein : ZIP ; Iron Regulated Transporter : IRT ; Yellow Stripe Like : YSL ; Natural resistance associated-macrophage protein : NRAMP ; COPper Transporter : COPT.

> **Les protéines CNGC (Cyclic Nucleotide Gate Channel).** Ce sont des canaux à cations peu sélectifs médiés par des nucléotides cycliques. Ils sont impliqués dans le transport de cations mono et divalents et notamment de Ca<sup>2+</sup> et K<sup>+</sup> (Kaplan *et al.*, 2007). On les retrouve majoritairement au niveau de la membrane plasmique et certains au niveau du tonoplaste.

> **Les transporteurs de type ZIPs (Zinc regulated transporter - Iron regulated transporter - like Protein).** Comme leur nom l'indique, ils rassemblent deux familles de transporteurs : les protéines ZRT (Zinc Regulated Transporter) et les protéines IRT (Iron Regulated Transporter). Ils transportent les mêmes ions mais avec des affinités différentes. En effet, les transporteurs ZRT ont plus d'affinité pour Zn tandis que les IRT ont plus d'affinité pour Fe (Grotz et Guérinot, 2006). La fixation d'un cation métallique s'effectue au niveau de leur domaine transmembranaire riche en histidine (Lin *et al.*, 2009). Les ZIPs sont impliqués dans le transport d'ions divalents et notamment de Zn, Fe, Mn et Cd et sont classés dans la catégorie des transporteurs secondaires (Guérinot, 2000). Certains d'entre eux sont induits en réponse à un stress, notamment lors de carences en Fe et en Zn (Manara, 2012). Ils sont essentiellement localisés au niveau de la membrane plasmique et certains le sont au niveau du tonoplaste.

> **Les protéines YSL (Yellow Stripe Like)** ont initialement été identifiées sur la base de leur similarité de séquence avec le transporteur Yellow Stripe 1 (YS1) responsable de l'absorption de Fe dans le sol (Curie *et al.*, 2001). Les protéines de cette famille YSL ont tout d'abord été identifiées chez le maïs (Curie *et al.*, 2001). Ces protéines reconnaissent spécifiquement certains ET (Cu, Fe, Mn, Ni, Zn) sous forme complexée et permettent leur passage à travers la

membrane plasmique sous une forme ET – ligand (Curie *et al.*, 2009). Par exemple, dans les sols, le Fer (II) est rapidement oxydé en Fer (III), ce dernier étant relativement insoluble donc difficile à absorber pour les végétaux. Pour être transporté, Fer (III) est complexé avec des chélateurs, notamment des phytosidérophores (PS) libérés dans les exsudats racinaires. Ces PS peuvent être l'acide muginéique chez les monocotylédones mais aussi la nicotinamine chez certaines espèces (qui fixe aussi Fe (II) mais en moindre proportion) (Von Wiren *et al.*, 1999).

> **Les transporteurs Nramp (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein)**. Leur désignation vient du fait que la première protéine identifiée dans cette famille a été tout d'abord découverte comme étant exprimée exclusivement dans la lignée murine macrophage J774A (Vidal *et al.*, 1993). Ils sont impliqués dans le transport privilégié de Fe mais ils peuvent aussi prendre en charge des ions métalliques divalents comme  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  et  $Co^{2+}$  (Nevo et Nelson, 2006 ; Manara, 2012). Ils appartiennent à la catégorie des transporteurs secondaires de type symport et ont comme co-transporteur les ions  $H^+$  (Nagata *et al.*, 2008). Ils sont présents au niveau de la membrane plasmique et du tonoplaste (Krämer *et al.*, 2007).

> **Les protéines COPT (COPper Transporter)**. Ce sont des transporteurs spécifiques de l'absorption de Cu. La liaison avec l'ET s'effectue au niveau de leur domaine N-terminal riche en histidine et méthionine (Kampfenkel *et al.*, 1995 ; Yruela, 2005). Ces transporteurs permettent l'entrée du Cu dans la cellule et on été majoritairement identifiés au niveau de la membrane plasmique et du tonoplaste (Kampfenkel *et al.*, 1995 ; Sancenon *et al.*, 2003 ; Yruela, 2005). Six membres de la famille COPT (COPT1 à COPT6) ont été identifiés et il a été montré qu'une carence en Cu active l'expression de certains d'entre eux (Sancenon *et al.*, 2003 ; Penarrubia *et al.*, 2010).

Plusieurs ET comme As, Cd, Cr, Hg ou Pb ne sont pas indispensables aux végétaux et possèdent une structure (rayon ionique et/ou charge) semblable à celles de certains éléments essentiels. Du fait de ce « mimétisme », des ET en excès dans le sol peuvent entrer en compétition avec des cations essentiels au niveau des systèmes d'absorption de la membrane plasmique afin d'être pris en charge par des transporteurs qui ne leur sont pas spécifiques comme montré dans le tableau 11 (Thangavel et Subbhuraam, 2004 ; Alford *et al.*, 2010). Par exemple, une source importante de la toxicité du Cd est sa similarité chimique avec le Ca ainsi que le Zn et le Fe (Clemens, 2006 ; Sarma, 2011). Il a été montré que le Cd entrerait par le biais

des canaux calciques et de transporteurs de cations de faible affinité LCT (Low affinity Cation Transporter) (Thuleau *et al.*, 1994 ; Clemens *et al.*, 1998 ; Greger, 1999). De même, il semblerait que le Hg pénétrerait dans la cellule par des canaux ioniques en concurrence avec des métaux essentiels tels que Cu, Fe ou Zn (Nagajyoti *et al.*, 2010).

Concernant l'As, l'arséniate (V) est la forme majoritaire dans les sols aérobie, tandis que l'arsénite (III) l'est dans les sols (réducteurs) gorgés d'eau (Zhao *et al.*, 2009). L'arséniate utilise la voie de transport du phosphate tandis que l'arsénite pourrait être transporté par des aquaporines (Meharg *et al.*, 1994 ; Meharg et Jardine, 2003 ; Bienert *et al.*, 2008 ; Isayenkov et Maathuis, 2008 ; Ma *et al.*, 2008).

Le Cr est présent sous deux formes toxiques : Cr (VI) qui est la forme la plus soluble et Cr (III) qui est moins mobile. L'absorption de Cr (III) est un processus de diffusion passif à travers la membrane plasmique tandis que l'absorption de Cr (VI) s'effectue par un mécanisme actif faisant intervenir des transporteurs d'anions essentiels tels que le sulfate et le phosphate (Skeffington *et al.*, 1976 ; Cervantes *et al.*, 2001 ; Zayed et Terry, 2003 ; Shanker *et al.*, 2005 ; Velma *et al.*, 2009 ; Zhao *et al.*, 2009).

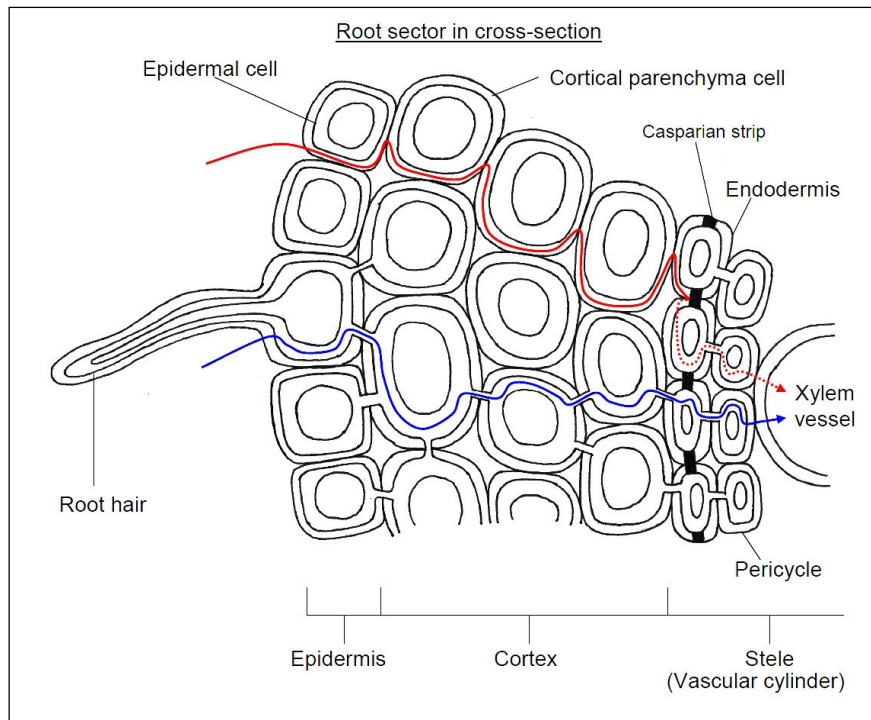
Enfin, pour ce qui est de Pb, plusieurs auteurs ont démontré que les canaux calciques constituent la voie principale par laquelle il pénètre dans les racines (Wang *et al.*, 2007 ; Pourrut *et al.*, 2008 et 2011). L'utilisation de plantes transgéniques a montré que Pb peut pénétrer dans les racines *via* les transporteurs CNGC ou par les transporteurs LCT (Arazi *et al.*, 1999 ; Kohler *et al.*, 1999 ; Wojas *et al.*, 2007).

Ce manque relatif de sélectivité dans le transport transmembranaire d'ions peut en partie expliquer la raison de l'entrée d'ET non essentiels dans les cellules végétales (Seth, 2012).

## **2. Translocation des ET vers les parties aériennes**

Les ET sont transportés dans la plante à travers deux voies : voie apoplastique et voie symplastique (figure 11). Ce transport peut se faire selon les ET sous forme libre ou complexée à des ligands (cette partie sera développée dans la partie V de ce chapitre).





**Figure 11.** Transport radial dans la racine (d'après le site internet 8).

Le transport des ET au niveau des racines peut se faire par voie apoplastique (passage entre les cellules) (trait rouge) ou par voie symplastique (passage dans les cellules) (trait bleu).

- **La voie apoplastique.** Elle est définie par le continuum extracellulaire constitué des parois perméables pectocellulosiques et des espaces intercellulaires. Le transport des ET à travers cette voie se fait de façon passive (non métabolique et donc dans le sens du gradient de concentration) au niveau des pores du réseau de la cellulose, d'hémicelluloses et des glycoprotéines. Les ET sont véhiculés dans ce compartiment extracellulaire à travers le déplacement de l'eau dans laquelle ils sont solubles. Néanmoins, une certaine proportion d'ions peut être retenue en se fixant aux parois par adsorption aux charges négatives de surface de l'acide polygalacturonique des pectines, lesquelles agissent comme des échangeurs d'ions (Briat et Lebrun, 1999). Au niveau de la racine, les cellules de l'endoderme sont recouvertes d'une substance lipidique imperméable : la subérine. Les parties les plus jeunes des racines étant moins subérifiées, les ET peuvent continuer à emprunter cette voie apoplastique. En revanche, dans les parties plus âgées, la présence des cadres de Casparij subérifiés empêche le passage par voie apoplastique et nécessite alors un passage par la seconde voie, la voie symplastique. Ainsi, les ET circulant par cette voie doivent passer dans le symplaste et donc traverser la membrane plasmique.

- **La voie symplastique.** Elle est définie comme le continuum intracellulaire formé par le biais des plasmodesmes. Elle assure le passage de l'eau et des solutés du sol vers le cylindre central constitué notamment de faisceaux conducteurs de sève. Au niveau de la racine, les ET pénètrent dans le cylindre central grâce à des transporteurs situés au niveau de la membrane plasmique des cellules de la bande de Caspary. L'absorption peut y être passive ou active selon les ET. Il a été montré par exemple que dans 30 % des cas, le Cd serait absorbé de façon passive (Prasad, 2004). Les éléments métalliques traversent donc la paroi puis la membrane plasmique et migrent *via* les plasmodesmes de cellule en cellule à l'intérieur des racines jusqu'à atteindre le xylème. La poussée racinaire combinée à l'appel foliaire lors du phénomène d'évapotranspiration permet le transport ascendant des ET contenus dans la sève du xylème depuis les racines vers les parties aériennes.

Ainsi, l'absorption par les plantes est le résultat de l'adsorption à la paroi des cellules racinaires (voir chapitre VII) et de l'absorption à travers la membrane plasmique de ces dernières (Redjala *et al.*, 2009). Une fois absorbés et acheminés jusqu'au xylème, les ET sont transportés sous forme libre ou complexée vers les parties aériennes (Prasad, 2004 ; Gangwar *et al.*, 2014). Les formes complexées ET - ligand sont présentées dans la partie V de ce chapitre. Le transport des ET ne s'effectue pas à la même vitesse car il existe des différences de mobilité au sein de la plante : par exemple Cd et Zn sont plus mobiles que Cu et Pb (Tremel-Schaub et Feix, 2005). La sortie du xylème et la distribution des ET dans les différents organes aériens fait intervenir beaucoup de transporteurs membranaires communs avec ceux mentionnés précédemment dans la partie III.1. (beaucoup de familles de transporteurs sont similaires à celles présentes dans les racines mais les isoformes peuvent être différentes). Il est à noter toutefois que le transport des ET par le phloème est moins aisé que par le xylème. En effet, les cellules qui le constituent sont vivantes et contiennent des molécules (glucides solubles, lipides, acides aminés, facteurs de croissance, ions...) sur lesquelles peuvent se fixer les ET, ce qui peut constituer un frein au transport (Salim *et al.*, 1992 ; Greger, 1999 ; Prasad et Hagemeyer, 1999 ; Tremel-Schaub et Feix, 2005).

### **3. Répartition des ET à l'échelle de la plante entière**

Les ET ne sont pas localisés de manière homogène dans tous les tissus car leur stockage va dépendre de l'espèce végétale, de la quantité absorbée par celle-ci ainsi que de sa capacité à

les transporter des racines vers les parties aériennes. Généralement les racines ont tendance à accumuler les ET alors que les parties liées à la reproduction comme les fleurs, les fruits et les graines ont plutôt tendance à les exclure (Tremel-Schaub et Feix, 2005). Chez les plantes sensibles, ce sont les racines (zone en contact avec la contamination) qui stockent le plus d'ET contrairement aux espèces hyperaccumulatrices (Mc Grath *et al.*, 2002). Par exemple, la répartition préférentielle des ET dans les racines a été confirmée chez *Pinus halepensis* exposé au Zn, au Ni ou au Cu pendant une durée d'exposition de 3 ou 8 mois (Fuentes *et al.*, 2007a et b). Une autre étude effectuée sur des jeunes plantules de mélèze hybride cultivées *in vitro* (*Larix x eurolepis*) âgées de 4 semaines et exposées pendant une semaine à 1,5 mM de Cd confirme l'accumulation préférentielle des ET dans les racines (386 mg. kg<sup>-1</sup> MS) par rapport aux parties aériennes (208 mg. kg<sup>-1</sup> MS) (Moussavou Moudouma *et al.*, 2013). De même, en utilisant des sapins de Douglas âgés de 3 ans et exposés pendant 9 mois à 25 mg.kg<sup>-1</sup> de Cd, Astier *et al.* (2014) ont observé une distribution similaire, c'est-à-dire plus de Cd dans les racines (25 mg. kg<sup>-1</sup> MS) que dans les organes aériens (5 mg. kg<sup>-1</sup> MS). Cette répartition majoritaire des ET au niveau racinaire varie cependant selon les espèces. Bergqvist et Greger (2012) ont comparé la distribution de l'As chez l'épicéa commun (*Picea abies*) et le pin Sylvestre (*Pinus sylvestris*) et ont constaté que l'épicéa accumulait plus d'As dans les parties aériennes (5,18 mg. kg<sup>-1</sup> MS) que dans les racines (3,17 mg. kg<sup>-1</sup> MS) tandis que le pin sylvestre en accumulait plus dans les racines (9,21 mg. kg<sup>-1</sup> MS) que dans les parties aériennes (5,51 mg. kg<sup>-1</sup> MS).

Quelles que soient les espèces végétales, la teneur en ET n'est pas similaire dans tous les organes. Les jeunes organes sont souvent protégés afin de maintenir leur croissance et leur développement. Concernant des plantules de *Pinus sylvestris* âgées de 6 semaines traitées au Zn (150 µM), Ivanov *et al.* (2011) ont expliqué que les tiges et les cotylédons représentaient une sorte de "zone barrière" afin de limiter le transport du Zn dans les aiguilles et donc de protéger l'appareil photosynthétique. Dans cette étude, la teneur en Zn dans les aiguilles (300 mg. kg<sup>-1</sup> MS) était deux fois inférieure à celle des tiges et des cotylédons. Astier *et al.* (2014) ont montré un résultat similaire avec des sapins de Douglas âgés de 3 ans et ayant été exposés à 25 mg.kg<sup>-1</sup> de Cd pendant 9 mois. Les teneurs en Cd étaient en effet plus élevées dans l'écorce (6,2 mg. kg<sup>-1</sup> MS) et le bois (3,5 mg. kg<sup>-1</sup> MS) que dans les aiguilles (2,6 mg. kg<sup>-1</sup> MS) et les bourgeons (1,5 mg. kg<sup>-1</sup> MS), probablement pour protéger les organes photosynthétiques et les futurs rameaux. Toutefois, ce phénomène n'est pas toujours observé : Mingorance *et al.* (2007) ont constaté plus de Fe, Mn et Pb dans les aiguilles que dans l'écorce et le bois de *Pinus pinea*,

tandis que le Cr, le Cu et le Zn étaient préférentiellement stockés dans l'écorce. Enfin, il a été montré chez plusieurs Brassicacées hyperaccumulatrices de Ni du genre *Alyssum*, qu'au sein de leurs feuilles, le Ni était stocké préférentiellement dans les tissus épidermiques et plus particulièrement dans les trichomes (Broadhurst *et al.*, 2004). En général, les ET sont préférentiellement présents dans les feuilles âgées, protégeant ainsi les jeunes feuilles en leur permettant d'investir davantage d'énergie pour leur croissance. En outre, il a été observé un processus de détoxification par abscission des feuilles diminuant ainsi les concentrations métalliques dans la plante (Baker, 1981). Par exemple, les feuilles âgées d'*Armeria maritima* peuvent avoir des concentrations en Cu, Cd, Zn et Pb 3 à 8 fois supérieures à celles des jeunes feuilles (Dahmani-Muller *et al.*, 2000). De plus, les jeunes feuilles de la fougère *Pteris vittata* hyperaccumulatrice d'As semblent stocker moins d'As que les feuilles matures, avec respectivement 5 et 7,5 g d'As. kg<sup>-1</sup> MS (pour un sol concentré à 200 mg As. kg<sup>-1</sup>) selon Tu et Ma (2002).

#### **IV. Compartimentation des ET au niveau intracellulaire**

Une fois absorbés, les ET sont transportés sous forme libre ou le plus souvent sous forme complexée à différentes molécules organiques du cytoplasme (Schuler et Bauer, 2011). En effet, sous forme complexée, le cation métallique ne peut exercer son effet toxique, ce qui assure une protection de la plante. La complexation offre alors une protection contre divers ET en excès et/ou toxiques et participe donc à la tolérance aux ions métalliques.

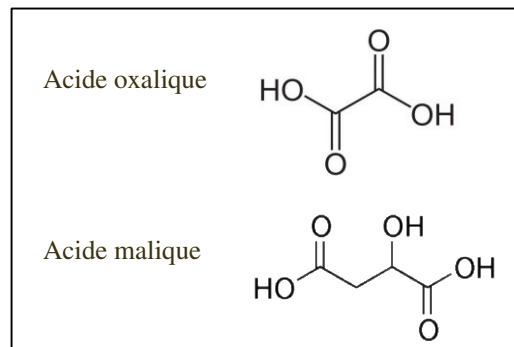
##### **1. Association des ET à divers ligands**

Les ligands peuvent être impliqués dans le transport et/ou dans la séquestration des ET dans divers compartiments de la cellule afin d'empêcher tout dommage cellulaire (Haydon et Cobbett, 2007). Ces ligands sont en concentrations variables selon les espèces végétales et peuvent être des acides organiques, des acides aminés libres, des oligopeptides riches en cystéine, des molécules chaperonnes... La nature des ligands diffère selon les organes et l'âge de la plante (Salt *et al.*, 1999).

###### **1.1 Les acides organiques**

Ces acides organiques (AcOg) peuvent être sécrétés par voie racinaire afin de solubiliser les ET et favoriser leur absorption, mais être également synthétisés dans les cellules, formant alors des complexes avec les ions métalliques absorbés afin de faciliter leur transport dans la

plante. Il s'agit principalement d'acides dicarboxyliques (acide oxalique et acide malique) ou tricarboxyliques (acide citrique) ayant une forte capacité de chélation par leur fonction carboxyle (figure 12). Ces acides joueraient un rôle dans le transport xylémien des ET des racines vers les parties aériennes (Rascio et Navari-Izzo, 2011). Les AcOg ont été proposés comme ligands cellulaires importants pour Zn, Cd et Ni (Rauser, 1999).



**Figure 12.** Formules semi- développées de deux acides organiques : l'acide oxalique et l'acide malique.

La concentration en AcOg est constitutivement élevée dans les plantes hyperaccumulatrices. Par exemple, des jeunes plantules hyperaccumulatrice de Cd de *Noccaea caerulescens* exposées à 50  $\mu\text{M}$  de Cd pendant un mois, ont une concentration en malate supérieure à 70 mM dans le contenu intracellulaire des feuilles, cette concentration restant constante quelles que soient les concentrations croissantes d'exposition (Ueno *et al.*, 2005). L'analyse de tissus provenant d'espèces hyperaccumulatrices par spectrométrie d'absorption des rayons X a mis en évidence l'importance des AcOg. Le citrate a été identifié comme le ligand prédominant pour Zn dans des feuilles de *N. caerulescens* tandis que le complexe Zn - malate semble être la principale forme de Zn dans les tissus aériens d'*Arabidopsis halleri* (Salt *et al.*, 1999 ; Sarret *et al.*, 2002 ; Kupper *et al.*, 2004). De même, le complexe Ni - citrate représente 25 % des formes du Ni dans les feuilles de l'hyperaccumulateur de Ni *Thlaspi goesingense* (Krämer *et al.*, 2000).

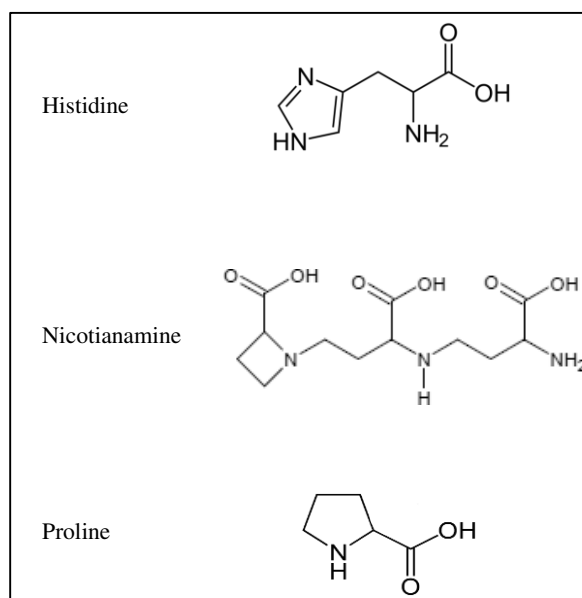
Une autre étude a été réalisée chez la fétuque rouge (*Festuca rubra*) en comparant une population provenant d'un site minier et une population provenant d'une zone non contaminée en ET (Harrington *et al.*, 1996). Les auteurs ont montré une augmentation du malate en réponse à un apport de Zn et de Cu chez la population issue du site minier mais pas chez l'autre

population de fétuque. Cet exemple montre que les AcOg seraient impliquées dans les mécanismes de tolérance.

Cependant, le rôle des AcOg, notamment du malate et du citrate, comme ligand dans les cellules est controversé. En effet, leur constante d'association aux ET est faible et la complexation serait négligeable à pH cytosolique selon Rascio et Navari-Izzo (2011). Leur implication ne serait donc pas au niveau du transport des ET mais plutôt au niveau de la séquestration vacuolaire car la formation de complexes AcOg - ET est favorisée en milieu acide (Callahan *et al.*, 2006 ; Haydon et Cobbett, 2007).

## 1.2 Les acides aminés libres et leurs dérivés

Quelques acides aminés libres ont été présentés dans la littérature comme des ligands potentiels de certains ET. Il s'agit majoritairement de l'histidine, de la nicotianamine (NA) et de la proline (figure 13).



**Figure 13.** Formules semi-développées de l'histidine, de la nicotianamine et de la proline.

### 1.2.1. L'histidine

L'histidine (figure 13) est un acide aminé formant des complexes stables avec certains cations divalents (Callahan *et al.*, 2006). Elle est présente en forte concentration au niveau des racines chez les hyperaccumulatrices et peut fixer le Ni, Zn et Cd (Persans *et al.*, 1999). Elle

est considérée comme l'acide aminé libre le plus impliqué dans l'hyperaccumulation du Ni et agit *via* ses fonctions carboxyle, amine et imidazole (Callahan *et al.*, 2006). Il a été montré que l'histidine augmente de manière dose-dépendante dans la sève brute de l'hyperaccumulatrice de Ni *Alyssum lesbiacum* mais pas chez l'espèce non-hyperaccumulatrice *Alyssum montanum* (Verbruggen *et al.*, 2009). Par ailleurs, l'Astéracée *Matricaria chamomilla* produit de fortes quantités d'histidine au niveau racinaire et il a été montré que le Ni reste majoritairement stocké dans les racines pour cette espèce (Kovacik *et al.*, 2007). Cela suggère ainsi que la corrélation entre synthèse d'histidine et transport ou accumulation de Ni est variable selon les espèces.

### 1.2.2. La proline

La proline est un acide aminé possédant de multiples fonctions. C'est un des osmoprotectants jouant un rôle primordial dans l'ajustement de la pression osmotique (Yamchi *et al.*, 2005). Sa fonction la plus importante est le maintien de la turgescence et le piégeage des ERO en excès (Zarei *et al.*, 2012). La proline agit comme un antioxydant et régule le statut d'oxydo-réduction cellulaire dans des conditions de stress (Chinnusamy *et al.*, 2005). Sa production en quantité non négligeable par les plantes a été mise en évidence en réponse à de nombreux stress comme les ET, le stress oxydant, la salinité, la sécheresse ou les ultraviolets (Szabados et Savouré, 2010). Un certain nombre de mécanismes par lesquels la proline augmente la résistance des plantes à la toxicité aux ET ont été proposés. Par exemple, Clemens (2006) a suggéré que l'accumulation de proline induite par les ET n'émanait pas directement du stress métallique mais de la perturbation de l'homéostasie hydrique due à l'excès de métal.

Gohari *et al.* (2012) ont montré que lorsque la plante était exposée à des concentrations croissantes de  $Pb^{2+}$  (100 à 400  $\mu M$ ), la concentration de proline dans les racines de colza (*Brassica napus*) augmentait de 5 à 10 fois mais que l'accumulation de celle-ci dans les parties aériennes y était moins remarquable. Cette même tendance d'accumulation majoritaire de la proline au niveau racinaire a été observée dans plusieurs études avec différentes plantes :

- ✓ le colza exposé au Pb et au Cd (John *et al.*, 2009),
- ✓ la morelle noire exposée au Cu (Fidalgo *et al.*, 2013),
- ✓ le blé exposé au Cd (Lesko et Simon-Sarkadi, 2002).
- ✓ la citronnelle exposée au Hg et au Cd (Handique et Handique, 2009).

Cependant, d'autres travaux indiquent une tendance opposée avec l'accumulation préférentielle de la proline dans les parties aériennes en réponse aux ET (Sharma et Dietz, 2006 ; Zengin et Kirbag, 2007). Par ailleurs, les concentrations en proline pouvant dépendre de la nature de l'ET, Kumar *et al.* (2012) ont constaté dans des semis de blé que le Cu était un plus fort inducteur de proline que le Zn. Rastgoo *et al.* (2011) ont étudié les effets de quantités équimolaires (50  $\mu\text{M}$  et 100  $\mu\text{M}$ ) d'ET (Cd, Co, Pb et Ag) sur *Aeluropus littoralis* et ont remarqué que l'accumulation maximale de proline dans la plante survenait lorsqu'elle avait été traitée au Cd. En 2007, Zengin et Kirbag ont montré que le contenu en proline dans le tournesol soumis à diverses quantités d'ET avait été fortement induit dans l'ordre suivant : Hg > Cd > Cu > Pb. Ces exemples d'études indiquent que la capacité d'un ET à induire une accumulation de proline peut dépendre de sa concentration et de sa spécificité, de son seuil de toxicité pour la plante, ainsi que de l'espèce végétale et de l'organe considéré.

Il a aussi été suggéré que la proline pourrait être impliquée directement dans la chélation de cations métalliques (Farago et Mullen, 1979 ; Xu *et al.*, 2009). Farago et Mullen (1979) ont constaté dans les racines d'*Armaria maritima*, une plante tolérante au Cu, que la proline pouvait réduire la concentration d'ions métalliques libres en les complexant et que l'amélioration de la tolérance au Cu pouvait être corrélée avec la formation de ce complexe Cu - proline. De même, des mesures avec une électrode spécifique du Cd ont révélé que l'addition de proline réduisait efficacement les concentrations de  $\text{Cd}^{2+}$  libre dans le tampon d'essai grâce à la formation d'un complexe Cd - proline (Sharma *et al.*, 1998). Il a aussi été proposé que la proline pourrait être importante plus particulièrement pour chélater les cations métalliques qui n'ont pas d'affinité pour les phytochélatines (PCs) (Hossain *et al.*, 2014).

### **1.2.3. La nicotianamine**

Il s'agit d'une petite molécule largement présente chez les plantes et synthétisée à partir de la condensation de trois molécules de S-adénosylméthionine (SAM), cette réaction étant catalysée par la nicotianamine synthase (NAS). De par ses fonctions amine et carbonyle, cette molécule possède dans sa structure 6 sites potentiels favorables à la formation de complexes hexadentates (Callahan *et al.*, 2007). La nicotianamine (NA) est impliquée dans la mobilisation, l'absorption, le transport et le stockage des ET, plus particulièrement du Fe, Zn et Ni pour lesquels elle a le plus d'affinité (Weber *et al.*, 2006 ; Rellán-Alvarez *et al.*, 2008 ; Schuler et Bauer, 2011). Le complexe ET - NA est pris en charge par des transporteurs transmembranaires

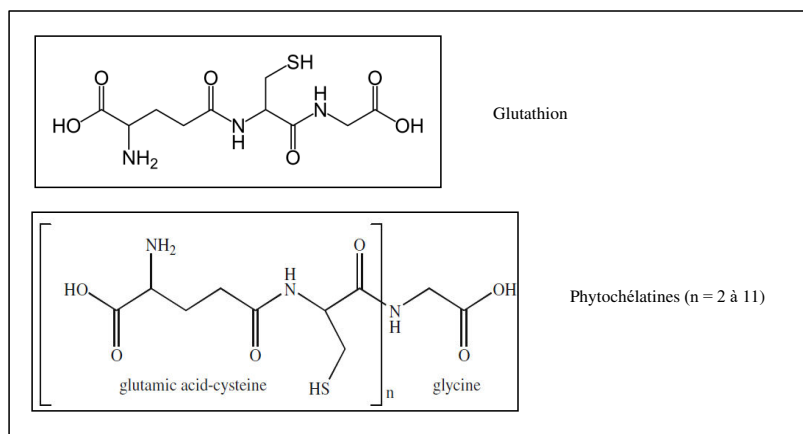


YSL (décrits dans la partie IV.2. de ce chapitre) dont le niveau constitutif a été montré comme beaucoup plus important chez des espèces hyperaccumulatrices d'ET (notamment de Ni) par rapport à des espèces sensibles (Talke *et al.*, 2006 ; Gendre *et al.*, 2007).

Bien que le gène de la NAS ne soit exprimé que dans les feuilles chez *Noccaea caerulea*, l'exposition de la plante au Ni provoque une accumulation de NA dans la racine et un complexe Ni - NA a été mis en évidence dans le xylème de cette même espèce végétale (Mari *et al.*, 2006 ; Ouerdane *et al.*, 2006). Ceci suggère ainsi que le Ni en excès dans la racine est complexé à la NA pour être acheminé *via* le xylème vers les parties aériennes pour y être stocké. Cependant, la NA a été détectée dans la sève brute d'hypocotyle de ricin mais aussi dans sa sève élaborée (Stephan et Scholz, 1993 ; Schmidke *et al.*, 1999). La même chose a été observée chez le colza suggérant que le transport d'ET complexé à la NA pourrait également s'effectuer des feuilles vers les racines (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2008). Il a d'ailleurs été montré que pour les ions  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  mais aussi d'autres ions comme  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$ , la stabilité de liaison avec NA est maximale à des valeurs de pH supérieures à 6,5. Ceci suggère donc que la NA est plus susceptible d'être un chélateur symplastique et se lierait donc aux ET de façon prédominante dans le cytosol des cellules et le phloème (Von Wiren *et al.*, 1999).

### **1.3. Oligopeptides riches en cystéine**

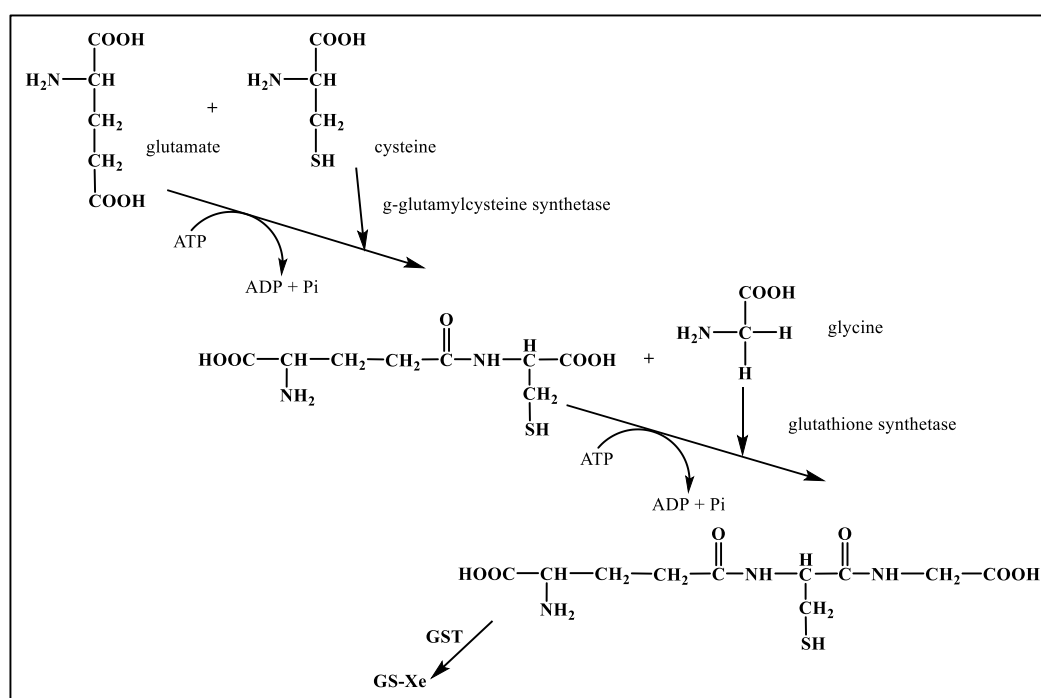
La cystéine est un acide aminé naturel ayant un rôle clé dans la complexation des ET grâce à son groupement thiol qui lui permet 1) de former des ponts disulfures très solides avec d'autres molécules possédant ce même groupement et 2) de fixer des ET. La cystéine est un précurseur essentiel de la synthèse de nombreuses molécules comme le glutathion (GSH), des vitamines (biotine, thiamine), des cofacteurs, des esters de soufre (coenzyme A) et des dérivés soufrés (Droux, 2004). Elle entre dans la composition d'oligopeptides connus pour fixer les ET comme le glutathion (GSH) et les phytochélatines (PCs) (figure 14).



**Figure 14.** Formules semi-développées du glutathion et des phytochélatines.

### 1.3.1. Le glutathion

Le glutathion (GSH) est un tripeptide ubiquitaire d'acide glutamique, de cystéine et de glycine synthétisé dans le cytoplasme et les chloroplastes. Sa biosynthèse met en jeu deux étapes successives : tout d'abord, la liaison du glutamate à la cystéine est catalysée par la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase ( $\gamma$ -ECS) formant la  $\gamma$ -glutamylcystéine ( $\gamma$ -EC) tandis que la glutathion synthétase (GS) catalyse dans un deuxième temps l'addition de la glycine à la molécule précédemment formée (figure 15).



**Figure 15.** Représentation schématique illustrant la voie de biosynthèse du glutathion (GSH) à partir de ses acides aminés constitutifs.

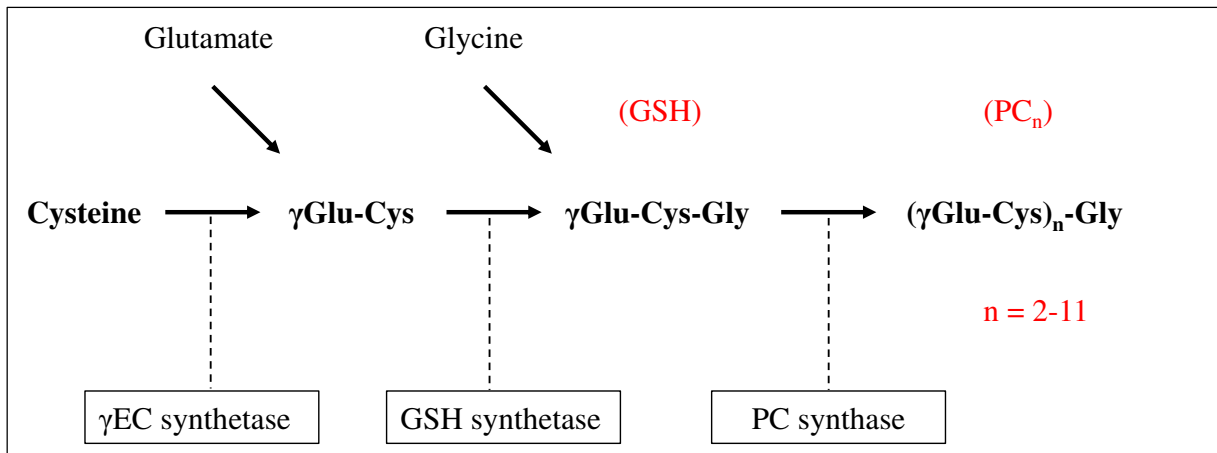
Le GSH peut former des complexes (GS-Xe) avec des xénobiotiques (Xe) dont des ET *via* la glutathion-S-transférase (GST) (adapté de Noctor *et al.*, 1998 et Mendoza-Cózalt et Moreno-Sanchez, 2006).

Le GSH est connu pour réguler l'état d'oxydo-réduction des cellules en luttant directement contre les ERO tels que l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , et indirectement par des voies de signalisation induisant l'expression de gènes codant pour des enzymes anti-oxydantes telles que la SOD (Noctor *et al.*, 2002). L'augmentation de sa production dans *T. goesingense* et dans d'autres hyperaccumulatrices de Ni du genre *Thlaspi*, fournit une protection contre les dommages oxydants dus à de fortes concentrations en Ni (Freeman *et al.*, 2004). De même, l'exposition au Cd stimule la biosynthèse de GSH chez *N. caerulescens* et l'exposition au Pb et au Zn stimule celle de *Sedum alfredii*, une hyperaccumulatrice de Cd (Sun *et al.*, 2005 ; van de Mortel *et al.*, 2006). Le GSH joue un rôle prépondérant dans la détoxification des ET tels que Cd, Ni, Pb et Zn, non seulement de par sa fonction anti-oxydante mais aussi de par sa capacité à fixer ces ET au niveau du groupement thiol de la cystéine (Sun *et al.*, 2005 et 2007 ; Freeman *et al.*, 2004 ; Verbruggen *et al.*, 2009).

Cependant, le GSH n'est pas le seul ligand riche en cystéine pouvant fixer des ions métalliques. En effet, le GSH sert de substrat à la synthèse des phytochélatines (PCs) qui sont également capables de piéger les ET et de manière généralement plus efficace que le GSH glutathion pour certains d'entre eux.

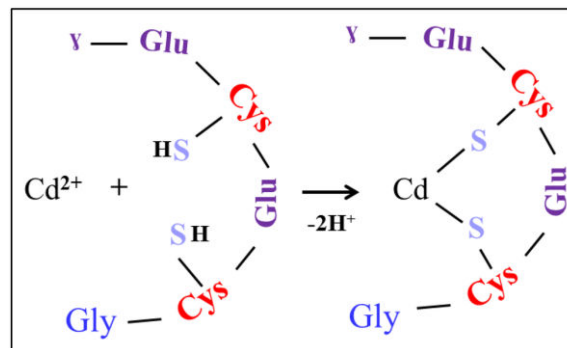
### 1.3.2. Les phytochélatines

Les phytochélatines (PCs) (figure 16) sont des oligopeptides ubiquitaires dans les végétaux synthétisés par voie enzymatique à partir du GSH. Elles sont composées de la répétition de 2 à 11 motifs glutamate - cystéine et d'un résidu glycine en position C-terminale, ce motif étant généralement compris entre 2 et 5 (Zenk, 1996). Par exemple, dans les racines de différentes espèces de Gymnospermes âgées d'1 an et ayant été exposées à des concentrations sublétales de Cd, il a été constaté une production importante de PCs de longueur de chaînes variant de 2 à 3 pour *Abies alba* et *Picea abies* et de 2 à 4 pour *Pinus pinea* et *Pinus sylvestris* (Bayçu, 2002). La PCS catalyse le transfert d'un motif  $\gamma\text{Glu-Cys}$  d'une molécule de GSH sur une autre afin de constituer une phytochélatine à 2 motifs. Puis, cette même enzyme catalyse l'ajout de nouveaux motifs  $\gamma\text{Glu-Cys}$ . Leur biosynthèse est activée en réponse à un stress oxydant causé par la présence d'ET intracellulaires et notamment par leur liaison à la PCS (Zenk, 1996). La PCS est activée lorsque deux molécules de GSH et un ET forment un thiolate (GS-ET-GS) (Mendoza- Cózalt *et al.*, 2005).



**Figure 16.** Illustration de la voie de biosynthèse des PCs (d'après Inouhe, 2005).

Les PCs sont connues pour être les molécules du cytoplasme fixant le plus souvent le Cd et avec une efficacité un peu moins importante Ag, Pb, Hg, Zn et Cu lorsqu'ils sont en forte concentration dans la cellule (Grill *et al.*, 1989). La chélation des ions métalliques libres s'effectue *via* le groupe thiol des cystéines, formant un complexe PC - ET dans lequel la toxicité de l'ET est très largement diminuée (Satofuka *et al.*, 2001) (figure 17).

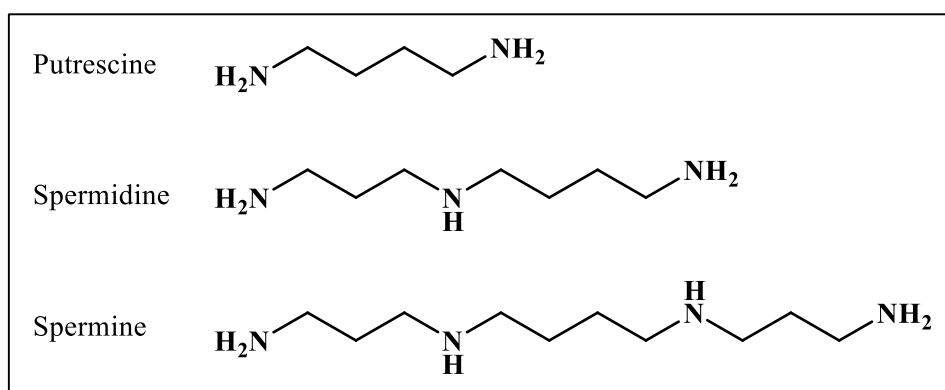


**Figure 17.** Modèle du complexe entre l'ion Cd<sup>2+</sup> et une molécule de PC (n = 2) (d'après Rodrigo *et al.*, 2013). Cys : cystéine, Glu : acide glutamique, Gly : glycine, S : soufre.

#### 1.4. Les polyamines libres

Les polyamines sont omniprésentes dans les cellules végétales, les plus importantes étant la putrescine (Put), la spermidine (Spd) et la spermine (Spm) (Smith, 1985) (figure 18). Ce sont des composés azotés aliphatiques de faible poids moléculaire que l'on trouve non seulement chez les plantes mais aussi chez les animaux et les bactéries (Alcázar *et al.*, 2006). Elles existent sous forme soluble ainsi que sous forme de fractions insolubles. La fraction

soluble se compose de polyamines libres et de polyamines conjuguées aux acides organiques. Les polyamines sont chargées positivement au pH physiologique ( $\approx 7$ ) et se comportent comme des polycations connus pour se lier à des molécules chargées négativement comme par exemple les acides nucléiques, les phospholipides membranaires, différents types de protéines ou encore des polysaccharides comme les pectines de la paroi cellulaire (D’Orazi et Bagni, 1987 ; Cohen, 1998 ; Martin-Tanguy, 2001 ; Groppa et Benavides, 2008). La liaison entre les polyamines et ces composés chargés négativement correspond à la fraction insoluble. La formation de tels composés protégerait ces macromolécules de leur dégradation ou de leurs modifications (Herrera-Ruiz *et al.*, 1995 ; d’Agostino *et al.*, 2005). Les polyamines ont été rapportées comme étant des antioxydants efficaces de par leur effet « protecteur » sur des composants cellulaires (membranes cellulaires, acides nucléiques) faces aux dommages oxydants (Løvaas, 1997).



**Figure 18.** Formules semi-développées de la putrescine, de la spermidine et de la spermine.

Chez les plantes, la synthèse de Put peut être réalisée par deux voies métaboliques (Martin-Tanguy, 2001) (figure 19). L'une de ces voies débute par la décarboxylation de l'arginine par l'enzyme arginine décarboxylase (ADC) située principalement dans les chloroplastes mais dirigée vers le noyau dans des cellules non photosynthétiques (Borrell *et al.*, 1995 ; Bortolotti *et al.*, 2004). Cette réaction conduit à la formation d'agmatine qui est ensuite métabolisée en N-carbamoylputrescine *via* l'agmatine iminohydrolase (AIH). La N-carbamoylputrescine est ensuite convertie en Put par l'enzyme N-carbamoylputrescine amidohydrolase (NCPAH). L'autre voie métabolique est initiée avec l'ornithine convertie en Put en une seule étape par l'intermédiaire de l'ornithine-décarboxylase (ODC) qui est localisée dans le cytosol de la plante. La Spm et la Spd sont produites à partir de la Put *via* l'addition de groupes aminopropyles dérivés de la S-adénylméthionine *via* la S-adénylméthionine

décarboxylase (SAMDC). Un premier groupe aminopropyle est ajouté à la Put par l'intermédiaire de la spermidine synthase (SPDS) formant ainsi la Spd. Dans une réaction d'aminopropylation, la spermine synthase (SPMS) ajoute ensuite un groupe aminopropyle à la Spd formant ainsi à la Spm.

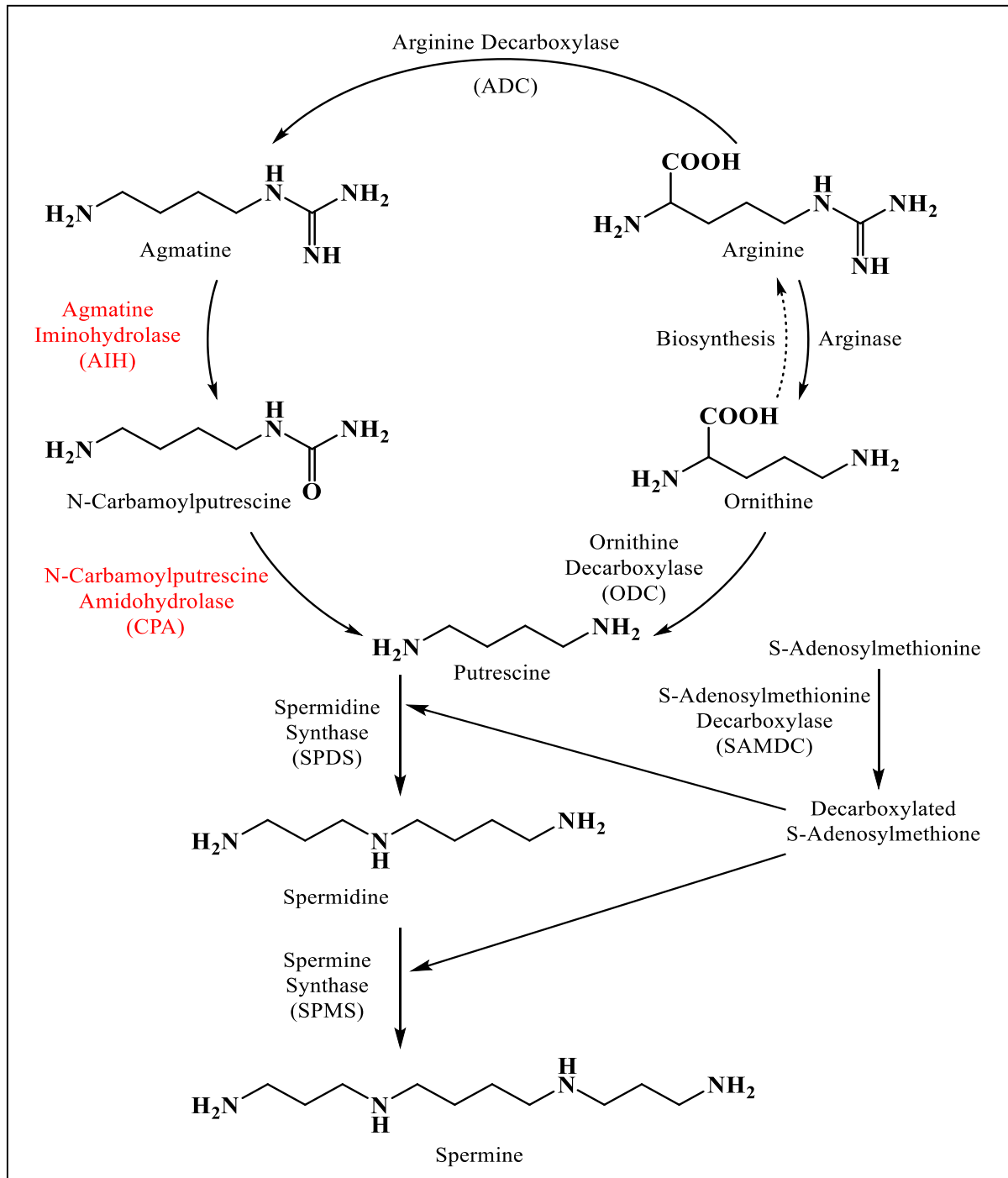


Figure 19. Schéma de biosynthèse des polyamines dans une plante (d'après le site internet 9).

Les polyamines sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques tels que la division cellulaire, la réplication de l'ADN, la différenciation cellulaire ainsi que dans les mécanismes de défense lors de stress biotiques et abiotiques (Bouchereau *et al.*, 1999 ; Groppa *et al.*, 2007a). Une régulation précise de la concentration en polyamines est nécessaire et une trop faible teneur ou au contraire une teneur trop élevée peut être délétère (He *et al.*, 1993 ; Poulin *et al.*, 1993). Par conséquent, plusieurs processus tels que la synthèse, le catabolisme, le transport, la compartimentation et la conjugaison agissent de concert pour maintenir la concentration de ces composés à des niveaux appropriés (Kusano *et al.*, 2007 ; Carbonell et Blázquez, 2009). Ainsi la conjugaison des polyamines serait un mécanisme utilisé par les cellules végétales pour réguler la concentration intracellulaire des formes libres et ces conjugués pourraient représenter jusqu'à 90 % du contenu total en polyamines (Bagni et Tassoni, 2001).

Une perturbation de la concentration en polyamines a été mise en évidence lors d'un stress métallique, notamment sous l'action de Cd et du Cu (Groppa *et al.*, 2007a et 2007 b ; Sharma et Dietz, 2006). Il a été mis en évidence dans des disques foliaires de tournesol ayant été traités pendant 14 h à 0,5 mM de CdCl<sub>2</sub> ou CuCl<sub>2</sub>, que la concentration en polyamines était affectée différemment selon l'ET (Groppa *et al.*, 2001). Le Cd et le Cu réduisaient respectivement la teneur en putrescine de 48% et 39 % par rapport au témoin, et la spermidine de 41% et 79 % respectivement tandis que le contenu en spermine n'était pas affecté quelque soit l'ET. Une régulation positive du métabolisme des polyamines a été reportée chez des peupliers cultivés *in vitro* et en serre en réponse à des fortes concentrations en Zn et Cu (Franchin *et al.*, 2007 ; Lingua *et al.*, 2008). Chez de jeunes germinations d'*Atriplex atacamensis*, il a été observé qu'une exposition en hydroponie de 28 jours à 100 et 1000 µM d'arséniate (Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O) induisait une augmentation des concentrations en Put, Spd et Spm dans les feuilles et les racines (Vromman *et al.*, 2011). La Put, la Spd et la Spm présentent respectivement 2, 3 et 4 charges positives par molécule à pH physiologique il n'est donc pas exclu que ces polycations puissent complexer les anions arséniate. Ces résultats confirment que la variation de ces métabolites ne dépend pas seulement de la concentration des ET testés mais aussi des espèces végétales (Groppa *et al.*, 2001).

Leur accumulation en réponse aux ET jouerait un rôle anti-oxydant en piégeant les radicaux libres (Løvaas, 1997 ; Groppa *et al.*, 2001 et 2003 ; Balestrasse *et al.*, 2005). Cependant, Bors *et al.* (1989) ont démontré que les polyamines n'étaient pas les meilleurs candidats comme

piégeurs de radicaux. Løvaas (1997) indique qu'ils jouent un rôle anti-oxydant dans les cellules en raison de leur combinaison de propriétés de liaison aux anions et aux cations. En effet, les polyamines fonctionneraient comme des chélateurs d'ET et seraient de bons candidats dans la protection de cellules végétales contre les dommages oxydants induits par un ET en raison de leur forte affinité pour les membranes biologiques et parce qu'elles sont facilement induites en réponse à des conditions de stress.

Face au stress métallique, il semblerait que les polyamines libres ne jouent pas uniquement un rôle d'anti-oxydant. En effet, il a été montré qu'elles pouvaient former des complexes avec plusieurs ions métalliques tels que les cations  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  (Hares *et al.*, 1956 ; Bertsch *et al.*, 1958) mais ces études ont été menées en solution à différents pH et différentes températures. Les constantes de stabilité des complexes augmentent avec le nombre de groupes amines et leurs positions dans la molécule, ainsi qu'avec la longueur de chaîne de la polyamine (Løvaas, 1997 ; Groppa *et al.*, 2001). De Agazio *et al.* (2000) ont montré que l'addition exogène de Spm augmentait d'environ 2,5 fois l'accumulation du Pb dans des plantules de maïs et suggèrent que cela serait dû à la formation de complexes Spm - Pb. Shevyakova *et al.* (2008) ont constaté également que l'ajout exogène de Put dans le milieu de culture favorisait nettement l'accumulation du Ni d'un facteur 2 à 3 dans les feuilles de colza tout en diminuant la toxicité de celui-ci envers la plante. Ces derniers auteurs suggèrent que le transport facilité du Ni dans la plante et la diminution de sa toxicité à son égard (croissance et pigments photosynthétiques) seraient liés à une chélation du Ni avec la Put.

## 1.5. Protéines chaperonnes

**Les métallothionéines (MTs)** sont des petites protéines présentes chez la plupart des eucaryotes et chez de nombreux procaryotes (Palmiter, 1998). Elles sont composées de 45 à 80 acides aminés et sont très riches en résidus cystéine. Leur classification est basée sur l'arrangement des résidus Cys et quatre classes sont distinguées (tableau 12) (Cobbet et Golsbrough, 2002). Généralement, elles présentent deux domaines globulaires distincts contenant 4 à 8 Cys chacun, reliés entre eux par une courte séquence d'acides aminés (30 à 50 acides aminés) dénuée de Cys (Domènech *et al.*, 2006 ; Freisinger, 2008). Néanmoins, les MTs de classe 4 ont un troisième domaine riche en Cys et certaines de classe 1 ont leur deux domaines reliés par une courte séquence d'une dizaine d'acides aminés. Les MTs semblent être



capables de montrer une affinité pour plusieurs ET tels que As, Cd, Cu et Zn (Yang et Chu, 2011). Leur distribution spatiale dans les plantes est variable : globalement les MTs de classe 2 (MT2) s'expriment essentiellement dans les parties aériennes tandis que les MT1 sont majoritairement synthétisées dans les parties souterraines (Cobbett et Goldsbrough, 2002 ; Guo *et al.*, 2003). Celles de type 3 se retrouvent préférentiellement au niveau des fruits matures alors que celle de type 4 sont particulièrement abondantes au niveau des graines (White et Rivin, 1995 ; Abdullah *et al.*, 2002).

**Tableau 12.** Classification des métallothionéines (adaptée de Cobbett et Goldsbrough, 2002).

Classe de MTs	Domaines riches en Cys	Acides aminés reliant les domaines riches en Cys	Distribution des résidus Cys
MT1	2	~ 40 (~ 10 pour quelques isoformes)	6 motifs Cys-X-Cys distribués de la même manière dans les 2 domaines riches en Cys
MT2	2	~ 40	1 <sup>ère</sup> paire de Cys en position 3 et 4. Présence d'un motif Cys-Gly-Gly-Cys en région N-terminale et de 3 motifs Cys-X-Cys en région C-terminale.
MT3	2	~ 40	4 Cys en région N-terminale. Les 3 premiers résidus sont présents dans la séquence Cys-Gly-Asn-Cys-Asp-Cys, le dernier est contenu dans le motif Gln-Cys-X-Lys-Lys-Gly. Présence de 6 Cys en région C-terminale arrangées dans 6 motifs Cys-X-Cys.
MT4	3	10 à 15	5 à 6 Cys par domaine, généralement présentes dans un motif Cys-X-Cys.

X : acide aminé autre que la cystéine.

D'autres protéines interviennent dans la liaison aux cations métalliques. Par exemple, une protéine de **type CCH (Copper CHaperone)** a été identifiée dernièrement au niveau du phloème chez *Arabidopsis thaliana* et interviendrait dans la redistribution de Cu provenant des feuilles sénescents (Mira *et al.*, 2001). Une seconde protéine de type CCH a également été identifiée dans le cytoplasme de cette espèce (Puig *et al.*, 2007). Elle acheminerait le Cu vers les vésicules golgiennes *via* une pompe ATPase. En effet, Cu est un co-facteur de nombreuses enzymes comme la Cu/Zn SOD chloroplastique (enzyme anti-oxydante) et la cytochrome c

oxydase impliquée dans la respiration au niveau des mitochondries. Il intervient aussi dans la synthèse de récepteurs à éthylène et est intégré à ces derniers au niveau de l'appareil de Golgi (Stearns et Glick, 2003). Deux autres protéines chaperonnes ont également été mises en évidence : une de ces protéines, CCS1 (pour Copper Chaperone for Superoxide dismutase), est localisée dans les chloroplastes et a pour fonction d'acheminer le Cu impliqué dans le fonctionnement de SOD chloroplastiques. L'autre protéine, COX17 (pour Cytochrome OXydase), est localisée dans les mitochondries et jouerait un rôle dans le transport de Cu vers le complexe cytochrome oxydase (Balandin et Castresana, 2002 ; Wintz et Vulpe, 2002).

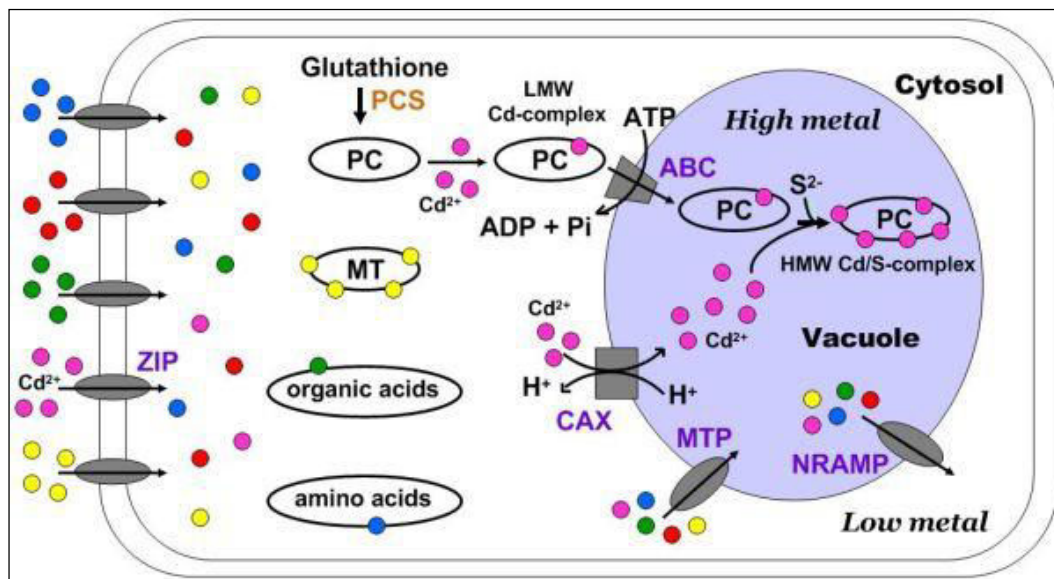
## **2. Séquestration dans la vacuole et devenir du complexe ET - ligand**

Les ET peuvent générer des effets toxiques en s'accumulant dans le cytoplasme et avoir des conséquences létales chez les plantes non tolérantes. Les plantes sensibles mais faiblement exposées ainsi que les plantes tolérantes mettent en place une stratégie de séquestration qui rend l'élément biologiquement inactif. La vacuole est à la fois un lieu de stockage des ET essentiels afin de constituer un réservoir dans lequel la cellule peut puiser selon ses besoins, mais aussi un lieu de stockage de composés toxiques. De plus, elle est moins sensible aux oxydations par rapport aux autres organites et représente le lieu de séquestration majoritaire des ET. La compartimentation vacuolaire des ET est une des stratégies majeure de tolérance au stress métallique (Dietz *et al.*, 2001). Cette compartimentation est réalisée grâce à des ligands et plusieurs familles de transporteurs situés au niveau du tonoplaste (Hall et Williams, 2003).

**Les transporteurs antiports cation / H<sup>+</sup>.** Ils permettent l'entrée de cations (dont les cations métalliques) dans la vacuole avec parallèlement une sortie de protons. Certains membres de la famille multigénique CAXs (Calcium Antiporter exchanger) participeraient à l'entrée de Cd et de Mn, deux compétiteurs du Ca, indiquant que certains transporteurs CAX seraient particulièrement sélectifs des cations divalents (Salt et Wagner, 1993 ; Hirschi *et al.*, 2000 ; Korenkov *et al.*, 2007). Le transporteur CAX2 pourrait être une voie d'entrée privilégiée des ET étant donné que cet antiport possède une plus faible affinité pour Ca (Pittman *et al.*, 2005). Les protéines CDF (Cation Diffusion Facilitators) sont des antiports ayant comme co-transporteurs les ions H<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> (Nagata *et al.*, 2008). Elles possèdent 6 domaines transmembranaires et un domaine de liaison aux cations à l'extrémité C-terminale (Paulsen et Saier, 1997). Ces transporteurs permettent l'efflux d'ions métalliques tels que Cd, Co, Mn, Ni

et Zn depuis le cytoplasme vers l'extérieur de la cellule ou vers les vacuoles (Kim *et al.*, 2004 ; Palmiter et Huang, 2004).

**La superfamille des transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette).** Ces transporteurs sont des protéines ATP-dépendantes que l'on retrouve au niveau des membranes plasmiques, mitochondriales ou vacuolaires selon leur sous-famille. Ils transportent dans la vacuole une large gamme de substrats tels que des pigments, des glucides, des lipides, des antibiotiques, des ions et des xénobiotiques organiques (Hall et Williams, 2003). Certains d'entre eux sont regroupés dans la sous-famille HMT (Heavy Metal Tolerance) ou MRP (Multidrug Resistance associated Protein) qui participe au transport des ET sous forme complexée au GSH ou à des PCs du cytoplasme vers les vacuoles (Rea *et al.*, 1998 ; Rea, 1999 ; Verrier *et al.*, 2008).



**Figure 20.** Représentation schématique de la formation et de l'accumulation de divers complexes ligand - ET, notamment des complexes PC - ET à haut poids moléculaire (HMW pour High Molecular Weight) dans les vacuoles à partir de l'exemple des ions Cd<sup>2+</sup> (d'après Yang et Chu, 2011).

Les ions Cd<sup>2+</sup> pénètrent dans le cytosol grâce à diverses protéines transmembranaires comme les transporteurs ZIPs, stimulant ainsi la synthèse intracellulaire de PCs *via* la PCS. Une fois dans le cytoplasme, les complexes formés PC - Cd de faible poids moléculaire (LMW pour Low Molecular Weight) sont transportés vers la vacuole *via* les transporteurs ABC. Dans la vacuole, ces derniers forment des complexes HMW avec d'autres complexes PC - Cd mais aussi avec des formes libres Cd<sup>2+</sup> (entrées par d'autres transporteurs que les transporteurs ABC, tels que les transporteurs CAX et CDF ou MTP) et des ions sulfure S<sup>2-</sup>. Les transporteurs Nramp interviennent dans leur remobilisation par efflux dans le cytoplasme. D'autres chélateurs tels que les AcOg, les MT et les acides aminés contribuent également à maintenir des ET dans un état faiblement toxique pour la plante.

Une fois dans la vacuole, ce type de complexe peut être stabilisé par addition de sulfures mais également par d'autres ET entrés sous forme libre par des transporteurs du type antiport

cation / H<sup>+</sup>, formant ainsi des complexes plus importants et stables de haut poids moléculaire PC - ET - S (figure 20) (Cobbett et Goldsbrough, 2002 ; Mendoza-Cózatl et Moreno-Sanchez, 2006). Cependant, d'autres auteurs remettent en question la stabilité de ces complexes de haut poids moléculaire et pensent qu'ils peuvent être dégradés par l'acidité de la vacuole dans certains cas. De ce fait, les ions métalliques ainsi libérés peuvent se lier à des acides organiques vacuolaires (malate, citrate ou oxalate) tandis que les ligands riches en Cys sont clivées en acides aminés pouvant migrer à nouveaux vers le cytoplasme et être ainsi réutilisés (Zenk, 1996 ; Grzam *et al.*, 2007).

### 3. Autres lieux de séquestration des ET

Les ET sont majoritairement stockés au niveau de la vacuole, notamment les ET non essentiels (afin de préserver les autres compartiments de la cellule) mais aussi les ET essentiels lorsqu'ils sont en excès. Les ET non essentiels ainsi que les ET essentiels mais en excès, peuvent toutefois être séquestrés dans d'autres organites (mais en plus faible concentration que dans la vacuole) comme par exemple les mitochondries ou le réticulum endoplasmique (Geisler *et al.*, 2000).

Les transporteurs présents au niveau des membranes intracellulaires (mitochondries, chloroplastes...) appartiennent à des familles de transporteurs déjà citées précédemment comme les familles ZIP, CDF et ABC (Hall et Williams, 2003). Une autre famille de transporteurs est également impliquée et correspond à des ATPases de type P qui tiennent leur nom du fait qu'elles utilisent l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour transporter divers substrats chargés à travers les membranes. Ces transporteurs se différencient des autres pompes ATPases par la formation d'un intermédiaire phosphorylé durant le cycle réactionnel (Williams *et al.*, 2000). Ils possèdent un domaine N-terminal cytoplasmique capable de lier divers ions métalliques tels que Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> ou Zn<sup>2+</sup> (Solioz et Vulpe, 1996 ; Williams *et al.*, 2000 ; Bernard *et al.*, 2004). Ces ATPases de type P sont rassemblées dans une sous-catégorie CPx (car elles contiennent un motif Cys-Pro-X) ou HMA (Heavy Metal ATPases) et sont de deux types : certaines transportent des cations métalliques monovalents comme l'Ag et d'autres des cations métalliques divalents comme Mn, Pb ou Zn (Geisler *et al.*, 2000 ; Gravot *et al.*, 2004 ; Mills *et al.*, 2005). Elle permettent aussi de transférer des ET dans le xylème des tissus racinaires puis de les libérer dans les organes aériens (Krämer *et al.*, 2007).

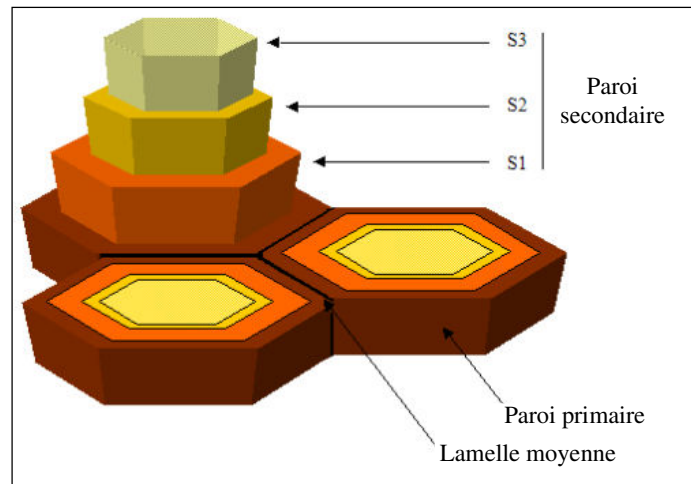
Les plantes ont acquis des mécanismes spécialisés afin de maintenir les ET essentiels dans les limites physiologiques et de contrôler l'accumulation excessive d'ET non essentiels (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2011). Il est donc capital qu'une homéostasie stricte soit maintenue dans la plante. Celle-ci est atteinte grâce à des systèmes de transport et de chélation qui vont favoriser la distribution des ET dans la plante ainsi que leur séquestration pour prévenir leur toxicité. Ces transporteurs sont essentiels au maintien de l'homéostasie intracellulaire (Nelson, 1999 ; Pilon *et al.*, 2009). Ils régulent l'absorption des ET dans les cellules de la racine mais aussi leur excrétion de celles-ci et leur transfert entre les cellules et entre le cytosol et les organites (Salt et Wagner, 1993 ; Ortiz *et al.*, 1995 ; Salt et Rauser, 1995 ; Gangwar *et al.*, 2014). Ainsi, les concentrations en ET dans les cellules sont finement contrôlées.

## **V. Compartimentation des ET au niveau pariétal**

De nombreux travaux ont montré le rôle de la paroi cellulaire en réponse aux ET. Le cloisonnement extracellulaire est une autre stratégie de défense utilisée par beaucoup de plantes afin de limiter les dommages causés par le stress métallique (Parrota *et al.*, 2015). Ce mécanisme implique l'accumulation des ET dans la paroi, cette dernière pouvant servir de réservoir tout comme la vacuole. Afin de comprendre comment les ET peuvent être retenus au niveau pariétal, il est important de connaître la structure et la composition de la paroi.

### **1. Structure de la paroi**

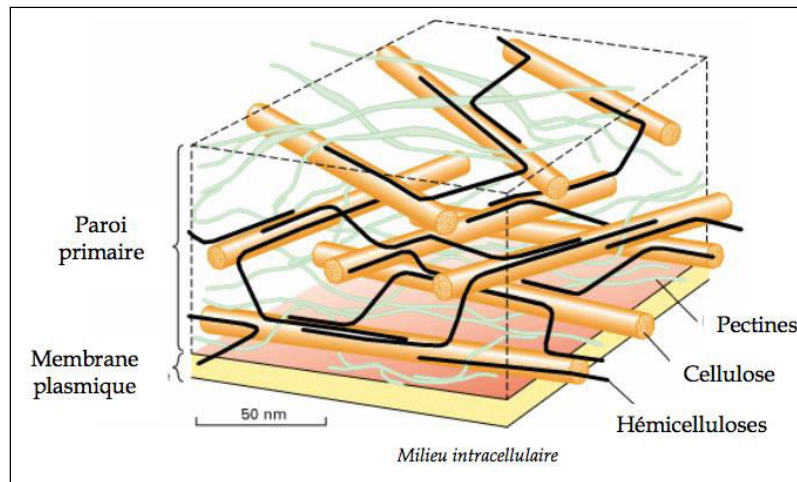
Les cellules végétales sont délimitées par une matrice extracellulaire appelée paroi, laquelle fournit une résistance mécanique importante. Elle est aussi considérée comme un organite à part entière et constitue un véritable continuum à l'interface du symplasme et de l'apoplasme (Mollet, 2006). Elle se compose d'un réseau tridimensionnel essentiellement constitué de polysaccharides, de composés phénoliques et de glycoprotéines (Darvill *et al.*, 1980 ; Fry, 1988). Sa structure et sa composition varient selon le niveau de différenciation des cellules et leur fonction (Gibeaut et Carpita, 1994). Elle protège de la dessiccation, des rayons ultraviolets et s'oppose aux chocs osmotiques tout en permettant les échanges intercellulaires et le passage de composés indispensables au métabolisme cellulaire. On distingue alors différents niveaux d'organisation avec de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule végétale : la lamelle moyenne, la paroi primaire et la paroi secondaire (figure 21).



**Figure 21.** Représentation schématique de la paroi et de ses trois niveaux d'organisation (d'après le site internet 10).

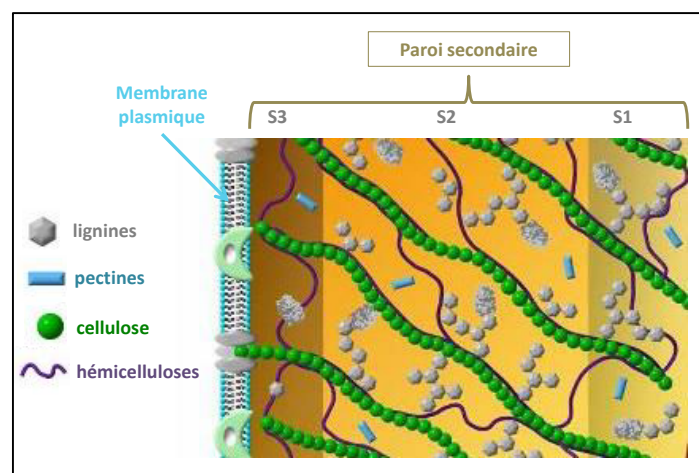
- **La lamelle moyenne** est la partie la plus externe de la paroi cellulaire. Elle apparaît de façon précoce au cours de la division cellulaire. Elle correspond à la partie commune située entre deux cellules adjacentes et en assure la cohésion. Son épaisseur varie de 0,2 à 1  $\mu\text{m}$ . Elle est principalement composée de substances pectiques et est dépourvue de cellulose.

- **La paroi primaire** est ensuite formée pendant la phase de croissance cellulaire. Elle reste fine (0,1 à 0,2  $\mu\text{m}$  d'épaisseur), flexible, extensible et montre une grande plasticité permettant ainsi l'élongation cellulaire (McCann *et al.*, 1994). C'est une structure très hydratée (jusqu'à 90 % d'eau) formée d'un réseau lâche de microfibrilles de cellulose disséminées dans une matrice amorphe composée de 9 à 25 % de cellulose, de 10 à 35 % de pectines, de 25 à 50 % d'hémicelluloses et d'environ 10 % de protéines (Bidlack *et al.*, 1992). Son squelette est constitué par les microfibrilles de cellulose ( $\approx 3$  nm de diamètre) résultant de l'assemblage parallèle de 36 chaînes de cellulose (Somerville, 2006). Ces dernières sont alors reliées entre elles par des hémicelluloses qui s'y associent par l'intermédiaire de liaisons non covalentes (liaison hydrogènes principalement) et des pectines, assurant un maintien efficace de la structure (figure 22).



**Figure 22.** Représentation schématique de l'organisation des polymères au sein de la paroi primaire (adaptée de McCann et Roberts, 1991).

- **La paroi secondaire** s'ajoute progressivement à la paroi primaire dans certains tissus lorsque la cellule a cessé sa croissance (figure 23). Elle est très épaisse (1 à 5  $\mu\text{m}$ ) et constituée d'un réseau fibrillaire de cellulose cristalline et d'hémicelluloses. Trois strates distinctes sont définies (S1, S2 et S3) selon l'orientation des fibrilles de cellulose. Ces structures polysaccharidiques, déjà présentes dans la paroi primaire, sont consolidées par le dépôt de polymères hydrophobes : les lignines. Cette imprégnation de lignine la fait ainsi évoluer d'une structure plastique et élastique à une structure rigide non déformable ayant une plus grande imperméabilité. Une fois cette paroi secondaire synthétisée, la plupart des cellules meurent. De par leur grande rigidité, les cellules à paroi secondaire sont présentes dans les tissus de soutien (sclérenchyme) ou conducteurs (xylème).



**Figure 23.** Représentation schématique de la paroi secondaire lignifiée. Les trois strates de fibrilles de cellulose S1, S2, S3 sont indiquées mais non représentées (d'après Achyuthan *et al.*, 2010).

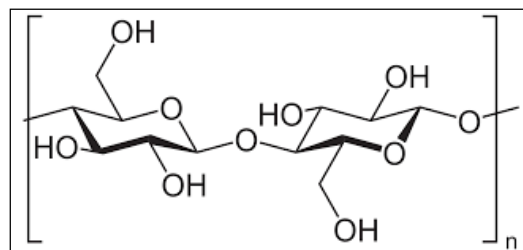
## 2. Principaux constituants de la paroi

La paroi est principalement composée de polysaccharides (cellulose, hémicelluloses et pectines) puis de lignine, et dans une moindre proportion de protéines (protéines de structures et enzymes).

### 2.1. Les polysaccharides

#### 2.1.1. La cellulose

La cellulose est la molécule organique la plus abondante sur Terre ainsi que le composé le plus important de la paroi des cellules végétales (Lindeboom *et al.*, 2008 ; Joshi *et al.*, 2011). La quantité de cellulose biosynthétisée par les plantes terrestres a été estimée à plus de 100 milliards de tonnes par an, constituant à elle seule 50 % de la masse végétale (Robert et Roland, 1998). C'est un homopolymère linéaire ayant pour unité de répétition le cellobiose (figure 24), motif composé de deux unités de D-glucopyranose liées par une liaison glucidique  $\beta$ -(1-4). Le degré de polymérisation (DP) représente le nombre d'unités glucidiques par chaîne de cellulose et varie de 300 à 15 000 selon la localisation de la cellulose au sein de la paroi et selon l'espèce végétale. C'est pourquoi la cellulose est considérée comme un polymère de haut poids moléculaire (jusqu'à  $2,5 \cdot 10^6$  Da). Elle est insoluble dans l'eau malgré la présence de nombreux groupes hydroxyle car la disposition de ces derniers permet l'établissement de liaisons hydrogènes intra et intermoléculaires. L'association de nombreuses chaînes de cellulose favorise l'établissement d'un état solide ordonné pseudocristallin permettant la formation de microfibrilles. C'est cette structure fibrillaire très condensée qui explique sa résistance mécanique à la traction et son insolubilité dans l'eau.



**Figure 24.** Structure du cellobiose. ( $n = DP$ ).



### 2.1.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses font partie des polysaccharides les plus abondants dans la nature après la cellulose (Saha, 2003). Elles regroupent tous les polysaccharides de la paroi qui ne sont ni cellulosiques, ni pectiques et qui sont alcalinosolubles, bien que certains soient aussi solubles dans l'eau. De par leur grande diversité due notamment à leur grande hétérogénéité de composition monosaccharidique, elles sont décrites de façon succincte et leur structure dépend de l'espèce végétale, du type de cellule et de leur âge ainsi que de leur localisation dans la paroi végétale. Il s'agit d'une classe de polysaccharides hétérogènes plus ou moins ramifiés dont les unités osidiques sont variées et reliées entre elles par des liaisons osidiques  $\alpha$  ou  $\beta$ . Ces monomères essentiellement présents sous forme pyranose sont des hexoses (glucose, galactose, mannose), des pentoses (arabinose, xylose), des déoxyhexoses (rhamnose, fucose) et des acides uroniques (acide galacturonique, acide glucuronique) (Alén, 2000). Concernant leur nomenclature, le suffixe " ane " désigne la nature polymérique de l'axe osidique précédé directement par le nom de la chaîne principale. Par exemple, les arabinoglucuronoxylanes et les glucogalactomannanes, qui sont des hémicelluloses caractéristiques du sapin de Douglas, sont respectivement construits sur des chaînes de xylose et de mannose (Winandy et Morrell, 1993). Les hémicelluloses les plus souvent décrites dans les parois cellulaires végétales sont les xyloglucanes, les xylanes et les mannanes (Cosgrove, 2005 ; Scheller et Ulvskov, 2010) :

- **Les xyloglucanes (XG)** ont un squelette de résidus glucose (Glc) sur lequel se greffent des résidus xylose (Xyl), galactose (Gal) et fucose (Fuc). Ce sont les hémicelluloses les plus abondantes dans la paroi primaire des dicotylédones et une grande diversité de chaînes latérales peut être présente sur leur squelette (Scheller et Ulvskov, 2010). Ces XG peuvent se lier fortement à la surface des microfibrilles de cellulose par des liaisons hydrogènes et par des liaisons covalentes selon la nature de leur squelette et de leurs chaînes latérales, contribuant à la rigidité de la paroi (Hayashi *et al.*, 2010 ; Park et Cosgrove, 2012).

- **Les xylanes** sont les composants majoritaires de la paroi secondaire des plantes terrestres et agiraient en enrobant les microfibrilles de cellulose afin d'empêcher leur agrégation en macrofibrilles (Reis et Vian, 2004 ; York et O'Neill, 2008 ; Gorshkova *et al.*, 2010). On distingue les hétéroxylanes qui sont majoritaires dans la paroi secondaire et les homoxylanes qui sont plus rares (York et O'Neill, 2008). Le squelette des hétéroxylanes est substitué à des degrés variables par des mono- ou disaccharides et sont souvent acétylés chez les plantes

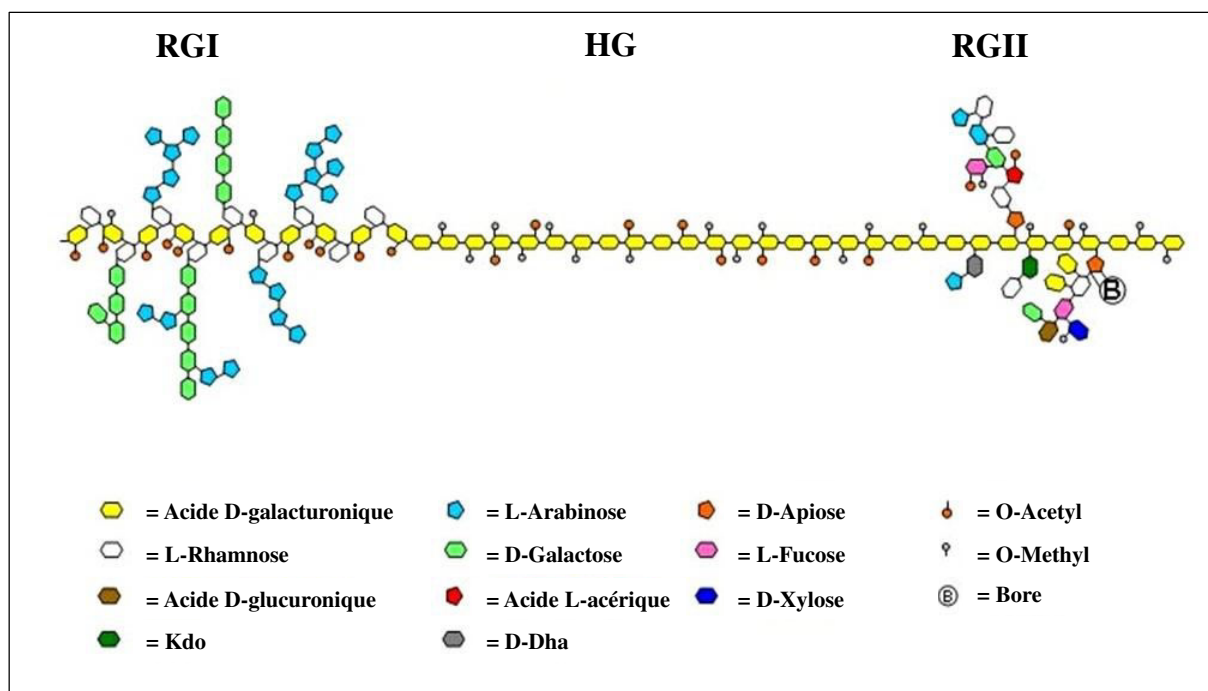
supérieures (Ebringerova et Heinze, 2000). Chez les Gymnospermes, les glucuronoarabinoxylanes qui ont un squelette de résidus xylose sur lequel se greffent des résidus arabinose et acide glucuronique, sont les plus courants (Ebringerova et Heinze, 2000).

- **Les mannanes** sont classés en 4 sous-familles : les mannanes linéaires, les glucomannanes, les galactomannanes et les galactoglucomannanes (Moreira et Filho, 2008 ; Scheller et Ulvskov, 2010). Les mannanes linéaires sont très connus en tant que composés de réserve dans les graines et peuvent également être impliqués dans les liaisons avec la cellulose par des liaisons covalentes comparables à celles des xyloglucanes et des xylanes (Liepman *et al.*, 2007 ; Marcus *et al.*, 2010 ; Scheller et Ulvskov, 2010).

### 2.1.3. Les pectines

Les pectines représentent à peu près 30 % de la paroi primaire (Ridley *et al.*, 2001 ; O'Neill et York, 2003). Ce sont les constituants essentiels de la lamelle moyenne qui sont biosynthétisés par l'intermédiaire d'une cinquantaine d'enzymes de type glycosyl-transférases (Ridley *et al.*, 2001). Les pectines forment une famille de polysaccharides riches en acide galacturonique (Gal.A) et diversifiés dans leur structure mais avec des caractéristiques communes (figure 25) (Willats *et al.*, 2001). Les pectines peuvent être constituées de plus de 17 monosaccharides différents, contenir plus de 20 types de liaisons différentes et être estérifiées par des groupes méthyl, acétyl et féruloyl (Willats *et al.*, 2001; Jolie *et al.*, 2010 ; Ralet *et al.*, 2010). Elles possèdent de nombreuses fonctions chez les plantes car elles peuvent intervenir dans la croissance, le développement, la morphogenèse, la porosité de la paroi, l'hydratation. Elles participent également à l'adhésion entre cellules et sont impliquées dans les mécanismes de défense et de signalisation cellulaire (Mohnen, 2008).

Les pectines représentent un groupe d'hétéropolysaccharides complexes ayant la capacité à former une matrice très hydratée pouvant s'organiser en gel. Il a été estimé qu'environ 90 % des acides uroniques de la paroi dérivent des résidus d'acides galacturoniques des pectines (Selvendran et O'Neill, 1987). On distingue ainsi trois domaines constitutifs distincts (figure 25) : le domaine constitué d'homogalacturonanes (HG), le domaine constitué de rhamnogalacturonanes de type I (RG-I) et le domaine formé par les rhamnogalacturonanes de type II (RG-II) (Jarvis, 1984).

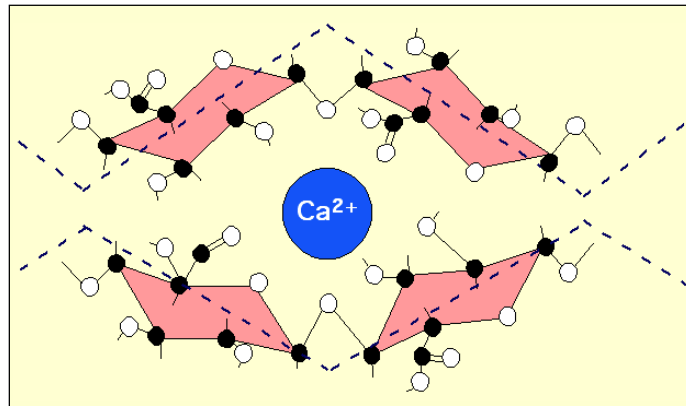


**Figure 25.** Représentation schématique des trois domaines (HG, RG-I et RG-II) constitutifs des pectines et de leurs arrangements possibles au sein de la paroi (d'après le site internet 11).

### 2.1.3.1. Le domaine homogalacturonane

Le domaine homogalacturonane (HG) est formé d'une chaîne principale d'unités d'acide galacturonique (Gal. A) liées en  $\alpha$ -(1-4) dans laquelle s'intercalent parfois en  $\alpha$ -(1-2) des résidus rhamnose (Rha), formant ainsi des «coudes» pectiques et conférant à l'ensemble une configuration en zig-zag. Cette zone est aussi qualifiée de lisse (« smooth region »). Les résidus Gal. A peuvent être méthyl-estérifiés sur leurs fonctions acide carboxylique en C6 (Thibault *et al.*, 1993 ; Mohnen, 1999). Les pectines peuvent alors être classées selon leur degré de méthylestérification (DME), défini comme le pourcentage de Gal. A estérifié par le méthanol rapporté à la totalité de GalA. On distingue les acides pectiques dont le DME est inférieur à 5 %, les pectines faiblement méthylestérifiées (PFME) avec un DME compris entre 5 et 50 % et les pectines hautement méthylestérifiées (PHME) qui ont un DME supérieur à 50 %. Leur DME va influencer sur l'extractibilité des pectines. En effet, la présence de Gal. A permet, par l'intermédiaire d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ , de lier deux chaînes HG non méthylestérifiées entre elles pour former un bloc de jonction, lequel participe à la prise en gel de l'ensemble du réseau (Ridley *et al.*, 2001). Dans ce cas, la structure est dite en « boîte à œuf » ou « egg box » (figure 26). Ainsi, la prépondérance de PFME favorisera l'adsorption des cations divalents (Krzeslowska, 2011). Les pectines peuvent être classées suivant leur mode d'extraction : à l'eau chaude pour les

PHME, par des agents chélateurs de cations divalents (EDTA, oxalate d'ammonium) pour les PFME ou à l'acide dilué à chaud pour la protopectine (acide polygalacturonique).



**Figure 26.** Représentation schématique de la structure en « boîte à œufs » ou « egg box » (d'après le site internet 12).

Des cations divalents comme Ca<sup>2+</sup> ou Cd<sup>2+</sup> peuvent se lier à 9 oxygènes par l'intermédiaire de liaisons de coordination et assurer ainsi la liaison entre 2 molécules de pectine. En pointillés est représentée la continuité de la chaîne polygalacturonique, en points noirs les atomes de C et en points blancs ceux d'O.

NB : dans certains cas, les motifs Gal. A peuvent être O-acétylés, c'est-à-dire estérifiés par des résidus d'acide acétique au niveau du C2 ou du C3 (Pauly et Scheller, 2000 ; Ridley *et al.*, 2001 ; Perrone *et al.*, 2002).

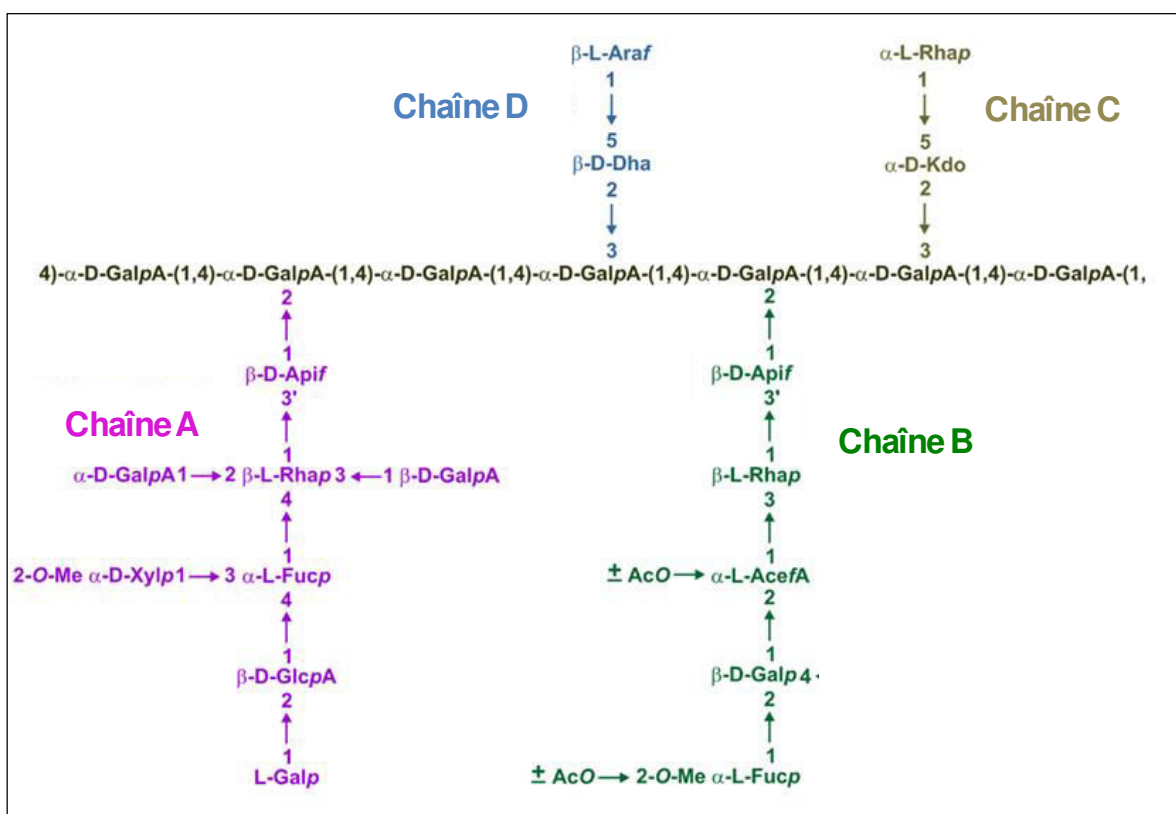
### 2.1.3.2. Le domaine rhamnogalacturonane de type I

Le domaine rhamnogalacturonane de type I (RG-I) est formé de polysaccharides dont la chaîne principale est composée de la répétition de motifs disaccharidiques  $\alpha$ -(1,4)-GalA- $\alpha$ -(1,2)-Rha, cette répétition n'étant pas stricte car le ratio Gal. A / Rha est rarement égal à 1 (Lerouge *et al.*, 1993 ; Mohnen, 1999). Les résidus Gal. A des RG-I peuvent être méthylestérifiés ou parfois O-acétylés en C2 ou en C3 (Komalavilas et Mort, 1989). La diversité des RG-I réside dans celle des chaînes latérales. En effet, entre 20 et 80 % des unités L-Rha sont substituées en C4 par des chaînes latérales variées d'arabinanes, de galactanes et/ou d'arabinogalactanes (Visser et Voragen, 1996 ; Buchanan *et al.*, 2000).

### 2.1.3.3. Le domaine rhamnogalacturonane de type II

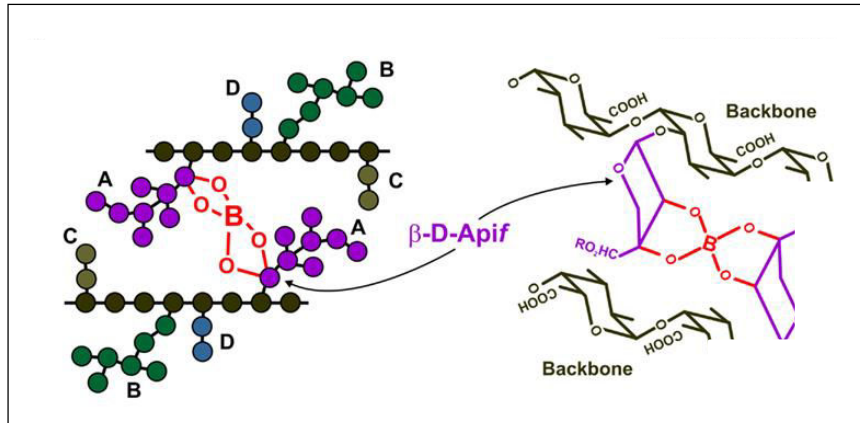
Le domaine rhamnogalacturonane de type II (RG-II) est peu présent voire absent de la lamelle moyenne pourtant riche en pectines (Matoh *et al.*, 1998). Leur biosynthèse nécessiterait

l'intervention d'une vingtaine de glycosyl-transférases, représentant ainsi presque la moitié des enzymes requises pour la biosynthèse de l'ensemble des pectines (Mohnen, 1999). L'élucidation de leur structure complexe fait toujours l'objet de nombreuses recherches (figure 27). Les RG-II sont constitués d'une dizaine de monosaccharides différents parmi lesquels des monosaccharides rares et/ou spécifiques tels que l'acide acérique (3-C-Carboxy-5-deoxy-L-xylofuranose), l'acide 3-deoxy-D-manno-octulosonique (Kdo), l'acide 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosarique (Dha) et l'apiose. Leur chaîne principale est formée d'au moins 9 résidus Gal. A liés en  $\alpha$ -(1-4) sur laquelle s'insèrent 4 chaînes latérales différentes (A, B, C et D) (figure 27) (Carpita et Gibeaut, 1993 ; Vidal *et al.*, 2000 ; O'Neill *et al.*, 2004).



**Figure 27.** Schéma représentatif de la structure polysaccharidique d'un RG-II (d'après Bar-Peled *et al.*, 2012).

La chaîne A (octasaccharide) et la chaîne B (heptasaccharide) sont attachées en C2 du Gal. A de la chaîne principale par un résidu d'apiose. Les chaînes C et D (disaccharides) sont liées en C3, respectivement par un résidu  $\alpha$ -Kdo et un résidu  $\alpha$ -Dha (Vidal *et al.*, 2000 ; Pérez *et al.*, 2003 ; Rodríguez-Carvajal *et al.*, 2003). Les RG-II sont majoritairement rencontrés sous forme dimérisée car un atome de bore peut relier 2 chaînes A par l'intermédiaire de leur résidu d'apiose (O'Neill *et al.*, 1996) (figure 28).

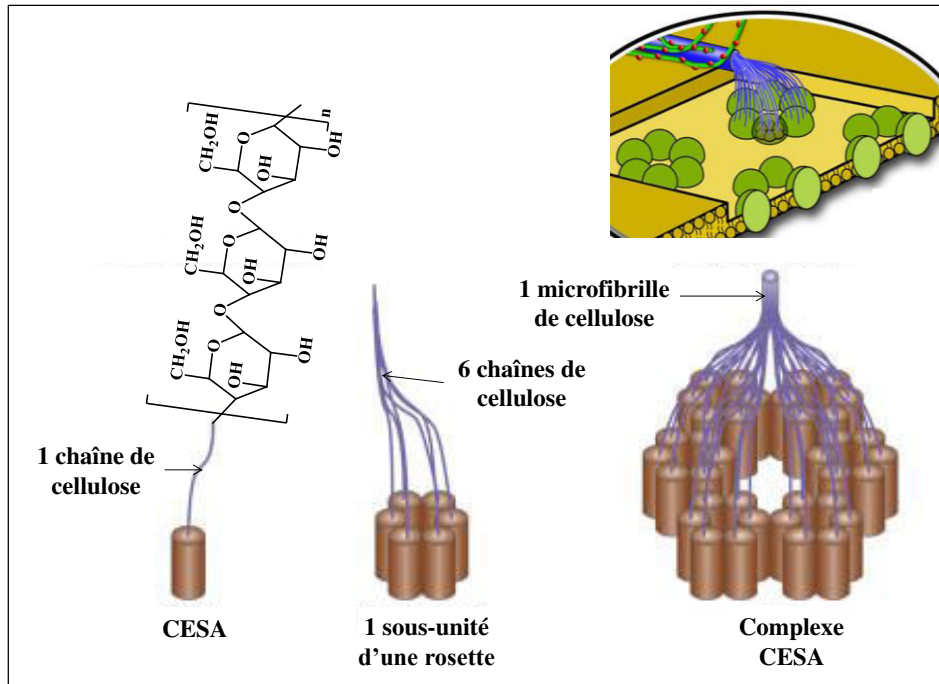


**Figure 28.** Schéma représentatif d'un dimère de RG-II formé *via* une liaison diester de borate se formant entre les résidus apiose des chaînes A de chaque sous-unité de RG-II (d'après Bar-Peled *et al.*, 2012).

La dimérisation des RG-II serait impliquée dans le contrôle de la rigidification mais également dans la régulation de la porosité pariétale (Fleischer *et al.*, 1999; Matsunaga *et al.*, 2004). Elle influencerait aussi sur l'incorporation de polymères dans la paroi en contrôlant l'accès des enzymes à la paroi ou à leur substrat ou en intervenant dans le transport des molécules (Fleischer *et al.*, 1999 ; Ridley *et al.*, 2001).

#### 2.1.4. Biosynthèse des polysaccharides pariétaux

Les  $\beta$ -glucanes constitutifs de la cellulose sont assemblés dans la membrane plasmique puis extrudés sous forme de microfibrilles par l'intermédiaire du complexe enzymatique CESA (cellulose synthase) (figure 29). Ce complexe est constitué de 6 sous-unités elles-mêmes agencées en rosette (Carpita, 2011). Chacune de ces sous-unités correspond au regroupement de 6 enzymes de cellulose synthase synthétisant chacune une chaîne constituée de résidus glucose liés en  $\beta$ -(1-4), les 6 chaînes formées étant ensuite assemblées pour former une microfibrille fonctionnelle (Cosgrove, 2005 ; Carpita, 2011).



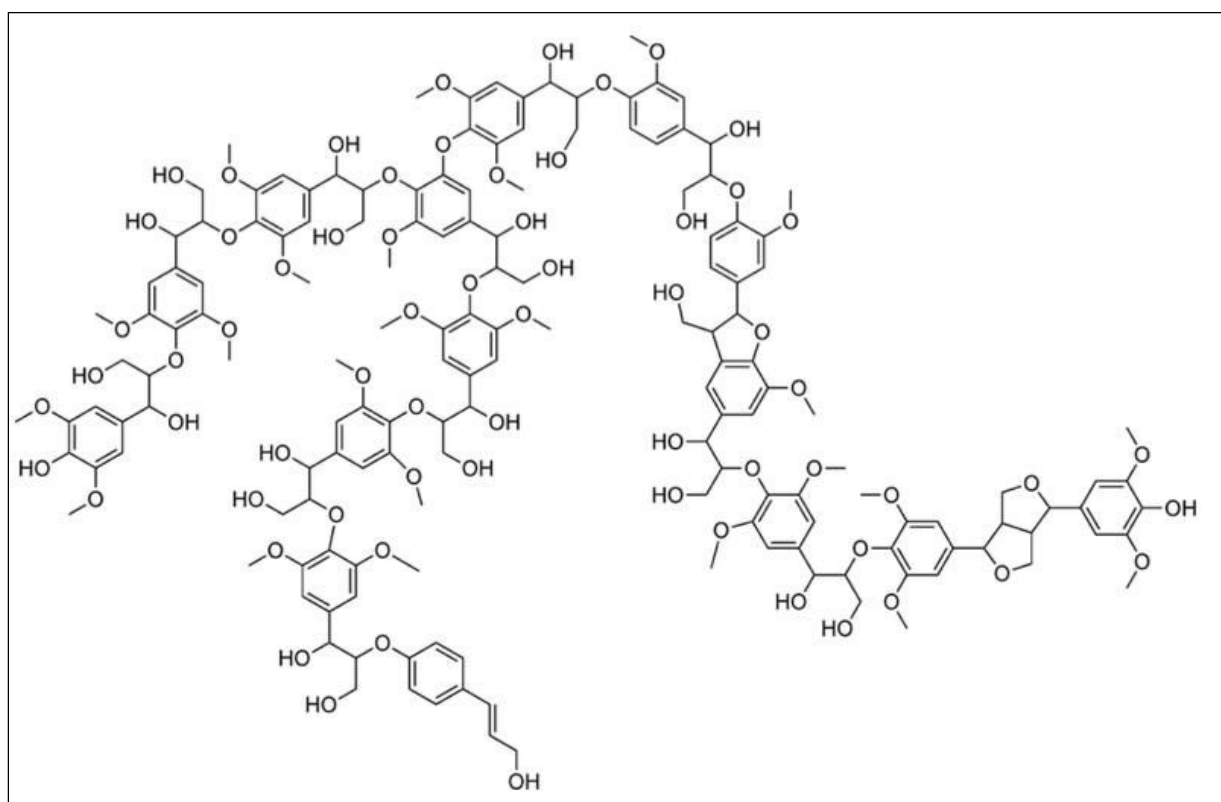
**Figure 29.** Schéma décomposé du complexe CESA représentant la synthèse des microfibrilles de cellulose par celui-ci (adapté de Cosgrove, 2005 et du site internet 13). Chacune des chaînes de cellulose est composée de monomères de glucose liés en  $\beta$ -(1,4) et est synthétisée par une protéine CESA (cellulose synthase). Dans ce modèle, 36 chaînes de cellulose, formées grâce au complexe CESA (constitué de 6 sous-unités), s'associent pour former une microfibrille de cellulose.

Concernant les polysaccharides constitutifs des hémicelluloses et des pectines, ils sont assemblés dans l'appareil de Golgi puis exportés par les vésicules golgiennes vers l'apoplaste dans lequel ils s'organisent pour former la paroi (Reyes et Orellana, 2008). Cette paroi peut ensuite être modifiée par différentes enzymes telles que les glycosyl-hydrolases (GH) ou les xyloglucane-endotransglycosidases. Par exemple, les polysaccharides constitutifs des pectines sont synthétisés dans le Golgi-cis, méthylesterifiés dans le Golgi-médian et substitués avec des chaînes latérales dans le Golgi-trans (Micheli, 2001). Les pectines sont sécrétées dans la paroi sous forme majoritairement méthylesterifiées et peuvent ensuite être modifiées par des enzymes telles que les pectines méthylestérases (PMEs) (présentée dans la partie V.2.3.1.2) (Liners et Van Cutsem, 1992 ; Goldberg *et al.*, 1996 ; Micheli, 2001).

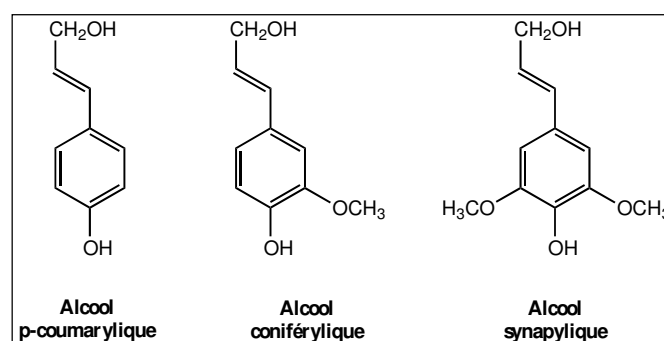
## 2.2. Les lignines

La lignine est la seconde substance organique produite sur terre après la cellulose (Nabors, 2008). Les lignines sont des polyphénols hydrophobes de haut poids moléculaire (figure 30) issus de la polymérisation aléatoire oxydative de trois monolignols (alcools

phénylpropénoïques) : l'alcool coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique (figure 31) (Boudet, 2000 ; Boerjan *et al.*, 2003). Cette polymérisation s'accompagne de liaisons covalentes avec la cellulose et les hémicelluloses assurant la bonne rigidité de la paroi à la fin du développement cellulaire. La proportion de ces trois monolignols et les liaisons intramoléculaires varient selon l'espèce végétale, l'âge, le type tissulaire, la localisation au sein de la paroi et les contraintes environnementales (Donaldson, 2001). Chez les résineux, la structure des lignines dérive à plus de 95 % de l'alcool coniférylique tandis que chez les feuillus, elle dérive à la fois de l'alcool coniférylique et de l'alcool sinapylique (Astier, 2010).



**Figure 30.** Structure hypothétique d'une lignine extraite à partir de sciure de bois de peuplier (d'après Barta *et al.*, 2010).



**Figure 31.** Structure des trois principaux monomères de la lignine (d'après Montanari, 2015).



### 2.3. Les protéines pariétales

La paroi des végétaux vasculaires contient généralement 3 à 6 % de protéines qui sont souvent des glycoprotéines (Albenne *et al.*, 2009). Ces protéines peuvent intervenir dans la structure de la paroi, la modification de composés pariétaux, la signalisation et les interactions avec la membrane plasmique (Jamet *et al.*, 2006 ; Albenne *et al.*, 2009). Ces protéines participent donc à l'élaboration et au remodelage de la paroi ainsi qu'à la défense contre les agents pathogènes.

#### 2.3.1. Les protéines structurales

Ce sont les protéines majoritaires de la paroi (Bao *et al.*, 1992). Elles formeraient des liaisons covalentes avec d'autres protéines ou des composés polysaccharidiques, renforçant ainsi les interactions entre les différents constituants pariétaux (Carpita et Gibeau, 1993 ; Albenne *et al.*, 2009). Selon leur composition en acides aminés et leur degré de glycosylation, on distingue les protéines à arabinogalactanes (AGPs), les extensines, les protéines riches en glycine (GRPs) et enfin les protéines riches en proline (PRPs) (Jamet *et al.*, 2006).

- **Les AGPs** sont fortement glycosylées et sont associées à la fois à la paroi et à la membrane plasmique. Elles peuvent interagir entre elles ou avec d'autres molécules de la paroi et ainsi contribuer à son épaissement (Showalter, 2001). Le plus souvent, les chaînes latérales des AGPs sont composées d'arabinogalactanes mais du rhamnose et de l'acide glucuronique peuvent être également incorporés (Yates *et al.*, 1996 ; Tan *et al.*, 2004). Quant à la composition de leur squelette protéique, les AGPs présentent une grande diversité. Elles ont des rôles multiples tels que l'implication dans la division et la différenciation cellulaire, l'adhésion et/ou la communication intercellulaire, l'apoptose ou encore la défense des plantes face aux pathogènes (Showalter, 2001 ; Sun *et al.*, 2004).

- **Les extensines** sont des glycoprotéines riches en hydroxyproline et sérine portant des ramifications arabinanes et galactanes (Sommer-Knudsen *et al.*, 1998). Il est possible que différents types d'extensines soient trouvés dans un même type cellulaire (Sommer-Knudsen *et al.*, 1998). Les extensines peuvent interagir avec des pectines (RG-I) par des liaisons covalentes et également avec des microfibrilles de cellulose (Cassab, 1998 ; Sommer-Knudsen *et al.*, 1998).

- **Les GRPs** sont des protéines caractérisées par une structure primaire contenant environ 70 % de glycine (Cassab, 1998 ; Ringli *et al.*, 2001). Il existe au moins deux classes de GRPs : une localisée dans la paroi et qui est régulée pendant le développement et l'autre localisée dans le cytoplasme (Showalter, 1993). Elles sont souvent très présentes au niveau du système vasculaire des plantes et sont associées notamment aux cellules lignifiées, ce qui suggère une interaction possible avec les lignines (Ringli *et al.*, 2001 ; Ryser, 2003). De plus, leur expression peut être stimulée en réponse aux stress biotiques ou abiotiques (Sachetto-Martins *et al.*, 2000).

- **Les PRPs** permettent d'établir des liaisons covalentes inter- et intra-moléculaires entre elles mais aussi avec les lignines et polysaccharides de la paroi, conférant une certaine rigidité pariétale (Held *et al.*, 2004 ; Battaglia *et al.*, 2007). L'expression et l'incorporation des PRPs dans la paroi peuvent être induites par des excès d'ERO produites lors des réponses à divers stress tels que des blessures, la sécheresse et des infections par des pathogènes (Battaglia *et al.*, 2007 ; Peng *et al.*, 2008).

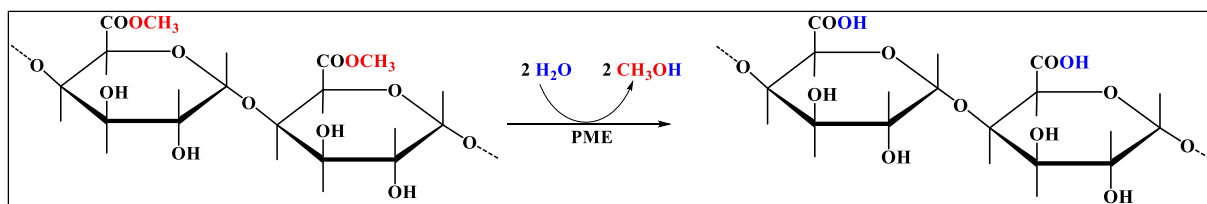
### 2.3.2. Les enzymes

De nombreuses enzymes sont aussi présentes dans la paroi et possèdent des fonctions diverses (Fry, 1995). Parmi quelques exemples non exhaustifs, les chitinases et les glucanases interviennent dans la défense des plantes face aux pathogènes tandis que les peroxydases, les phosphatases, les déshydrogénases, les endoglucanases, les xylosidases et les pectinases favorisent l'expansion cellulaire en modifiant les polysaccharides pariétaux (Fry, 1995 ; Passardi *et al.*, 2005).

◆ Concernant les **peroxydases**, ce sont des protéines à hème (protoporphyrine IX associée à un ion  $Fe^{3+}$ ) et plus précisément des oxydoréductases qui catalysent la réduction d' $H_2O_2$  et l'oxydation concomitante de divers donneurs d'hydrogène tels que des composés phénoliques (Carpin *et al.*, 2001). Les peroxydases végétales sont des peroxydases de classe III constituées de 300 à 330 acides aminés et qui présentent une grande variabilité dans leur séquence (Delannoy *et al.*, 2004). Au niveau cellulaire, elles sont majoritairement présentes dans les parois sous plusieurs isoformes (Blee *et al.*, 2001 ; Takabe *et al.*, 2001). On distingue trois groupes de peroxydases pariétales : les peroxydases libres dans l'apoplasme, les peroxydases associées à la paroi par des interactions ioniques et celles liées de façon covalente à la paroi.

Par exemple, il a été mis en évidence chez la courgette que certaines isoformes de peroxydases III se liaient aux HG des pectines fixant du  $\text{Ca}^{2+}$  par l'intermédiaire de plusieurs acides aminés cationiques comme la lysine ou l'arginine (Carpin *et al.*, 2001). Les peroxydases interviennent dans la réticulation ou le couplage de plusieurs molécules aromatiques par oxydation en utilisant l' $\text{H}_2\text{O}_2$  comme accepteur d'électrons. Cela conduit notamment à la formation de la lignine et aussi à la mise en place de liaisons covalentes entre des fragments ou des flavonoïdes associés aux pectines ou aux hémicelluloses (Fry, 1986 ; Ros Barceló *et al.*, 1998). Il a été rapporté chez de nombreuses plantes une augmentation de l'activité des peroxydases en relation avec la lignification et donc la rigidification de la paroi (Cosgrove, 1997). Bien que l'apoplasme semble être un des lieux privilégiés de leur action, des peroxydases ont été identifiées dans la vacuole et les mitochondries (Andrews *et al.*, 2002 ; Sukalovic et Vuletic, 2003).

◆ En dernier exemple, les **pectine-méthylestérases** (PME) sont des enzymes omniprésentes dans la paroi cellulaire des plantes et sont impliquées dans les processus de développement importants, y compris l'adhésion cellulaire et l'élongation de la tige (Micheli, 2001). Ce sont des enzymes codées par une famille multigénique dont de nombreuses isoformes ont été détectées dans la paroi (Richard *et al.*, 1996 ; Sénéchal *et al.*, 2014). Ces enzymes pariétales catalysent la déméthylestérification des monomères d'acide galacturonique méthylestérifié, libérant ainsi du méthanol et des protons (figure 32). Elles sont ainsi impliquées dans l'acidification des pectines et leur activité modifie également le pH de la paroi. Ce sont des enzymes de taille moyenne (masse molaire comprise entre 25 et 54 kDa) souvent associées à la paroi végétale par des interactions ioniques et sont ainsi extraites grâce à une forte force ionique ou une augmentation du pH vers des pH alcalins (de Assis *et al.*, 2002). Le pH pourrait être impliqué dans la régulation de l'activité des PME en activant ou inhibant les différentes isoformes (Bordenave, 1996). Le pH optimal est de neutre à alcalin pour la plupart des PME végétale ; ainsi, une PME végétale alcaline doit être faiblement active à pH acide à cause des fortes interactions entre l'enzyme chargée positivement et les carboxyles libres issus de la réaction de déméthylestérification. A l'inverse, à pH basique, la PME alcaline doit être libérée du substrat (pectines) grâce aux répulsions entre les groupements carboxyle libres et l'enzyme chargée négativement (Videcoq, 2011).

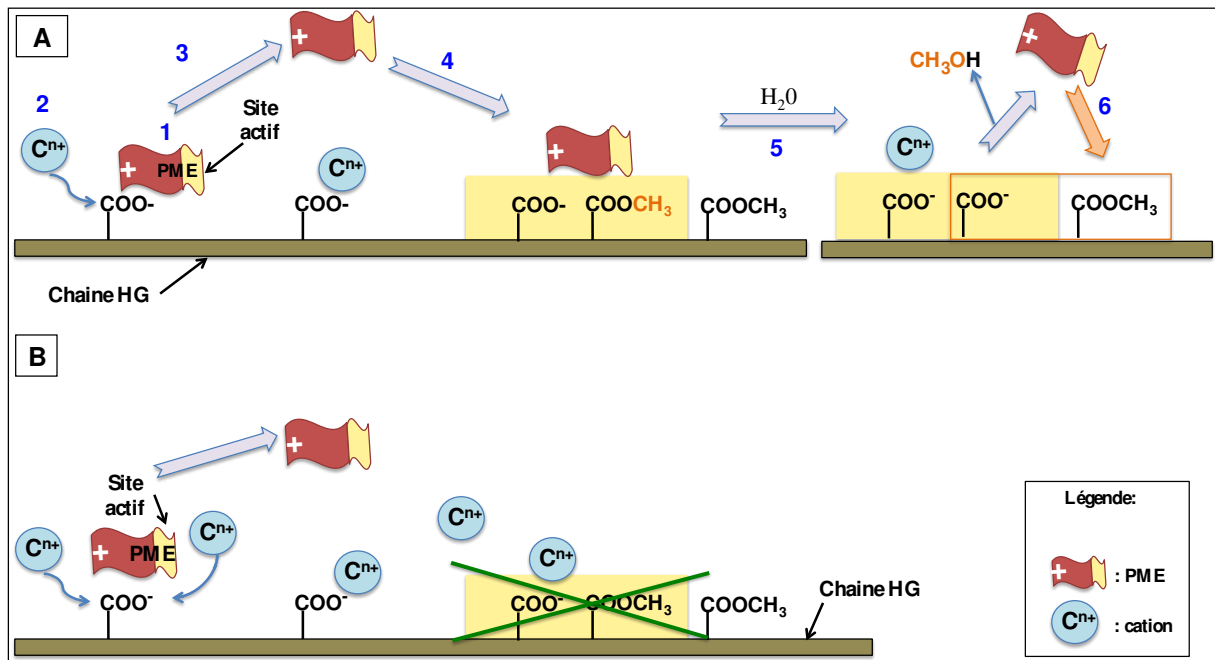


**Figure 32.** Déméthylestérification des pectines par la pectine méthylestérase (PME) (d'après Micheli, 2001).

Le mode d'action des PME végétales est plutôt de type « chaîne simple - attaques multiples » dans lequel la PME retire tous les esters de groupements méthyle contigus d'une seule chaîne de pectines, puis se dissocie du substrat. Ce mécanisme génère de longues séquences d'acide galacturonique déméthylestérifiées conduisant à une répartition en blocs sur une grande partie de la chaîne pectique (Catoire *et al.*, 1998 ; Ralet et Thibault, 2002). Ainsi, le mode d'action de la PME sur les pectines peut produire deux effets opposés. D'une part, elle contribue à la rigidification de la paroi cellulaire en produisant des blocs de fonctions acide carboxylique non estérifiées qui peuvent interagir avec les ions calcium et former un gel. A l'inverse, la libération de protons peut stimuler l'activité de pectinases de la paroi cellulaire contribuant au relâchement de celle-ci (Nari *et al.*, 1986 ; Moustacas *et al.*, 1991 ; van Alebeek *et al.*, 2003). Leur site actif serait constitué par deux résidus d'acide aspartique, deux de glutamine et un d'arginine ainsi que plusieurs résidus aromatiques (tyrosine, phénylalanine et tryptophane), ces derniers étant caractéristiques des sites de liaisons aux pectines (Johansson *et al.*, 2002).

Par ailleurs, la répartition des unités carboxyle le long du squelette de la pectine et donc le DME, sont importants dans le contrôle de l'activité des PME. Des fonctions acide carboxylique libres dans le voisinage de la liaison ester augmentent l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Ainsi, leur action serait plus rapide sur les liaisons ester adjacentes aux carboxyles libres (Goldberg *et al.*, 2001). Le DME initial peut influencer les paramètres catalytiques de la PME selon son origine. Par exemple, pour la PME4 de l'orange, l'affinité augmente lorsque le DME augmente (Christensen *et al.*, 1998). Aussi, les différentes isoformes ont des optima de pH différents et leurs modes d'action dépendent du pH (Bordenave et Goldberg, 1994 ; Denès *et al.*, 2000). Certaines isoformes peuvent agir de façon aléatoire à pH acide mais par bloc à pH alcalin. Aussi, la thermostabilité des PME est très variable selon l'isoforme et leur activité optimale dépendra de la température. Par exemple chez l'orange, la PME 1 est plus active à 30°C tandis que la PME 3 présente une activité optimale à 4°C (Cameron *et al.*, 1998).

Pour la plupart des PME végétales, la présence de cations est indispensable à leur activité (PME « salt-dependent »). Selon leur concentration, les cations pourraient également modifier l'affinité des PME pour leur substrat (Micheli, 2001). En effet, l'activité de certaines isoformes de PME augmente avec la concentration en sel (figure 33A) jusqu'à une concentration limite au-delà de laquelle l'activité diminue (figure 33B). Cela peut s'expliquer de la façon suivante :



**Figure 33.** A/ Schéma représentatif du mécanisme d'action d'une PME « salt-dependent ». B/ Schéma représentatif du mécanisme d'inhibition de l'activité d'une PME « salt-dependent » lors d'un excès de cations.

La figure 33A décrit le mécanisme d'action d'une PME « salt-dependent » de la façon suivante :

1- Les groupements carboxyle peuvent piéger des enzymes, empêchant ainsi leur site actif de réagir avec leurs substrats ester de méthyle.

2- Les ions métalliques ( $C^{n+}$ ) peuvent soulager cette inhibition par liaison à des groupes carboxyle de la pectine. Les cations entreraient en compétition avec les enzymes chargées positivement pour l'interaction avec les groupements carboxyle libres de la pectine.

3- Ce phénomène décroche la PME et ferait passer ainsi la PME d'une forme inactive à une forme libre active.

4- La répartition des unités carboxyle le long du squelette pectique est importante dans le contrôle de l'activité des PME. Des fonctions acide carboxylique libres situés à proximité de la liaison ester sont nécessaires pour augmenter l'affinité de l'enzyme pour son substrat (rectangle jaune) (Goldberg *et al.*, 2001).

5- Une fois cette zone reconnue, la PME va y exercer son activité de déméthylestérification en présence d'eau et ainsi entraîner la libération de méthanol. L'augmentation de l'activité de la PME en présence de cations peut donc s'expliquer par une augmentation de sa constante de dissociation avec le produit de la réaction, c'est-à-dire avec l'acide galacturonique (Moustacas *et al.*, 1991).

6- La PME retire tous les esters de groupements méthyle contigus d'une seule chaîne de pectines puis se dissocie du substrat.

La figure 33B décrit l'inhibition provoquée par les fortes concentrations en cations qui peut s'expliquer par le fait que celles-ci sont susceptibles de masquer les groupements carboxyle libres alors que la présence de ces derniers à proximité des groupements estérifiés est nécessaire pour l'action de la PME.

L'effet des cations sur les PME végétales dépend aussi de la nature des cations. La PME d'Acerola subit une baisse d'activité en présence de  $Mg^{2+}$  tandis que les cations  $Na^+$ , de  $K^+$  ou de  $Ca^{2+}$  augmentent son activité (de Assis *et al.*, 2002). Toutefois, pour certaines PME, la présence de cations influencerait leur activité, mais ne serait pas indispensable (« salt-independent ») (Videcoq, 2011).

Ainsi, selon les isoformes, l'activité des PME peut être régulée par la température, le pH, le DME initial des HG et les cations.

## 2.4. Autres composés pariétaux

De manière plus minoritaire, la paroi contient divers composés organiques comme les tannins, les terpènes, les cires, les acides gras ou les glucides circulants ainsi que des minéraux.

Les tanins sont des substances polyphénoliques d'origine végétale dont la masse moléculaire est comprise entre 500 et 3000 Da. Contrairement aux lignines, ces composés sont solubles et sont classés en deux catégories : les tanins hydrolysables (ou gallotanins) et les tanins condensés (ou tanins catéchiques) (Metche et Girardin, 1980). Les gallotanins sont considérés comme des polyesters de glucides avec un ou plusieurs acides phénoliques tandis que les tanins condensés sont des polymères composés d'unités flavonoïdes (par exemple de procyanidine chez le sapin de Douglas) constituées d'oligomères de catéchine et d'épicatéchine (Stafford et Lester, 1980 ; Kai, 1991).

Les terpènes sont des molécules organiques extrêmement volatiles et sont subdivisés en fonction du nombre d'unités isoprènes qui les constituent : les monoterpènes sont généralement des molécules olfactives comme le limonène, les di- et triterpènes sont des résines, les tétraterpènes sont des pigments comme les caroténoïdes (Vollhardt et Schore, 2004).

Les cires sont des esters de l'éthylène glycol et de deux acides gras ou un ester d'acide gras et d'alcool à longue chaîne (Lecomte, 2009). Les acides gras sont divisés en deux catégories : les acides gras saturés comme l'acide palmitique et les acides gras insaturés comme l'acide oléique.

Parmi les glucides circulants, on rencontre à la fois des monomères (D-glucose, D-mannose, D-galactose, D-fructose, L-arabinose, D-xylose, L-rhamnose et D-fucose), des dimères (saccharose) et des trimères tels que le raffinose.

Enfin, parmi les minéraux présents dans les parois, on trouve majoritairement du Ca, K et Mg. Les minéraux sont souvent présents sous forme de sels associés aux carbonates, silicates, phosphates ou encore aux oxalates.

### **3. Piégeage pariétal des ET**

#### **3.1. Niveau d'efficacité de piégeage**

Au niveau cellulaire, la paroi constitue la première barrière contre les agressions extérieures (Wang *et al.*, 2008). De nombreux travaux montrent une réelle capacité des parois à fixer des ET. Par exemple, des plants de ramie (*Boehmeria nivea*) exposés pendant 20 jours à des concentrations de Cd de 1 et 7 mg. L<sup>-1</sup> fixent environ 50 % du Cd au niveau de la paroi des cellules de racines, de tiges et de feuilles (Wang *et al.*, 2008). Une Lamiacée asiatique (*Elsholtzia splendens*) exposée pendant 16 jours à une concentration de 500 µM de Cu peut stocker dans les parois des cellules racinaires environ 60 % du Cu accumulé par la plante (Peng *et al.*, 2005). De même, une importante accumulation de Cd dans la paroi cellulaire des cellules racinaires a également été observée chez *Spartina alterniflora* et *Kandelia obovata* lorsqu'elles sont traitées à des concentrations croissantes en Cd (Pan *et al.*, 2012 ; Weng *et al.*, 2012). Il a également été rapporté une accumulation accrue de Cd dans la paroi cellulaire des cellules de la feuille *Alternanthera philoxeroides* (Xu *et al.*, 2012). Des travaux réalisés précédemment au laboratoire sur des cellules de tomate en suspension cellulaire ont montré que la proportion de Cd associé à la paroi augmentait avec la concentration en Cd du milieu (jusqu'à 60 % pour 0.5 mM de Cd dans le milieu) (Muschitz *et al.*, 2015).

#### **3.2. Les composés pariétaux fixant les ET**

Les pectines jouent un rôle important dans le piégeage des ET par la paroi. En effet, elles représentent à peu près 30 % de celle-ci (Ridley *et al.*, 2001 ; O'Neill et York, 2003) et ce sont des polymères chargés négativement et donc plus susceptibles de lier des cations (Krzeslowska, 2011; Meychik *et al.*, 2014). Il a été estimé que 70 à 90 % des ET piégés par la paroi primaire le sont par des composés pectiques (Haynes, 1980 ; Macfie et Welbourn, 2000). Cette efficacité de fixation est due à la capacité d'échange de cations métalliques pouvant se substituer aux ions Ca<sup>2+</sup> au sein des réseaux en « boîte à œufs » des HG (Krzeslowska, 2011). Dans la paroi secondaire, la présence de lignines peut également être impliquée dans l'adsorption des ET de par leur richesse en groupements hydroxyle (Lalvani *et al.*, 1997 ; Lee et Rowell, 2004). Par ailleurs, les protéines structurales pariétales de la plante contiennent des groupements hydroxyle, carboxyle, amino- qui peuvent aussi potentiellement se lier à des ions métalliques lorsque la plante est exposée à des teneurs en ET élevées (Meychik et Yermakov, 2001). Cette liaison permet de limiter le transport d'ET à travers la membrane plasmique ce



qui contribue à maintenir des conditions compatibles avec des activités physiologiques dans les cellules végétales. La paroi présente ainsi des caractéristiques chimiques intéressantes qui en font un très bon biosorbant d'ET (Mullen *et al.*, 1992 ; Parrota *et al.*, 2015).

Un paramètre important et largement controversé est celui de l'affinité des différents cations pour les composants pariétaux. Par exemple, l'affinité de cations pour les sites de liaison dans les parois cellulaires des racines diminue dans l'ordre suivant  $H^+ > Cu^{2+} > Ca^{2+} > Zn^{2+}$  selon Nishizono *et al.* (1987) mais dans l'ordre suivant  $H^+ > Cu^{2+} > Zn^{2+} > Ca^{2+}$  selon Ernst *et al.* (1992). Une autre étude a proposé l'ordre suivant  $Fe^{3+} > Al^{3+} > Cu^{2+}$  et  $Mn^{2+} > Zn^{2+}$  en comparant l'affinité de plusieurs ET sur des fragments pectiques (obtenus par des hydrolyses enzymatiques) (Franco *et al.*, 2002). Cependant Cumming et Taylor (1991) ont affirmé que les ions métalliques tels que  $Zn^{2+}$  et  $Mn^{2+}$ , ayant une forte affinité pour les fonctions acide carboxylique, seraient préférentiellement liés aux pectines par rapport à d'autres ET.

### **3.3. Modifications quantitatives de la paroi en réponse aux ET**

La paroi peut séquestrer les ET mais sa biosynthèse et sa composition peuvent en être modifiées pour améliorer l'efficacité du piégeage (Parrota *et al.*, 2015). Ainsi une augmentation de la biomasse pariétale globale ou de certains composés de la paroi peut permettre d'augmenter les possibilités d'adsorption des ET. L'épaississement de la paroi en réponse au stress métallique a par exemple été mis en évidence dans des cultures cellulaires de tomates exposées au Zn et au Cd (Muschitz *et al.*, 2009 et 2015). Les auteurs ont observé une augmentation de la biomasse pariétale totale ainsi qu'une augmentation de la quantité de Zn retenu par les polymères pariétaux. L'épaississement pariétal permettrait donc de piéger davantage d'ET et de limiter l'entrée de ces éléments à l'intérieur des cellules (Douchiche *et al.*, 2007 ; Krzeslowska, 2011 ; Sun *et al.*, 2013 ; Fernández *et al.*, 2014).

Les parois des cellules soumises à un stress biotique ou abiotique peuvent aussi être renforcées non pas de manière globale mais par certaines catégories de composés pariétaux comme la cellulose, les hémicelluloses, les pectines, les lignines, des protéines... (Turner et Marshall, 1972 ; Bradley *et al.*, 1992 ; Lesniewska *et al.*, 2004 ; Passardi *et al.*, 2004). Il a été montré par exemple que la présence d'Al induisait l'augmentation de la quantité d'hémicelluloses dans les racines de courge ou de blé (Van *et al.*, 1994 ; Tabuchi et Matsumoto,

2001). Une autre étude a montré que le Cu pouvait augmenter la production de lignines en stimulant l'activité d'enzymes (laccases, peroxydases) qui participent à la polymérisation des précurseurs de monolignols des lignines (Claus, 2004). Dans le cas du blé, une augmentation de la quantité en pectines et composés phénoliques a également été observée (Hossain *et al.*, 2006). Chez le sapin de Douglas exposé au Cd, une augmentation des pectines a été mise en évidence, plus particulièrement des PFME (Astier *et al.*, 2014). Dans le cas du silène (*Silena paradoxa*) exposée au Cu, Colzi *et al.* (2012) ont constaté chez un écotype sensible une augmentation de la teneur en pectines, laquelle est considérée par les auteurs comme une stratégie permettant uniquement de retarder (mais pas de stopper) l'entrée du Cu à l'intérieur de la cellule. Par ailleurs, il a été montré que dans l'hypocotyle du lin, le Cd provoquait l'accumulation de PFME dans les cellules épidermiques et l'effondrement de la couche de cellules sous-épidermiques (Douchiche *et al.*, 2007). Ce déséquilibre affecte les parois primaires et peut provoquer un gonflement des tissus de l'hypocotyle. L'abondance relativement élevée de PFME nuirait alors à la structure des cellules végétales (Parrota *et al.*, 2015). Selon ces auteurs, l'adsorption du Cd à la paroi pourrait modifier la structure physique de celle-ci, changeant sensiblement sa résistance à la pression de turgescence et affaiblissant ainsi les cellules. L'autre aspect à ne pas négliger est l'aspect qualitatif, plus particulièrement au niveau des pectines. En effet, l'efficacité de piégeage des ET par ces polysaccharides peut être fonction non seulement de leur quantité mais aussi de leur degré de méthylestérification.

### **3.4. Modifications qualitatives de la paroi en réponse aux ET**

La régulation du DME des pectines joue un rôle important dans la tolérance aux ET. En effet, les PFME sont plus à même de pouvoir piéger les cations métalliques, lesquels peuvent remplacer les ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans les structures dites en « boîte à œufs ». Comme indiqué précédemment, parmi les enzymes pariétales, les PME peuvent contrôler le DME. Des travaux réalisés sur les hypocotyles de lin en présence de Cd ont montré une corrélation entre l'augmentation de l'activité de la PME et l'augmentation des PFME (Paynel *et al.*, 2009). Par ailleurs, une augmentation de l'activité et de l'expression de certains gènes codant pour des peroxydases a été rapportée chez des plantes exposées à des stress biotiques et abiotiques (Passardi *et al.*, 2005). Ainsi, en plus de modifier le DME des pectines *via* l'activité des PME, des ET comme le Cd réguleraient également l'activité des peroxydases, qui à leur tour, modifieraient la structure pariétale (Paynel *et al.*, 2009).

La diminution du DME des pectines en parallèle d'une stimulation des activités peroxydases III n'est pas toujours une stratégie intéressante dans le piégeage des ET. En effet, Paynel *et al.* (2009) ont observé une réorientation de la croissance de l'hypocotyle de lin ayant été exposé au Cd (c'est-à-dire une augmentation de l'expansion et une diminution de l'allongement) coïncidant avec des changements marqués dans la méthylestérfication et la réticulation des HG au sein de la paroi cellulaire. Ils ont ainsi suggéré que les PFME pourraient interagir plus fortement avec les peroxydases grâce à leur motif riche en arginines porteuses de charges positives. Ces enzymes ainsi liées aux PFME seraient alors à l'origine de pontages covalents avec des polymères pariétaux comme les lignines. Par exemple, chez la fougère *Lygodium japonicum* exposée au Cu, les HG sont fortement liés aux autres composés pariétaux, probablement à la suite de l'activation des peroxydases III (Konno *et al.*, 2005).

A l'opposé, certaines espèces soumises à un stress métallique favorisent plutôt la production de PHME, ce qui a pour conséquence de limiter le piégeage des ET. Cette réponse peut être considérée comme une stratégie d'exclusion des ET visant à atténuer leur phytotoxicité. Par exemple, chez une population métallophyte de *Silene paradoxa*, les résultats ont montré une augmentation du DME des pectines lorsque les plantes étaient soumises à une pollution en Cu ainsi qu'une concentration pariétale en Cu inférieure à la population sensible de *S. paradoxa* (Colzi *et al.*, 2012).

Les polyamines peuvent également limiter le piégeage pariétal des ET. En effet, elles interagiraient avec les charges négatives des acides polygalacturoniques des pectines abaissant ainsi leur potentiel d'adsorption des ET (Charnay *et al.*, 1992 ; Berta *et al.*, 1997 ; Minocha et Long, 2004). Une étude sur des racines de blé a montré qu'en présence d'Al, une augmentation de la production de Put entraînait une diminution de production de polysaccharides et limitait la déméthylestérfication des pectines, diminuant ainsi les capacités d'adsorption de l'Al sur celles-ci (Yu *et al.*, 2015).

Des travaux réalisés sur des suspensions cellulaires de tomates ont montré que la proportion de Cd associé à la paroi augmentait avec la concentration en Cd du milieu (jusqu'à 60 % pour 0.5 mM de Cd dans le milieu) alors que les PHME diminuaient et que les PFME restaient stables (Muschitz *et al.*, 2015). La diminution des PHME peut être expliquée par la diminution d'expression du gène QUA1 (galacturonosyl-transferase) observée par les auteurs. Dans cette étude, il a été montré que le DME des deux fractions pectiques augmentait,

probablement en réponse à la diminution d'activité PME observée. Les auteurs ont également mis en évidence que la proportion d'HG augmentait dans la fraction PFME (la plus importante quantitativement dans cette étude), ce qui laisse supposer que le nombre potentiel de sites d'adsorption du Cd était malgré tout suffisant pour retenir le Cd au sein de la paroi. De plus, il n'est pas exclu que d'autres composés pariétaux aient pu contribuer à l'adsorption du Cd, les auteurs ayant aussi constaté une augmentation de la biomasse pariétale.

Comme nous avons pu le voir dans ce second chapitre, les végétaux capables de croître dans des milieux contaminés développent plusieurs stratégies pour se protéger de la toxicité chimique engendrée par la présence des ET, qui sont très variables en fonction de la plante considérée. Ces stratégies peuvent être leur précipitation, leur exclusion, leur distribution restreinte dans les tissus sensibles, leur complexation par des molécules organiques, leur compartimentation intracellulaire (cloisonnement vacuolaire) et pariétale et la stimulation des voies antioxydantes pour lutter contre les ERO (Wang *et al.*, 2008 ; Demidchik, 2015).



## Troisième partie :

# Objectifs, présentation des ET et des modèles végétaux sélectionnés et démarche expérimentale

### I. Objectifs généraux

Le premier objectif est de déterminer si des espèces végétales implantées localement peuvent accumuler des quantités acceptables d'ET et être utilisées pour la phytoextraction. Les arbres présentant un potentiel plus intéressant en phytoextraction que les herbacées de par leur forte biomasse et leur système racinaire plus profond, nous avons donc choisi de travailler sur des essences répandues dans la région Limousin. Les modèles retenus sont 4 espèces de conifères : le Douglas, le mélèze hybride et ses deux parents, le mélèze d'Europe et le mélèze du Japon. En effet, il est intéressant de comparer leur potentiel de phytoextraction et de voir également si la « vigueur » hybride s'avère aussi être un choix judicieux pour l'étude des réponses aux ET. Jusqu'à présent, peu d'études sur la tolérance des conifères aux ET ont été effectuées et aucune espèce de conifère n'est considérée comme hyperaccumulatrice (Saladin, 2015). Les quelques données disponibles sur les réponses des conifères aux ET portent principalement sur les pins et le pin sylvestre (*Pinus sylvestris*) (Saarela *et al.*, 2005 ; Mingorance *et al.*, 2007 ; Ivanov *et al.*, 2011).

Le second objectif de ce travail est d'étudier les mécanismes d'accumulation d'ET par ces conifères locaux et notamment les processus physiologiques qui leur permettent de tolérer les ET absorbés. Nous nous sommes particulièrement intéressés au processus de compartimentation des ET au niveau intracellulaire (notamment à travers l'étude de molécules fixatrices d'ET) et extracellulaire à travers la caractérisation chimique de composés pariétaux d'un point de vue quantitatif et qualitatif.

Nous avons choisi de débiter ce travail par une approche fondamentale en conditions de culture contrôlées (culture *in vitro*) afin de cibler plus spécifiquement l'effet de l'ET choisi sur les plantes. L'autre avantage de cette approche est le gain de place pour les expérimentations et le gain de temps car l'ET est très phytodisponible dans un milieu de culture, ce qui permet d'évaluer plus rapidement les capacités maximales de tolérance des plantes.

L'étude s'est ensuite orientée dans un deuxième temps vers une approche en conditions semi-naturelles (en serre) afin de vérifier si les réponses observées *in vitro* sont, et dans quelle mesure, transposables à des modèles cultivés sur un substrat moins artificiel (substrat de type terreau / sable) et soumis à davantage de variations, notamment en ce qui concerne la luminosité, la température et la phytodisponibilité de l'ET dans le substrat. Dans cette partie, les conifères ont été étudiés sous forme de jeunes germinations âgées de quelques semaines et de jeunes arbres âgées de quelques années.

Enfin, la troisième partie de l'étude vise à se rapprocher d'une problématique plus proche de la réalité du terrain en abordant l'impact d'une pollution multi-métallique sur les plantes cultivées sous serre ; il est en effet peu fréquent de trouver des sites pollués par un seul ET. Ainsi, dans cette étude, la pollution n'est plus apportée artificiellement sur un substrat modèle (mélange terreau / sable) mais à travers des sols pollués par plusieurs ET prélevés sur d'anciens sites miniers de la région Limousin et du Massif Central.

## **II. Présentation des ET retenus pour l'étude**

La majeure partie de cette étude s'est focalisée sur le cadmium car cet ET non essentiel pour les végétaux n'est pas rare dans les sols français et européens et se révèle particulièrement toxique pour les plantes à faible dose.

### **1. Présentation du cadmium et de ses effets sur les plantes**

#### **1.1. Généralités**

Découvert en 1817 par le chimiste allemand Stohmeyer, le Cd est un métal de transition appartenant au groupe IIB du tableau périodique des éléments chimiques. Il est ductile et malléable, présente une bonne conductibilité électrique et sa résistance à la corrosion atmosphérique en fait un bon revêtement protecteur pour certains métaux (Juste *et al.*, 1995). Il est souvent présent à l'état divalent et possède des propriétés chimiques proches de celles du Zn et peut le remplacer isomorphiquement dans presque tous ses minerais. Il est couramment présent comme impureté dans le minerai de sulfure de zinc appelé sphalérite (ZnS) (Cotton et Wilkinson, 1972).

Le Cd reste de loin un des ET les plus étudiés car il est responsable d'une préoccupation majeure en raison de sa grande solubilité dans l'eau, sa toxicité vis-à-vis des organismes vivants et sa facilité à intégrer la chaîne alimentaire suite à son absorption par les plantes (Mortvedt,

1996 ; Daud *et al.*, 2008). Il représente un réel problème environnemental étant donné sa présence dans les eaux et l'air et dans certains végétaux de consommation courante comme le chou, l'épinard, la salade et (en quantité moindre) les céréales. Sa biodisponibilité est très supérieure à celle de Pb, As et Hg et il est très mobile dans les sols plus ou moins acides, lesquels représentent le cas le plus fréquent à l'échelle de la planète (Clemens, 2006 ; Lafuente, 2008). Ainsi sa forte mobilité le rend facilement biodisponible par les plantes et donc rapidement toxique. Les plantes tolérantes au Cd n'en accumulent pas en quantités remarquables et selon Baker et Brooks (1989), les espèces hyperaccumulatrices de Cd, pour être considérées comme telles, doivent en stocker au minimum 100 mg. kg<sup>-1</sup> MS dans les parties aériennes. Ce seuil est assez faible par rapport aux hyperaccumulatrices d'autres ET comme par exemple celles d'As ou de Cu qui en stockent 10 fois plus et celles de Fe ou de Mn dont le seuil minimal est 100 fois supérieur (Baker et Brooks, 1989 ; Ma *et al.*, 2001 ; Liang *et al.*, 2009).

La toxicité du Cd n'a attiré l'attention seulement qu'à partir des années 50 avec l'apparition de la maladie Itai-Itai au Japon, suite à son déversement dans les cours d'eau des montagnes par les industries minières. Le Cd s'est accumulé au fond des rivières et dans les eaux de surface qui ont ensuite été utilisées pour irriguer les rizières, conduisant ainsi à un empoisonnement massif de la population (Koji *et al.*, 1983).

## **1.2. Utilisations et principales sources d'émissions**

Environ 25 à 30 000 tonnes de Cd sont chaque année libérées dans l'environnement et comme pour tous les autres ET, les émissions liées aux activités anthropiques ont largement dépassé celles des sources naturelles (Clemens, 2006 ; Friis, 2012). La demande mondiale a augmenté au cours du siècle dernier, aggravant de façon continue sa diffusion dans l'environnement. Le Cd est utilisé dans divers alliages pour fabriquer des batteries Ni-Cd, des composants électroniques, des stabilisants du plastique, des pigments de peintures, des engrais, des pesticides ainsi que dans certaines réactions chimiques en métallurgie et dans le secteur de l'électroplastie (Johnson *et al.*, 2003; Nordberg *et al.*, 2007 ; Amouei *et al.*, 2013). Il n'existe pas de minerai de Cd en quantité exploitable mais on peut trouver cet ET à des concentrations relativement élevées dans les minerais de Zn et Pb. Le Cd est donc obtenu comme sous-produit de la métallurgie lors du raffinage du Zn, du Pb et du Cu (Nordberg *et al.*, 2007). Par exemple, une tonne de Zn produite s'accompagne obligatoirement de la production de 3 à 4 kg de Cd



(Juste *et al.*, 1995). Le Cd est aussi récupéré lors du recyclage des accumulateurs Ni-Cd (Brignon et Malherbe, 2005).

Le Cd est rejeté par de nombreux secteurs d'activités et majoritairement par celui de l'industrie de la sidérurgie et de la métallurgie. Les déchets de ces industries finissent principalement dans l'eau et les sols. Ainsi, certaines terres agricoles ont été contaminées en Cd en raison de l'utilisation d'engrais phosphatés ou de boues d'épuration utilisées pour améliorer les qualités nutritives de ces sols (Amouei *et al.*, 2013). Par ailleurs, le Cd peut aussi être rejeté dans l'air par les émissions du secteur automobile et certaines usines comme celles d'incinération des ordures et de traitements industriels de métaux (Costa *et al.*, 1994).

### **1.3. Toxicité connue vis-à-vis des plantes**

Le Cd est reconnu comme l'un des ET les plus toxiques avec une phytotoxicité de 2 à 20 fois supérieure à celle des autres ET à concentrations égales (Jones *et al.*, 1993 ; Vassilev *et al.*, 1998 ; Clemens, 2006 ; Amouei *et al.*, 2013 ; Isaure *et al.*, 2015). Ce n'est pas un élément essentiel pour les végétaux : jusqu'à présent, une seule enzyme, l'anhydrase carbonique, l'utilise dans son centre réactionnel et cette enzyme est présente chez des diatomées marines (Lane et Morel, 2000 ; Gaur et Adholeya, 2004). Le Cd possède des caractéristiques similaires à certains éléments essentiels (notamment le Ca) et peut agir par « mimétisme », perturbant ainsi de nombreuses voies métaboliques (Chmielowska-Bak *et al.*, 2013). Il a longtemps été cru que la toxicité du Cd pouvait être attribuée, du moins en partie, à la perturbation du métabolisme des éléments essentiels, notamment le fer (Fe) (Clemens, 2006 ; Schützendübel et Polle, 2002 ; Siedlecka et Baszynski, 1993; Wu *et al.*, 2012). Un nombre important d'études a révélé qu'un stress au Cd entraînait une accumulation significative du Fe dans l'apoplaste racinaire (Fodor *et al.*, 2005 ; Yoshihara *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2000). Xu *et al.* (2015) ont fait le même constat chez *A. thaliana* et l'expliquent par l'observation d'une augmentation des teneurs en polysaccharides et la réduction du DME dans l'apoplaste racinaire, ayant pour conséquence d'augmenter la capacité de liaison du Fe à la paroi cellulaire, ce qui freine la translocation du Fe des racines aux parties aériennes.

On observe généralement un effet négatif du Cd sur la croissance et la production de biomasse des plantes (Sobkowiak et Deckert, 2003 ; Rodríguez-Serrano *et al.*, 2009; Farid *et*

*al.*, 2013). La réduction de croissance s'accompagne entre autres de changements anatomiques, structuraux et ultrastructuraux importants au niveau des feuilles et des racines (Baryla *et al.*, 2001 ; Sandalio *et al.*, 2001 ; Patel *et al.*, 2005 ; Cosio *et al.*, 2006). Au niveau racinaire, le Cd peut inhiber la division cellulaire et peut aussi entraîner une réduction de la synthèse des parois en perturbant le métabolisme de polysaccharides pariétaux au niveau des vésicules golgiennes (par une altération de l'assemblage de leur monosaccharides constitutifs *via* l'activité de diverses enzymes telles que les glycosyl-transférases) (Barceló et Poschenrieder, 1990 ; Punz et Sieghart, 1993 ; Le Gall *et al.*, 2015). Selon Zhu *et al.* (2012), la liaison du Cd à la paroi cellulaire affecte les propriétés de celle-ci en entravant le dépôt de polysaccharides nouvellement synthétisés ; cela entraîne un dépôt désordonné de pectines et d'hémicelluloses, réduisant ainsi l'élongation cellulaire. La réduction de croissance générée par le Cd serait aussi due à une perturbation de l'absorption de l'eau et des minéraux par les racines (Barceló et Poschenrieder, 1990 ; Costa *et al.*, 1994 ; Costa et Morel, 1994 ; Rubio *et al.*, 1994 ; Ouariti *et al.*, 1997 ; Vassilev *et al.*, 1998 ; Benavides *et al.*, 2005).

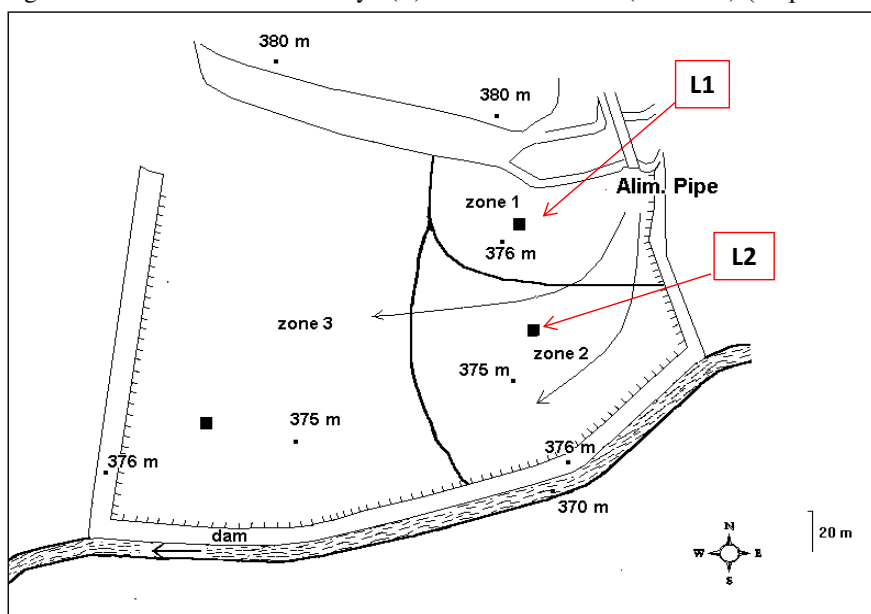
Comme indiqué dans le second chapitre, le Cd peut, au même titre que de nombreux ET, perturber l'activité de certaines enzymes clés impliquées dans les processus physiologiques essentiels comme la photosynthèse ou la respiration (Sandalio *et al.*, 2001 ; Farid *et al.*, 2013). De plus, le Cd est connu pour induire une surproduction d'ERO (notamment H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pouvant conduire à de nombreux dommages cellulaires, voire à la mort cellulaire (Sandalio *et al.*, 2001 ; Cho et Seo, 2005 ; Heyno *et al.*, 2008 ; Rodríguez-Serrano *et al.*, 2009).

## **2. Cas d'une pollution multi-métallique**

La pollution métallique des sols est souvent due à une contamination par plusieurs ET sauf dans le cas de déversements accidentels ou volontaires d'un polluant précis. Par exemple, sur le site de Metaleurop, il a été observé une très forte contamination des sols en Pb, Cd et Zn mais aussi, dans une moindre mesure, en Ag, As, Bi, Cu, Hg, In, Ni, Sb, Se, Sn et Tl (Douay, 2014). Les sols utilisés dans notre étude proviennent de deux anciens sites miniers et sont enrichis essentiellement (dans des concentrations différentes) en As, Pb et Sb (Courtin-Nomade *et al.*, 2002 ; Pascaud *et al.*, 2014 ; Wanat *et al.*, 2014). Le site de la petite Faye (L) se situe dans le département de la Creuse et correspond à une ancienne mine d'or fermée en 1964 et dont les stériles, déposés dans un bassin de décantation, représentent 35 000 t (figure 34). Selon

la recolonisation végétale et les conditions hydriques, trois zones ont été distinguées. Dans notre étude, nous avons travaillé à partir de sols provenant de la zone 1 (L1) et de la zone 2 (L2). Le second site est le site de Pontgibaud (P) qui est une ancienne mine de Pb et d'Ag située dans le Massif Central et abandonnée depuis les années 1900. De 1860 à 1900, la mine a produit environ 64 100 m<sup>3</sup> de déchets miniers (figure 35).

**Figure 34.** Configuration du site de la Petite Faye (L) divisé en 2 zones (L1 et L2) (d'après Courtin-Nomade *et*



*al.*, 2002 et Wanat *et al.*, 2014).

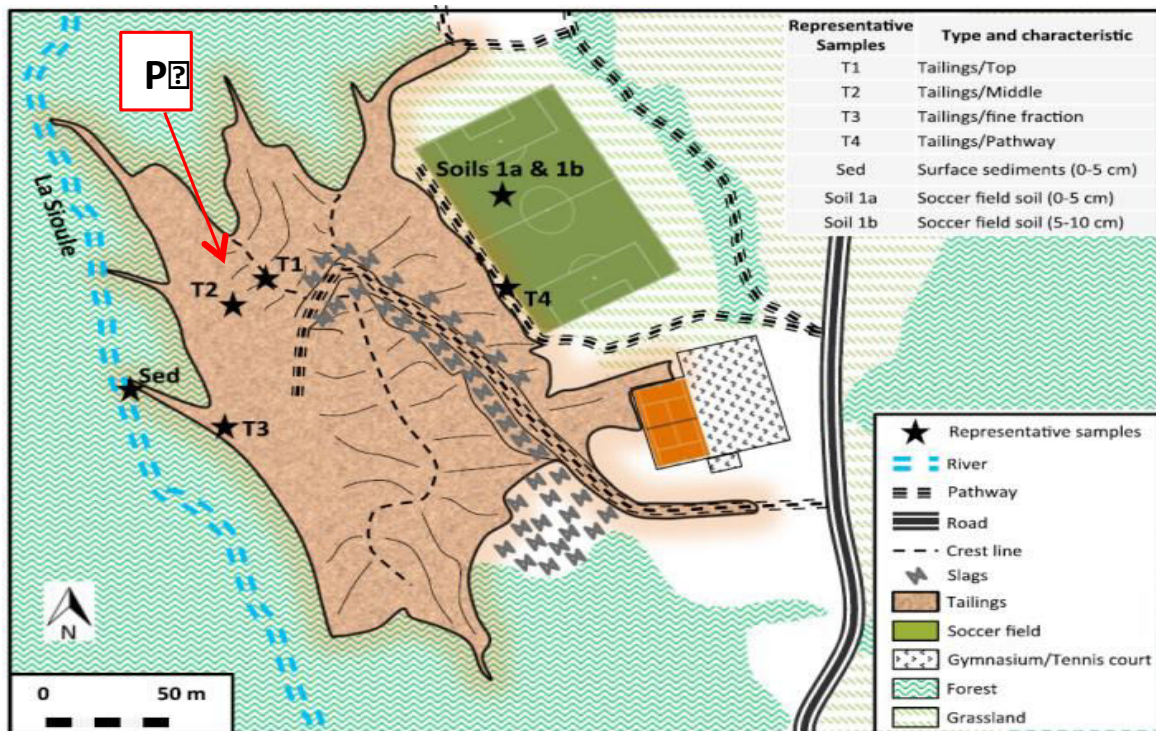


Figure 35. Configuration du site de Pontgibaud (P) (d'après Pascaud *et al.*, 2014).

Les pollutions à l'As sont essentiellement dues aux activités minières, à la combustion de charbon, aux fonderies de Cu ainsi qu'à l'utilisation de fertilisants et d'herbicides (Amaral *et al.*, 2013). L'arsenate (AsV) est la forme principale de l'As dans les sols aérobie alors que l'arsenite (AsIII) est davantage présent dans les sols riches en eau (Zaho *et al.*, 2009). L'AsV est absorbé par les racines *via* des transporteurs de phosphate alors que l'AsIII pénétrerait plutôt dans les racines *via* des aquaporines. Chez beaucoup d'espèces, l'As a tendance à s'accumuler dans les racines, probablement à cause de la compétition avec le phosphate au niveau des différents transporteurs (Smith *et al.*, 2008). Dans la plante, l'AsV peut être transformé en AsIII par des agents réducteurs comme l'ascorbate et le glutathion ou par l'As-réductase (Amaral *et al.*, 2013). Il a été proposé qu'un des moyens de défense des plantes contre l'AsIII serait une chélation avec des thiols, notamment des phytochélatines (PCs) suivie d'un transfert et d'un stockage au niveau vacuolaire (Berqvist et Greger, 2012). Il existe peu d'hyperaccumulatrices d'As et jusqu'à présent, les principales espèces étudiées sont des fougères comme *Pteris vittata* (Wang *et al.*, 2002).

Le Sb est également une cause de pollution des sols. Il est libéré par des activités humaines telles que les activités minières, la combustion d'énergie fossile, la production de

batteries en Pb et il entre aussi dans la composition de semi-conducteurs et de munitions (Tschan *et al.*, 2009 ; Feng *et al.*, 2013). Cet ET est considéré comme peu mobile dans le sol, ce qui limite son absorption par les plantes. Tout comme l'As dont il est proche chimiquement, Sb est principalement rencontré sous les formes SbIII et SbV, la forme SbIII étant la plus toxique et étant probablement absorbée comme AsIII *via* des aquaporines (Tschan *et al.*, 2009). Le mécanisme d'absorption de SbV est encore mal connu car il ne semblerait pas que SbV emprunte les transporteurs de phosphate comme le fait AsV. Comme les hyperaccumulatrices d'As, les rares espèces accumulatrices de Sb (qui sont aussi des fougères) semblent stocker cet ET plutôt au niveau cytosolique mais les mécanismes ne sont pas encore clairement élucidés (Feng *et al.*, 2009). Il semblerait toutefois qu'une forte capacité de piégeage des ERO puisse être une des stratégies de tolérance de certaines espèces (Feng *et al.*, 2009).

Les pollutions au Pb sont liées à diverses industries dont les activités minières, la sidérurgie, la production de batteries, de fertilisants, de pesticides ou encore l'utilisation comme additif dans les pigments et les carburants (Flora *et al.*, 2012). Le Pb est peu soluble dans l'eau mais son absorption par les racines peut se faire par voie apoplastique ou par des canaux calciques (Tangahu *et al.*, 2011 ; Kumar *et al.*, 2014). Plusieurs travaux reportés par Kumar *et al.* (2014) indiquent que Pb est généralement plutôt accumulé au niveau racinaire et peut être piégé par les plantes au niveau pariétal par les pectines, précipité sous forme de sels dans l'espace intercellulaire ou être complexé au niveau intracellulaire par des PCs, du glutathion ou des acides aminés. De plus, il a été montré que des plantes sont capables de tolérer une forte pollution au Pb en stimulant l'activité d'enzymes anti-oxydantes comme l'ascorbate peroxydase, la catalase ou la SOD (Malar *et al.*, 2014).

### **III. Intérêt des espèces ligneuses pour la phytoaccumulation**

#### **1. Les arbres hyperaccumulateurs d'ET**

Les arbres sont de plus en plus considérés comme des modèles d'intérêt pour la phytoextraction des ET en raison d'une production de biomasse plus élevée et d'un système racinaire pouvant décontaminer les sites plus en profondeur que des herbacées (Pulford et Watson, 2003 ; Gullner *et al.*, 2001 ; Pilon-Smits et Pilon, 2002 ; Mench *et al.*, 2009; Vangronsveld *et al.*, 2009). Par exemple, Fischerova *et al.* (2006) ont montré que chez *Arabidopsis halleri*, la teneur en Cd était plus élevée (80 mg Cd. kg<sup>-1</sup> MS dans la biomasse

aérienne) que chez *Populus trichocarpa* (30 mg Cd. kg.<sup>-1</sup> MS) et *Salix caprea* (20 mg Cd. kg.<sup>-1</sup> MS). Néanmoins, ils ont obtenu un meilleur facteur annuel d'accumulation dans la biomasse aérienne pour les arbres par rapport aux espèces herbacées. En effet, l'efficacité de la plupart des hyperaccumulatrices herbacées est souvent limitée par leur faible biomasse (Tong *et al.*, 2004 ; Ali *et al.*, 2013). De plus, ce sont généralement des herbacées annuelles, ce qui nécessite des plantations et des récoltes très régulières qui peuvent augmenter le coût du procédé de phytoextraction (Pulford et Watson, 2003).

Bien que les arbres ne soient pas spécialement sélectionnés pour leur tolérance aux ET, ils peuvent néanmoins survivre sur un sol contaminé malgré une possible réduction de croissance (Dickinson *et al.*, 1992). C'est pourquoi, bien que les plantes herbacées gardent encore une place prépondérante dans les approches de phytoextraction, de nombreux chercheurs s'intéressent à l'efficacité potentielle des arbres pour ce procédé de décontamination des sols. D'ailleurs, une comparaison entre des espèces d'arbres et d'herbacées hyperaccumulatrices montre que les concentrations en ET dans les organes aériens y sont assez semblables sauf pour le Cd qui est toujours moins concentré dans les arbres que dans les herbacées (tableau 13) (Jagtap *et al.*, 2016).

**Tableau 13.** Comparaison de la concentration en ET dans les organes aériens d'arbres et d'herbacées hyperaccumulant des ET (d'après Jagtap *et al.*, 2016).

ET / seuil	Espèces ligneuses	Espèces herbacées
Al / 1	<i>Symplocos cochinchinensis</i> : 72 g (organes aériens ou feuilles ; non précisé) (Jansen <i>et al.</i> , 2002)	<i>Plantago almogravensis</i> : 3 g (Serrano <i>et al.</i> , 2011).
Cd / 0.1	<i>Populus cathayana</i> : 0.135 g dans les feuilles (He <i>et al.</i> , 2013)	<i>Noccaea caerulescens</i> : 10 g (Milner et Kochian, 2008).
Hg / 0.001	<i>Sesbania drummondii</i> : 1 g (Israr <i>et al.</i> , 2006)	<i>Pteris vittata</i> : 1.5 g (Su <i>et al.</i> , 2008)
Mn / 10	<i>Schima superba</i> : 62 g dans les feuilles et 30 g dans les tiges (Yang <i>et al.</i> , 2008)	<i>Phytolacca acinosa</i> : 19 g dans les feuilles (Xue <i>et al.</i> , 2004).
Ni / 1	<i>Sebertia acuminata</i> : 31 g. Jusqu'à 37 kg dans un arbre adulte (Sagner <i>et al.</i> , 1998)	<i>Noccaea cyprica</i> : 52 g (Prasad, 2005).
Pb / 1	<i>Sesbania drummondii</i> : 5 g (Sahi <i>et al.</i> , 2002)	<i>Thlaspi rotundifolium</i> : 8.5 g (Sahi <i>et al.</i> , 2002)

Les concentrations dans les plantes et le seuil pour chaque ET sont exprimées en g. kg<sup>-1</sup> MS. Le nom de l'organe a été mentionné lorsque la mesure n'a pas été effectuée sur l'ensemble des parties aériennes.

Néanmoins, seulement 20 % des espèces hyperaccumulatrices sont des espèces ligneuses (soit entre 130 à 140 espèces) (tableau 14) (Saladin, 2015). Elles sont principalement localisées dans les zones tropicales ce qui rend leur utilisation pour l'extraction des ET dans des climats tempérés ou froids peu ou pas optimale. De plus, presque 75 % des espèces ligneuses hyperaccumulatrices sont des hyperaccumulatrices de Ni ce qui limite le choix pour l'extraction d'autres ET.

**Tableau 14.** Espèces ligneuses hyperaccumulatrices d'au moins un ET (d'après Saladin, 2015).

ET	Nombre d'espèces	Familles et espèces	Références
Ni	≈ 100	Fabaceae ( <i>Cassia siamea</i> ), Sapotaceae ( <i>Pycnanandra acuminata</i> ), Violaceae ( <i>Hybanthus floribundus subsp. floribundus</i> , <i>Rinorea niccolifera</i> ).  Environ 30 familles originaires de Cuba ont été recensées (Reeves <i>et al.</i> 1999) parmi lesquelles : Acanthaceae, Clusiaceae, Myrtaceae, Oleaceae, Rubiaceae et Tiliaceae.  Plus de 60 familles originaires de Nouvelle - Calédonie ont été recensées (Jaffré <i>et al.</i> , 2013) parmi lesquelles : Argophyllaceae, Capparaceae, Celastraceae, Cunioniaceae, Euphorbiaceae, Myrtaceae, Oncotheaceae, Phyllantaceae, Rubiaceae, Salicaceae, Sapotaceae et Violaceae.	Jaffré <i>et al.</i> , 1976 ; Reeves <i>et al.</i> , 1999 ; Callahan <i>et al.</i> , 2008 ; Jambhulkar et Juwarkar, 2009 ; Fernando <i>et al.</i> , 2014 ; Jaffré <i>et al.</i> , 2013
Al	10	Theaceae ( <i>Stewartia monadelpha</i> , <i>S. pseudocamellia</i> , <i>Camellia sinensis</i> , <i>C. sasanqua</i> , <i>C. japonica</i> , <i>Cleyera japonica</i> , <i>Eurya japonica</i> ), Vochysiaceae ( <i>Qualea grandiflora</i> , <i>Callisthene major</i> , <i>Vochysia pyramidalis</i> ).	De Andrade <i>et al.</i> , 2011 ; Osawa <i>et al.</i> , 2013.
Mn	9	Araliaceae ( <i>Chengiopanax sciadophylloides</i> ), Celastraceae ( <i>Maytenus cunninghamii</i> ), Myrtaceae ( <i>Gossia bamagensis</i> , <i>G. bidwillii</i> , <i>G. fragrantissima</i> , <i>G. sankowsiorum</i> , <i>G. gonoclada</i> ), Phytolaccaceae ( <i>Phytolacca acinosa</i> ), Proteaceae ( <i>Grevillea exul var. exul</i> ), Theaceae ( <i>Schima superba</i> ).	Fernando <i>et al.</i> , 2006 ; Rabier <i>et al.</i> , 2007 ; Mizuno <i>et al.</i> , 2008 ; Yang <i>et al.</i> , 2008 ; Xue <i>et al.</i> , 2010.
Cd	7	Aquifoliaceae ( <i>Ilex polyneura</i> ), Araliaceae ( <i>Evodiopanax innovans</i> ), Ericaceae ( <i>Rhododendron annae</i> ), Oxalidaceae ( <i>Carambola averrhoa</i> ), Salicaceae ( <i>Salix cathayana</i> , <i>S. dasyclados</i> , <i>Populus x canescens</i> ).	Zu <i>et al.</i> , 2004 ; Takenaka <i>et al.</i> , 2009 ; Li <i>et al.</i> , 2011 ; Dai <i>et al.</i> , 2013 ; Fischerová <i>et al.</i> , 2006.
Zn	3	Ericaceae ( <i>Rhododendron annae</i> ), Fabaceae ( <i>Cassia siamea</i> ), Salicaceae ( <i>Salix dasyclados</i> ).	Fischerová <i>et al.</i> , 2006 ; Jambhulkar et Juwarkar, 2009 ; Zu <i>et al.</i> , 2004.
Pb	3	Aquifoliaceae ( <i>Ilex polyneura</i> ), Ericaceae ( <i>Rhododendron annae</i> ), Fabaceae ( <i>Sesbania drummondii</i> ).	Zu <i>et al.</i> , 2004 ; Sahi <i>et al.</i> , 2002 ; Venkatachalam <i>et al.</i> , 2009.
Fe	1	Fabaceae ( <i>Cassia siamea</i> ).	Jambhulkar et Juwarkar, 2009.
Hg	1	Fabaceae ( <i>Sesbania drummondii</i> ).	Sahi <i>et al.</i> , 2002 ; Venkatachalam <i>et al.</i> , 2009.

En zone tempérée, la phytoextraction par des arbres s'effectue principalement avec des Angiospermes, en particulier avec des arbres à croissance rapide tels que les peupliers ou les saules (Robinson *et al.*, 2000 ; Pilipović *et al.*, 2005 ; Lewandowski *et al.*, 2006 ; Di Lonardo *et al.*, 2011 ; Zacchini *et al.*, 2011). Ces arbres sont utilisés en taillis à courte rotation qui correspond à de jeunes arbres (1 à 3 ans) plantés sur site et récoltés au bout de 2 à 5 ans (Caslin *et al.*, 2010). Les rendements annuels de certains saules et peupliers peuvent ainsi atteindre 20 à 30 tonnes de MS par hectare (Tubby et Armstrong, 2002 ; Guidi *et al.*, 2013). Concernant le Cd, quelques espèces de saule et un peuplier hybride sont classées comme hyperaccumulatrices (tableau 14). Cependant, d'autres espèces non hyperaccumulatrices sont utilisables pour la phytoextraction, notamment parmi les saules (Yang *et al.*, 2015).

## **2. Les conifères : des candidats intéressants pour la phytoextraction ?**

Bien que les conifères ne soient pas adaptés à de nombreux types de sols comme les peupliers et les saules, ils sont très répandus en Limousin et plusieurs espèces présentent un taux de croissance assez rapide. De plus, ces conifères sont moins sensibles aux basses températures et fluctuations gel - dégel (Carnicer *et al.*, 2013). Ainsi, les conifères apparaissent comme des modèles d'intérêt potentiels pour les pollutions situées dans les régions froides (Saladin, 2015). En effet, de nombreux sols de la zone boréale ont été soumis pendant des décennies à une pollution atmosphérique entraînant des quantités non négligeables d'Al et de Fe dans les sols ainsi qu'à une accumulation d'autres ET dans les sols tels que le Pb (Bindler *et al.*, 1999; Kiikkilä, 2003 ; Steinnes et Friedland, 2006). Il a par exemple été montré une augmentation régulière de la pollution en ET (Cd, Cr, Cu, Ni et Pb) dans les anneaux de *Larix decidua* des Alpes italiennes occidentales depuis 1930 (Orlandi *et al.*, 2002).

Par ailleurs, des espèces de conifères existent également dans les climats chauds et peuvent présenter une bonne tolérance aux ET. Par exemple, deux espèces méditerranéennes, *Pinus pinea* et *Nerium oleander*, poussant dans une zone industrielle espagnole ont été comparées et, à l'exception du Cu, les auteurs ont montré que le pin parasol stockait plus d'ET que le laurier rose dans les organes aériens (Mingorance *et al.*, 2007). De même, au Portugal, deux espèces de chêne (*Quercus sp.*) et le pin maritime (*Pinus pinaster*) poussant sur des anciens sites miniers fortement contaminés en As, Sb et W ont été comparés (Pratas *et al.*, 2005). Les résultats de cette étude ont montré une forte accumulation d'As dans les aiguilles du



pin par rapport aux feuilles des chênes avec 30 à 60 fois plus d'As dans les jeunes aiguilles et 100 à 200 fois plus dans les vieilles aiguilles du pin par rapport aux feuilles de chênes.

Ainsi, dans les climats particuliers, les espèces de conifères locaux peuvent être intéressantes pour la phytoextraction. L'efficacité de la phytoextraction dépendant de la production annuelle de biomasse, le rendement dépend aussi de la densité de plantation. Si la phytoextraction avec des arbres est à taillis à courte rotation, la densité peut être plus élevée que dans les plantations réalisées pour la production de bois car la durée de la culture est beaucoup plus courte, de l'ordre de 2 à 5 ans (Jagtap *et al.*, 2016). Un autre élément à prendre en compte dans le choix des espèces concerne les hybrides. En effet, l'hybridation a généralement pour objectif d'obtenir des arbres soit plus productifs, soit plus résistants à différentes contraintes de l'environnement. Bien que rarement sélectionnés pour une tolérance particulière à un ou plusieurs ET, la vigueur des hybrides pourrait être un avantage si on considère que l'efficacité de la phytoextraction passe par une forte production de biomasse pour stocker davantage d'ET.

### **3. Effets des ET sur les conifères**

Peu d'études sont disponibles sur l'effet des ET sur les conifères. La majorité d'entre-elles sont réalisées dans des conditions de laboratoire : sur des cultures *in vitro*, des germinations ou des jeunes arbres cultivés en serre (sur substrat horticole, sols contaminés prélevés sur des sites, ou en condition hydroponique) (Saladin, 2015).

#### **3.1. Effets sur la croissance et le développement**

Comme pour les autres végétaux, il est souvent observé une réduction de croissance des conifères lorsque les teneurs en ET sont importantes (Hara et Sonoda, 1979 ; Breckle et Kahle, 1992 ; Sobkowiak et Deckert, 2003 ; Finnegan *et al.*, 2012 ; Farid *et al.*, 2013). Les organes qui se trouvent en contact direct avec l'ET sont ceux qui présentent le plus rapidement des changements morphologiques détectables (Baker et Walker, 1989). Ainsi, les racines sont généralement les premiers organes touchés (Ernst *et al.*, 1992 ; Meharg, 1994 ; Sharma et Dubey, 2005 ; Sun *et al.*, 2010). Par exemple, des graines de *Pinus sylvestris* exposées au Zn (150  $\mu$ M pendant 6 semaines) présentent une réduction de germination suivie d'une faible biomasse pour les plantules qui ont germé, notamment au niveau racinaire (Ivanov *et al.*, 2011). Les auteurs ont également remarqué que le contenu en pigments photosynthétiques était

inférieur à celui des plantules témoins. Le pin sylvestre semble être également sensible au Ni et moins à la présence de Cu dans le milieu (Kukkola *et al.*, 2000). En effet, chez des pins âgés de 4 ans exposés pendant une saison au Ni et / ou au Cu, les auteurs ont pu constater une diminution de l'ordre de 20 % de la biomasse des racelles pour le traitement avec 50 mg Cu. kg<sup>-1</sup> et une réduction de plus de 60 % avec seulement 5 mg Ni. kg<sup>-1</sup>. Une autre étude réalisée sur l'épicéa (*Picea abies*) a montré que Cd, Pb, Cu et Zn entraînaient des réductions de germination des graines avec une réduction plus forte en réponse au Cd (presque 80 %) par rapport au Pb, Cu et Zn (réduction aux alentours de 50 %) (Curguz *et al.*, 2012). Parmi ces ET, les auteurs ont montré que le Pb provoquait la plus forte réduction de la longueur des racines alors que le Cu était l'ET causant la plus forte diminution de longueur des aiguilles. Néanmoins, les concentrations en ET utilisées dans cette étude étaient élevées (de 3 à 100 mg. L<sup>-1</sup> pour chacun de ces ET) pour la germination des graines et les premières étapes de la croissance, suggérant que *P.abies* est assez tolérant à ces ET.

### **3.2. Défense des conifères face au stress oxydant**

Les ET générant la plupart du temps des ERO, les conifères sont également capables de lutter contre ces molécules oxydantes. Par exemple, l'activité de la peroxydase a été stimulée d'un facteur 3 dans les aiguilles d'épicéas de 2 ans exposés pendant 15 jours à 21 mg Cd. kg<sup>-1</sup> de sol sec (Radotic *et al.*, 2000). L'augmentation de l'activité peroxydase a été observée également chez des plantules de pin sylvestre (stimulation de 20 à 30 % au niveau des racines) cultivées pendant 7 mois sur des sols forestiers urbains pollués en Cu, Cr, Pb et Zn (Markkola *et al.*, 2002). La famille des glutathion-S-transférases (GST) catalyse la conjugaison du GSH avec des molécules électrophiles mais est également impliquée dans la limitation des concentrations en ERO (Edwards *et al.*, 2005). Les activités GST peuvent être stimulées en réponse aux ET. Par exemple, Schröder *et al.* (2003) ont montré une augmentation de 50 % de l'activité GST dans des cellules de *Picea abies* exposées à l'As et au Cu. Par contre, ces auteurs ont montré qu'une exposition au Pb ne modifiait pas cette activité. Une autre étude réalisée chez des plantules de pin sylvestre traitées pendant 6 semaines avec 150 µM de Zn a mis en évidence une augmentation de l'activité de plusieurs enzymes anti-oxydantes (Ivanov *et al.*, 2012). Les auteurs ont en effet observé une stimulation de la SOD dans toute la plantule (racines, tige, aiguilles) ainsi qu'une augmentation des activités catalase dans les aiguilles et la tige et peroxydase dans les racines ainsi que la tige. En conséquence, le niveau d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et celui

de malondialdéhyde (un produit de la peroxydation lipidique) sont restés proches des plantules témoin. Ces auteurs ont aussi souligné une accumulation de proline, molécule pouvant également jouer un rôle anti-oxydant.

#### IV. Présentation des conifères sélectionnés

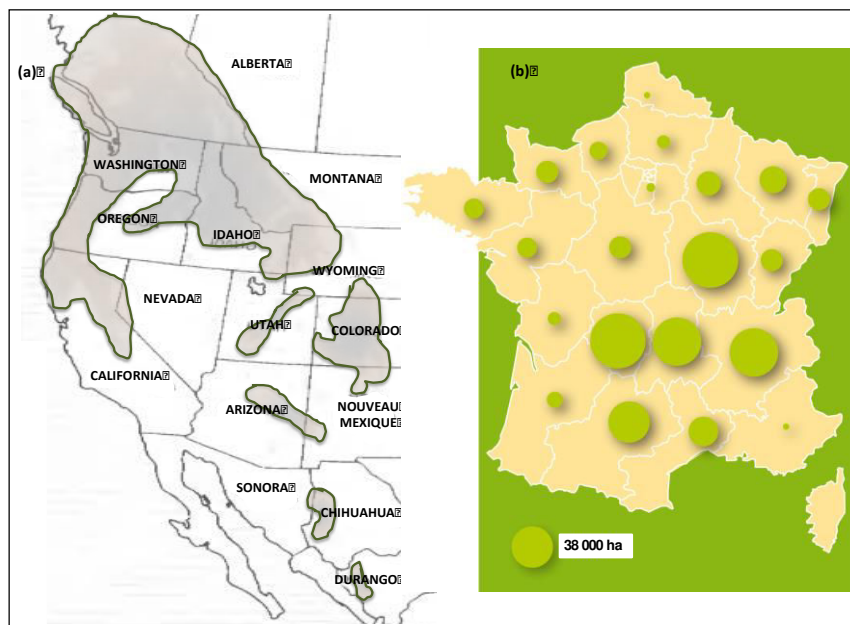
La forêt française compte près de 3/4 des essences présentes en Europe avec 126 espèces d'arbres ; une diversité qui s'explique par la variété des milieux. Les conifères couvrent un tiers des forêts de France métropolitaine, les feuillus occupant les deux tiers restant. Néanmoins, plus de la moitié du volume de bois commercialisé est issue de conifères (site internet 14). Les sapins de Douglas (figure 36) et les mélèzes sont répandus en Limousin et des études antérieures sur l'effet et l'accumulation du Cd chez le mélèze hybride (un modèle *in vitro*) et le Douglas (modèle arbre en serre) ont été menées au LCSN, fournissant des résultats intéressants pour poursuivre ces travaux (Astier, 2010 ; Moussavou Moudouma, 2010 ; Moussavou Moudouma *et al.*, 2013 ; Astier *et al.*, 2014). Nous avons ainsi sélectionné comme modèles d'étude, le Douglas, le mélèze hybride ainsi que ses deux parents, le mélèze d'Europe et le mélèze du Japon. Hormis les quelques travaux réalisés au laboratoire, peu de données sont disponibles sur les réponses des sapins de Douglas et des mélèzes aux ET (et notamment au Cd), ce qui apporte un aspect novateur à cette étude. De plus, le mélèze hybride a souvent été comparé à ses deux parents pour diverses caractéristiques (tolérance au froid, à l'humidité du sol, qualité du bois...) mais jamais pour sa tolérance aux ET, ce qui permettra d'apporter une caractérisation supplémentaire du mélèze hybride par rapport à ses parents.



**Figure 36.** Forêt de sapins de Douglas (d'après le site internet 15) (Photo : JC Dupuy).

## 1. Le Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco)

Le Douglas (ou sapin de Douglas ou pin de l'Oregon) appartient à la famille des Pinacées. Contrairement à ce que laisse entendre son nom vernaculaire, le sapin de Douglas n'appartient pas au genre des Sapins (*Abies*) comme l'avait classé initialement David Douglas (site internet 16). Son aire naturelle s'étend sur plus de 2 500 km le long de la côte ouest du continent nord-américain, allant de la Californie à l'Alaska, du niveau de la mer jusqu'à 1 700 m d'altitude (figure 37a) (Héois, 1994). Découvert en 1792 par Archibald Menzies, il a été importé en Europe en 1827 par le botaniste écossais David Douglas puis introduit en France au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle (1842) comme arbre ornemental dans les parcs et jardins mais ce n'est que dans la seconde moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, dans le cadre d'une politique de reboisement, qu'il a été significativement introduit en forêt (site internet 17). Cinq régions concentrent à elles seules plus de 70 % des plantations de Douglas : Limousin, Bourgogne, Rhône-Alpes, Auvergne et Midi-Pyrénées (figure 37b). A un degré moindre, il est également possible de trouver des forêts de Douglas dans le Morbihan, l'Orne, l'Eure, le Bas-Rhin et les Vosges. Avec une surface de 420 000 ha, la France constitue le premier réservoir européen de Douglas, devant l'Allemagne et largement devant la Grande-Bretagne et l'Espagne (site internet 18). La région Limousin, avec 75 000 ha, possède le plus important massif de Douglas français (site internet 19).



**Figure 37.** Aire naturelle de répartition du sapin de Douglas (a) et sa distribution géographique en France (b) (d'après Bastien *et al.*, 1986 et le site internet 17).

Le Douglas a une croissance rapide et il peut mesurer une cinquantaine de mètres en Europe et jusqu'à 100 m dans son aire d'origine. C'est une essence de lumière qui apprécie toutefois un léger ombrage au stade juvénile. Il ne perd pas ses aiguilles à l'automne mais en renouvelle une partie chaque année. Il peut vivre entre 400 et 500 ans et supporte assez bien les sécheresses estivales et les grands froids hivernaux. Il se plaît dans les sols acides (pH 4,5 à 6), profonds, légers et bien drainés mais pas hydromorphes (Bastien *et al.*, 1986.) Le Douglas a peu d'ennemis si ce n'est l'Hylobe qui attaque les jeunes plants et les cervidés (abrouissements, écorçages, frottis) ainsi que les léporidés (rongement d'écorces) qui peuvent nuire à son développement (site internet 20 et 21). Sa résistance naturelle aux insectes et aux champignons est supérieure à la plupart des autres essences résineuses présentes sur le sol européen (site internet 15). Cette essence offre aussi et surtout un bois aux remarquables propriétés mécaniques et ayant une durabilité naturelle élevée (imputrescible à cœur) ce qui permet de limiter les traitements chimiques. Ceci fait du Douglas un produit intéressant pour la fabrication de matériaux durables : bois d'œuvre pour la construction de charpentes, parquets, panneaux contreplaqués, bardages, bois collés dans la décoration et dans la menuiserie intérieure et extérieure (site internet 15). Le Douglas est également utilisé dans les secteurs de la construction navale et les travaux hydrauliques et maritimes (écluses, pilotis, appontement) (site internet 22).

## **2. Les mélèzes**

Les mélèzes sont des Gymnospermes appartenant à la famille des Pinacées et au genre *Larix*. Ils font partie des rares conifères à feuillage caduc. Les jeunes peuplements sont assez sensibles au vent mais les plus anciens (environ 20 mètres de hauteur) sont plus résistants (Henriksen, 1998 ; Larsson-Stern, 2003). Les mélèzes détiennent certains atouts pour résister au vent avec un système racinaire en cœur favorisant une pénétration des racines obliques ainsi qu'un chevelu racinaire dense. De plus, de par leur caractère caducifolié, la perte de leurs aiguilles à l'automne limite la prise au vent pendant l'hiver. Tous les mélèzes possèdent la même période de dissémination des graines (fin Novembre à mi février) et celles-ci ont généralement une faculté germinative assez faible (site internet 23). Le mélèze est une essence dite « pionnière », c'est-à-dire pouvant coloniser des terrains nus et donc peu exigeant en terme de richesse du sol en minéraux. Il a une croissance rapide et a besoin d'une forte intensité lumineuse pour un développement optimal (site internet 14). Il craint néanmoins les sols gorgés

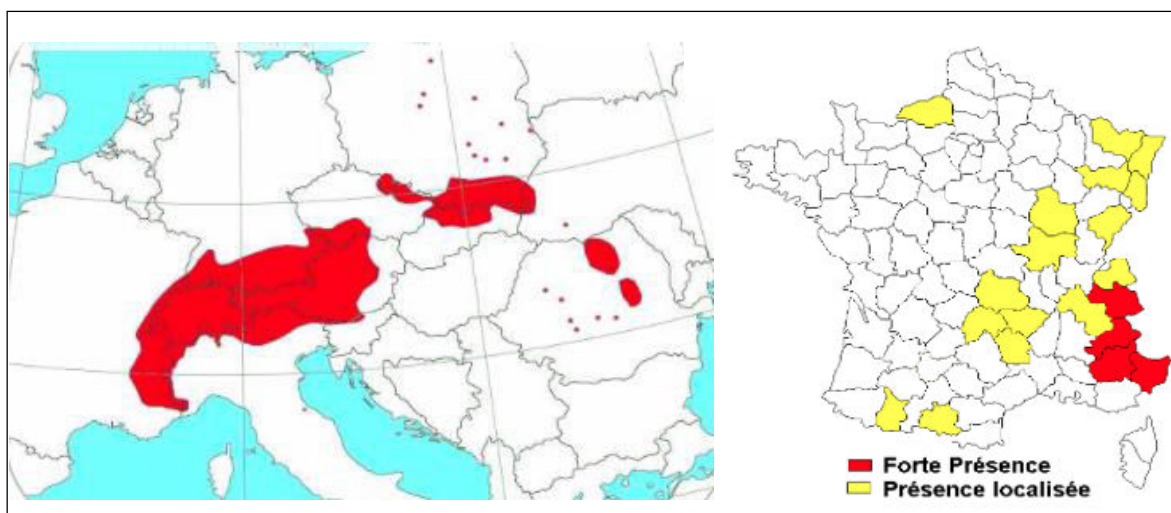
d'eau et les sols très acides (pH < 3,5) et demande une terre profonde, ni trop humide, ni trop sèche (site internet 19).

Les mélèzes sont largement exploités dans les programmes de reboisement et pour les constructions. En effet, tout comme le Douglas, ils présentent une résistance naturelle à de nombreux insectes et champignons, ce qui fait de ce bois réputé imputrescible un produit intéressant pour la fabrication de matériaux durables et ne nécessitant pas de traitements chimiques. Cependant, les mélèzes sont sensibles (surtout celui d'Europe) à la maladie du chancre ou « cancer de l'arbre ». C'est une maladie cryptogamique provoquée par le champignon *Lachnellula willkommii*. Elle est caractérisée par des nécroses de l'écorce atteignant le tronc et les rameaux, constituant des plaies ouvertes et donc de véritables portes d'entrées à d'autres pathogènes. Cette maladie affecte la croissance et la qualité du bois (Riou-Nivert, 2001). Les mélèzes peuvent être aussi plus ou moins sensibles à quelques insectes défoliateurs tels que la tordeuse grise (*Zeiraphera diniana*), le coléophore (*Coleophora laricella*) ou mineuse des aiguilles et la nonne (*Lymantria monacha*) (site internet 24). Enfin, comme de nombreux ligneux, les mélèzes peuvent être altérés par les cervidés (frottis, écorçage, abroutissement) et les léporidés (rongement d'écorces) (site internet 21).

Les mélèzes sont assez répandus dans le Limousin qui est la troisième région de France la plus productive de bois et la seconde pour le mélèze (Martin-Dupont *et al.*, 2008). La Corrèze est actuellement le département français possédant la plus grande surface de boisements de mélèzes.

### **2.1. Le mélèze d'Europe (*Larix decidua* Mill.)**

On le retrouve dans les massifs montagneux des Alpes, des Sudètes, du centre de la Pologne et des Carpates. Il est présent dans l'étage subalpin jusqu'à 2400 m d'altitude mais aussi sur les plateaux de Pologne et de Lubin entre 150 et 600 m (figure 38) (Vidakovic, 1991). En France, il est présent dans les Pyrénées, le Massif Central, les Vosges, les Alpes et les plateaux calcaires du Nord Est (figure 38).



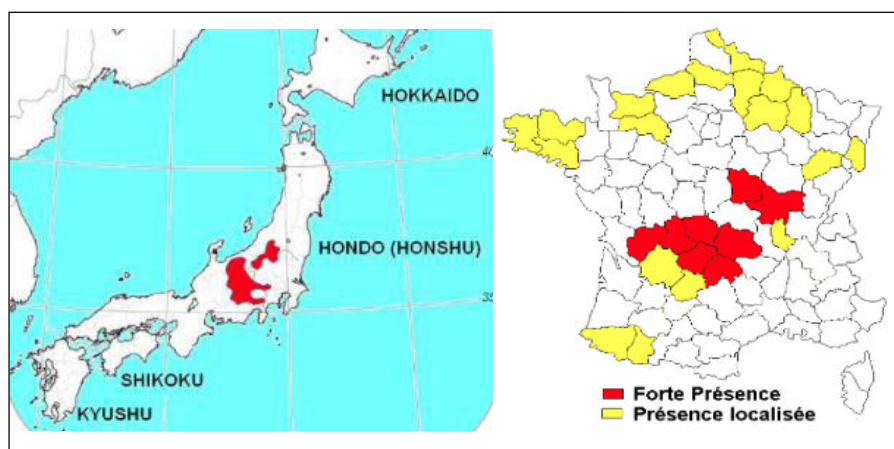
**Figure 38.** Aire naturelle du mélèze d'Europe et distribution géographique en France (d'après le site internet 25).

Sa croissance est régulière et continue et il peut mesurer entre 30 et 40 m et vivre jusqu'à 500 ans. A l'inverse du mélèze du Japon (présenté dans le paragraphe suivant), il ne craint pas le froid et tolère des variations de température importantes et brusques. Il demande une atmosphère relativement sèche et résiste aux sécheresses estivales. Cependant, de par sa présence géographique morcelée, il offre diverses particularités marquées. En effet, il apprécie une humidité plus marquée à basse altitude en Autriche tandis que dans les Sudètes (entre 300 et 800 m), il est moins exigeant en lumière et plus tolérant à l'humidité. On le retrouve aussi à basse altitude en Pologne où le climat continental est plus sec. En France, il apprécie les sols meubles, légèrement alcalins, bien aérés et alimentés en eau mais ne supporte pas les sols compacts et gorgés d'eau (site internet 23). Pour les mélèzes d'Europe implantés en Limousin, le matériel recommandé en premier choix pour le boisement et le reboisement est issu de vergers à graines (voir annexe 2). Ces vergers sont des plantations d'individus sélectionnés pour leurs qualités génétiques et destinés à se reproduire par voie sexuée.

## **2.2. Le mélèze du Japon (*Larix kaempferi* (Lamb.) Carrière)**

Le mélèze du Japon est l'espèce de mélèze la plus fréquemment rencontrée en région Limousin. Les premières plantations y ont été réalisées dans les années 1950-1960 et cette espèce occupe environ 5 % des surfaces boisées de la région (Riou-Nivert, 2001). Originaire de l'île de Hondo au Japon (à une altitude de 1200 à 2400 m), il fut introduit en Europe en 1861

et sa localisation en France est principalement dans les régions au climat océanique, dans le Massif Central et en Lorraine (figure 39) (site internet 19).



**Figure 39.** Aire naturelle du mélèze du Japon et distribution géographique en France (d'après le site internet 25).

Dans son aire originelle, c'est un arbre montagnard jouissant de températures douces. Il apprécie un climat frais et humide et craint l'hydromorphie et la sécheresse. Il préfère les sols frais, légers et aérés à pH légèrement acide et serait plus sensible à la contrainte de sol que le mélèze d'Europe et le mélèze hybride (site internet 24). Il croit rapidement les 20 premières années puis plus lentement après 30 ans. De part son débourrement précoce, il est plus sensible aux gelées précoces mais aussi tardives. Sa longévité est d'environ 200 ans et il peut atteindre 30 à 40 m. Pour les mélèzes du Japon implantés en Limousin, le matériel recommandé en premier choix pour le boisement et le reboisement est issu de vergers à graines danois (voir annexe 2).

### **2.3. Le mélèze hybride (*Larix x eurolepis* Henry)**

Le mélèze hybride est issu du croisement direct entre un clone de mélèze d'Europe utilisé comme mère et plusieurs clones sélectionnés de mélèze du Japon (issus des mêmes parents) utilisés comme pères (Bastien et Keller, 1980). C'est donc un hybride de première génération (hybride F1). Ce croisement s'effectue en verger à graines (voir les différents types de vergers à graines en annexe 3). Le mélèze hybride n'existe donc pas à l'état naturel, les aires naturelles de ces deux espèces étant distinctes. En France, sur les stations convenant au mélèze hybride, il est conseillé d'utiliser préférentiellement la variété hybride améliorée française « FH201-Lavercantière » (Riou-Nivert, 2001) (annexe 2). Cette variété est récoltée en France



dans le verger de Lavercaillère (Lot, France) (code LEU-VG-01) (voir annexe 4). Elle est produite à partir d'un clone de mélèze d'Europe (utilisé comme mère) originaire du Tyrol autrichien et sélectionné dans une plantation danoise et de 118 clones de mélèzes du Japon (utilisés comme pères) originaires de l'île de Hondo (Japon) et sélectionnés au Danemark (Riou-Nivert, 2001). Les graines récoltées dans ce verger d'hybridation (voir annexes 3 et 4) et les plants produits à partir de celles-ci sont commercialisés en catégorie qualifiée et ont déjà montré des peuplements homogènes vigoureux et de très bonne forme (rectitude du tronc). Le pollen des mélèzes du Japon étant déposé de façon artificielle sur les cônes du mélèze d'Europe (pollen préalablement conservé car les deux espèces n'arrivent pas à maturité sexuelle en même temps), cette variété française montre un taux de fécondation très élevé (plus de 90 %). Il existe également des variétés améliorées récoltées au Danemark ou aux Pays-Bas qui sont parfois utilisées en France mais sous réserve que la proportion de mélèzes hybrides dans les variétés issues de ces derniers soit au moins égale à 60 %. En effet, contrairement à la variété française, la pollinisation se fait par le vent, sans intervention humaine (Riou-Nivert, 2001). En France, les plantations sont jusqu'à ce jour réduites car l'obtention de variétés hybrides à grande échelle est récente. Actuellement, ce sont les hybrides de première génération qui sont préférés bien que des études avec les hybrides de deuxième génération (dits F2), c'est-à-dire issus de la recombinaison d'hybrides F1, soient en cours (site internet 24).

Comme le mélèze du Japon et celui d'Europe, le mélèze hybride est exigeant en lumière et n'apprécie pas les sols riches en eau et compacts. Par ailleurs, il présente des caractères hérités d'un des parents comme la résistance au chancre provenant du mélèze du Japon et la rectitude du tronc (critère important pour un meilleur rendement à l'usinage dans l'industrie du bois) provenant du mélèze d'Europe (Keiding, 1968 ; Bastien et Keller, 1980). Il peut aussi présenter des caractères intermédiaires ou supérieurs à ceux des parents. Par exemple, sa longévité est estimée comme intermédiaire (300 ans) mais son amplitude écologique est supérieure et il peut ainsi se développer sur des sols dont le pH varie de 4 à 6. Par ailleurs, de par son débourrement plus tardif que celui des parents, le mélèze hybride résiste mieux aux gelées de printemps. Il serait en voie de remplacer le mélèze du Japon dans le reboisement. Il n'est donc pas exclu de supposer que le mélèze hybride puisse présenter de meilleures capacités de tolérance et d'accumulation du Cd que ses parents, d'où son intérêt d'étude dans ce travail. Une certaine variabilité peut toutefois se produire selon les clones utilisés comme père pour le croisement et donner ainsi plusieurs variétés de mélèze hybride. Par exemple, la variété FH-

201 montre des gains moyens de 20 % sur la croissance juvénile en hauteur, en diamètre et en circonférence (soit 60 % en volume) ainsi qu'une duraminisation plus rapide de 10 ans par rapport au mélèze d'Europe (site 24).

## 2.4. Bilan comparatif des trois espèces de mélèze

Le tableau 15 a été établi par la société royale forestière de Belgique et résume les différentes exigences en réserves en eau du sol pour les mélèzes poussant en Limousin. On peut constater que le mélèze hybride peut se développer sur une plus large « gamme » de sols que ses parents en ce qui concerne le niveau d'humidité.

**Tableau 15.** Comparaison de l'adaptabilité du mélèze d'Europe, du mélèze du Japon et du mélèze hybride à la réserve en eau du sol adaptée au cas du Limousin (d'après le site internet 26).

	Niveau d'humidité du sol						
	Très sec	Sec	Bien drainé	Frais et profond	Faiblement humide	Humide	Très humide et marécageux
Mélèze du Japon							
Mélèze d'Europe							
Mélèze hybride							

La couleur bleue indique l'optimum écologique de l'espèce, la blanche correspond au niveau d'humidité où la croissance est moyenne et la rouge montre le niveau d'humidité de sol qui n'est pas supporté par l'espèce.

Le tableau 16 compare différents critères d'un point de vue qualitatif entre les trois espèces de mélèzes. Globalement, le mélèze hybride semble plus vigoureux que ses parents et serait plus intéressant pour la sylviculture et l'industrie du bois.

**Tableau 16.** Comparaison qualitative des principales caractéristiques des trois espèces de mélèze (adapté de Perron, 2006).

Caractéristiques	Mélèze d'Europe	Mélèze du Japon	Mélèze hybride
Croissance	+	++	+++
Tolérance au gel	+++	+	++
Résistance au chancre	+	+++	++
Qualité du bois	+++	+	++
Rectitude du tronc	++	+	+++

Plus le nombre de + est important et plus le caractère est favorable.

## V. Démarche expérimentale

Ce travail s'articule non seulement autour de différentes espèces de conifères mais aussi autour de plusieurs modèles de culture, lesquels permettent par des approches complémentaires de mieux comprendre les réponses des conifères face à une contamination de leur milieu par le Cd ou par d'autres ET.

### 1. Présentation des types de culture et intérêts

#### 1.1. Culture *in vitro*

La technique de culture *in vitro* est un mode de multiplication végétative artificielle s'effectuant en condition d'asepsie stricte et qui permet d'obtenir des clones sélectionnés dans des conditions de culture parfaitement contrôlées (milieux de culture définis pour chaque type de plante, température, lumière, humidité...) à partir d'un explant de départ. Ainsi, le fait de travailler dans des conditions constantes contrôlées avec des clones permet une grande répétabilité de réponse du matériel végétal étudié. Cette technique permet donc de s'affranchir de nombreux paramètres pouvant causer des divergences de réponses physiologiques et métaboliques. Par exemple, l'assainissement du matériel végétal permet d'éviter leur contamination par des pathogènes (virus, champignons, bactéries). De plus, la culture en conditions optimales permet un raccourcissement du cycle de développement (gain de temps), une production rapide et en masse sur une surface réduite (gain de place) et à n'importe quel moment de l'année (affranchissement des saisons).

Cependant, tous les végétaux ne peuvent être multipliés par voie végétative. En effet, parmi les 4 modèles étudiés, seulement un était disponible par cette voie. Il s'agit du mélèze hybride pour lequel les plantules sont obtenues *in vitro* à partir de masses pro-embryogènes par la technique d'embryogenèse somatique mise au point par l'INRA d'Orléans et utilisée au laboratoire (Von Aderkas *et al.*, 2002a et b ; Guillaumot *et al.*, 2008 ; Lelu-Walter et Pâques, 2009). Les étapes sont présentées dans la partie « Matériels et Méthodes ». L'embryogénèse somatique permet l'obtention d'embryons à partir de cellules somatiques, c'est à dire non sexuelles (reproduction asexuée). Elle mime la production d'embryons telle qu'elle se déroule dans les graines mais sans recours à la reproduction sexuée. En excisant les embryons immatures de la graine à un stade de développement déterminé, il est possible d'induire *in vitro* leur multiplication par un processus de formation continue de nouveaux embryons (polyembryonie de clivage correspondant à une formation *de novo* et une division de ces embryons).

Néanmoins, si sophistiquée que soit cette méthode, elle ne peut aujourd'hui reproduire entièrement la complexité d'un organisme vivant en conditions naturelles et donc soumis à de nombreuses contraintes (variations de températures, de luminosité, d'hygrométrie, d'accès aux nutriments, développement de maladies, attaque d'herbivores...). Elle fournit des indices de compréhension de tel ou tel processus mais demande des confirmations en parallèle sur des modèles d'étude plus proches des conditions naturelles pour avoir une idée plus réaliste des réponses des plantes. Ainsi, une double approche, ou plus exactement un constant va-et-vient entre méthodes *in vitro* et expérimentation *in vivo*, est indispensable.

## 1.2. Germination en serre

Travailler sur des jeunes plantules issues de la germination de graines permet d'étudier le matériel végétal dans ses premiers stades de développement. De plus, une culture sous serre permet de travailler dans des conditions semi-contrôlées plus proches des conditions naturelles que la culture *in vitro*. En effet, une étude sur des plantules issues de graines prend en compte la diversité génétique. De plus, le substrat de culture est également moins artificiel car l'utilisation de terreau ou de sols collectés sur le terrain pour étudier l'effet des ET prend en compte les interactions des ET avec les particules du sol et les microorganismes. La culture sous serre permet tout de même de contrôler l'humidité, la température, l'irrigation et de gérer les possibles maladies, ce qui permet de limiter la variabilité des réponses des plantes.

Nous avons choisi de travailler sur des plantules issues de germination de graines se développant pendant deux mois sur des sols contaminés de deux types (les informations sont détaillées dans la partie « Matériels et Méthodes ».) :

- des sols à contamination « mono-métallique ». Nous avons retenu le Cd et celui-ci est apporté artificiellement en une seule fois à l'aide d'une solution de  $\text{CdCl}_2$ . De cette façon, nous pouvons étudier les réponses des plantes liées à un ET unique.

- des sols à contamination multi-métallique, provenant de sols issus d'anciens sites miniers. Cette étude constitue un premier rapprochement avec des conditions de terrain dans lesquelles la pollution métallique fait généralement intervenir plusieurs ET à la fois. Ceci permet ainsi d'étudier les réponses des plantes à une hétérogénéité métallique menant ainsi davantage vers des perspectives plus appliquées que la contamination artificielle au Cd.

Même si le modèle plantule en serre n'est pas totalement représentatif de ce qui se passe en conditions naturelles, il est intéressant dans la mesure où il permet de manière assez rapide (en 2-3 mois) d'évaluer l'impact d'un ou de plusieurs ET sur les plantes. De plus, les conditions en serre sont moins contrôlées qu'*in vitro* (notamment en ce qui concerne les variations de températures), ce qui permet aux plantules de développer probablement davantage de métabolites secondaires et d'avoir une composition moléculaires plus « réaliste ». Par ailleurs, si des plantules peuvent tolérer plusieurs semaines ou mois une pollution en ET modérée, il est donc très probable que des plantes plus âgées (censées être plus robustes) puissent être des modèles de choix pour la phytoextraction.

### **1.3. Arbres en serre**

Notre dernier modèle d'étude fait appel à des mélèzes (d'Europe, du Japon et hybrides) âgés de deux ans, donc toujours juvéniles mais à un stade de développement beaucoup plus avancé que le stade plantule. Ces arbres ne sont pas des clones et sont donc représentatifs de la diversité génétique même si c'est une variété particulière qui est retenue pour être plantée. Comme pour les plantules, ces arbres poussent en serre sur un substrat contaminé artificiellement au Cd apporté en une seule fois sous forme d'une solution de CdCl<sub>2</sub>. En utilisant un modèle plus âgé, il est ici possible d'appréhender le comportement des espèces dans un contexte plus proche de ce qui est réalisé sur le terrain en terme de phytoextraction des ET. En effet, ce sont généralement des jeunes arbres de 2-3 ans qui sont plantés et non pas des graines qui sont semées sur les sites pollués. De plus, avec un système racinaire plus important que des plantules, les jeunes arbres de 2 ans sont plus représentatifs de ce qui pourrait être testé ensuite sur site pour décontaminer des sols.

## **2. Relation entre les modèles et les objectifs recherchés**

Dans un premier temps, l'étude a été menée sur des plantules de mélèze hybride cultivées *in vitro* et exposées au Cd afin de réduire le temps d'exposition et d'évaluer rapidement leurs réponses physiologiques ainsi que leur efficacité maximale d'accumulation du Cd. Pour cela, l'effet du Cd a été étudié sur la croissance et sur des paramètres du métabolisme carboné et azoté des plantules. L'utilisation de fortes concentrations en Cd a permis de tester la capacité maximale de tolérance au Cd afin de voir si déjà au stade de toute

jeune plantule, le mélèze hybride pouvait être tolérant. Par exemple, des études antérieures réalisées au laboratoire ont montré que des plantules d'une herbacée sensible au Cd (*Arabidopsis thaliana*) présentaient en l'espace d'une semaine une réduction de croissance significative en réponse à 100  $\mu$ M de Cd (Moussavou Moudouma *et al.*, 2012). Des plantules de mélèze hybride exposées pendant une semaine à une forte concentration de Cd de 1.5 mM ne présentaient, quant à elle, pas de modification notable de croissance, ce qui tend déjà à montrer un fort potentiel de tolérance de cette espèce (Moussavou Moudouma *et al.*, 2013). Dans notre étude, les concentrations ont été diminuées mais les expositions ont été plus longues afin d'avoir un effet davantage à long terme du Cd. Nous nous sommes attachés à étudier la répartition du Cd non seulement entre les parties aériennes et racinaires mais aussi entre le contenu intracellulaire et pariétal afin de voir comment le Cd s'accumule dans les plantes au cours du temps.

Dans une seconde partie, nous avons travaillé sur deux modèles : les plantules issues de la germination de graines et les arbres de 2 ans. Ces deux modèles ont été exposés à des concentrations en Cd plus faibles que pour le modèle *in vitro* mais sur une durée plus longue de 2 mois pour les plantules et de 9 mois pour les arbres. Pour les deux modèles, nous nous sommes intéressés à deux aspects : la comparaison de l'efficacité de la phytoextraction du Cd entre les espèces et l'effet du Cd sur la paroi cellulaire. En effet, une des nombreuses stratégies développée par certains végétaux pour résister et s'adapter à un environnement contaminé par des ET est d'ajuster la composition de leurs parois cellulaires, premières barrières physico-chimiques de la cellule face aux contraintes environnementales.

- Concernant les plantules en serre, nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'effet du Cd sur leur croissance et sur la biosynthèse de composés impliqués chez certaines espèces végétales dans la complexation du Cd (composés riches en thiols et polyamines). Nous avons également choisi d'étudier l'effet du Cd sur l'activité des pectines méthylestérases (PME) car ces enzymes sont impliquées dans le remodelage pariétal et peuvent donc réguler la capacité de la paroi à piéger le Cd.
- Pour les arbres en serre, nous avons souhaité caractériser la composition monosaccharidique des pectines chez les 3 espèces de mélèze car ces polysaccharides pariétaux jouent un rôle important dans la chélation du Cd.

Notre objectif est d'apprécier tout d'abord les modifications chimiques quantitatives et qualitatives des pectines du bois et des écorces de la dernière année de culture en serre qui pourraient être induites par un stress métallique. En parallèle, nous avons étudié l'effet du Cd sur la croissance des mélèzes puis sa répartition dans les différents organes des arbres pour les 3 espèces. Nous avons ainsi pu comparer leur efficacité d'accumulation du Cd et apporter des premiers éléments de réponse quant à l'opportunité d'utiliser des mélèzes en phytoextraction du Cd.

Dans la dernière partie, afin de se rapprocher davantage de conditions du terrain, nous avons choisi d'étudier la tolérance des conifères à un mélange d'ET car cette situation est la plus fréquemment rencontrée sur les sites pollués. Pour cela, nous avons travaillé sur des plantules de Douglas mises à germer sur des sols issus d'anciens sites miniers et fortement contaminés en As, Sb et Pb. Le choix s'est porté sur le modèle plantule et non sur le modèle arbre pour une raison de place et surtout de quantité de sol disponible. En effet, les expérimentations nécessitent au minimum 10 arbres par condition (témoin et 3 sols pollués) car plus de variabilité peut être observée dans ce cas que pour des plantules de quelques semaines (lesquelles sont étudiées par pot de plusieurs dizaines d'individus pour chaque expérience indépendante). Sur la quantité de sol, et pour avoir des sols homogènes, ces derniers ont dû être séchés et tamisés. L'utilisation d'arbres aurait nécessité des quantités conséquentes de substrat à récolter et à conditionner. Par ailleurs, ne disposant pas initialement de données sur la capacité de tolérance des arbres, nous avons préféré débiter nos expérimentations avec des plantules en pots qui ne nécessitent pas de grandes quantités de sol et qui ont poussé de manière homogène lors de l'étude concernant la contamination mono-métallique avec le Cd. Dans cette étude, nous avons tout d'abord évalué l'effet des ET sur la croissance des plantules puis sur les métabolismes azoté et carboné. Nous nous sommes également intéressés à quelques paramètres liés au stress oxydant et nous avons quantifié l'As, le Pb et le Sb dans les racines et les parties aériennes (tiges et feuilles) afin d'évaluer la capacité d'accumulation d'ET du Douglas face à un stress multi-métallique.

**MATERIELS**  
**ET**  
**METHODES**





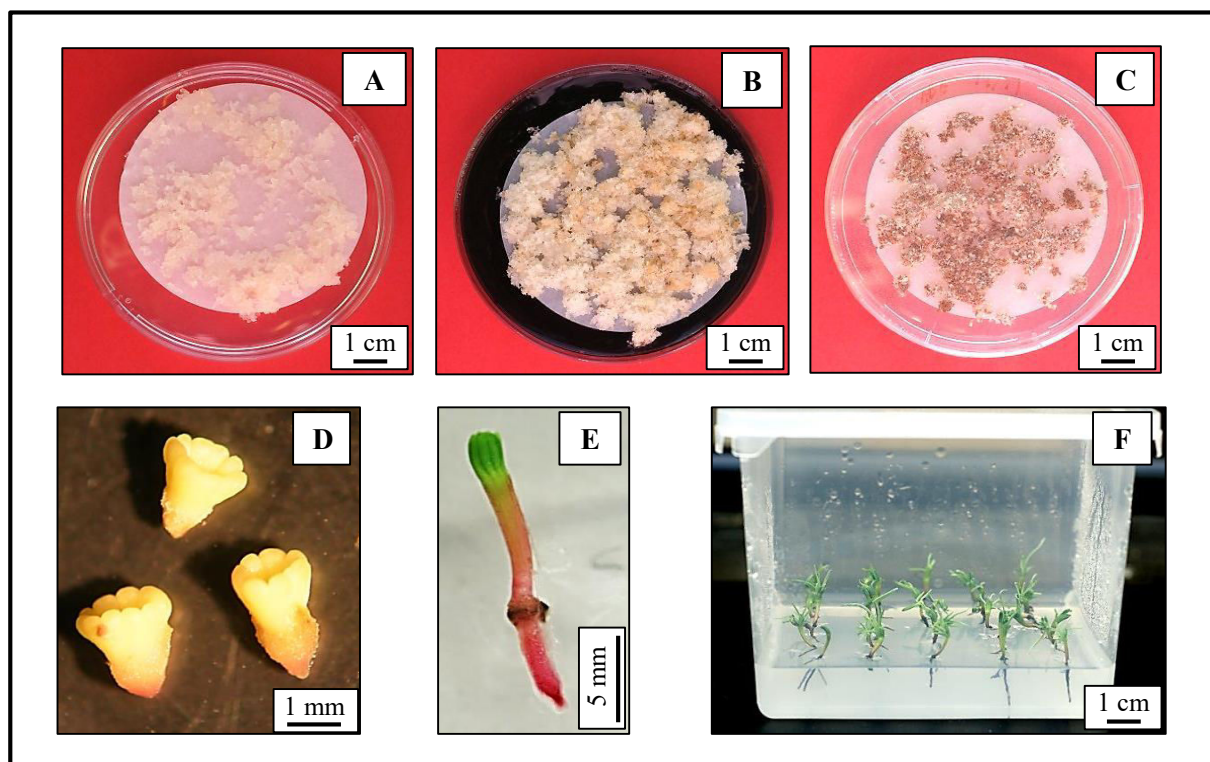
# MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les réactifs et solvants utilisés sont recensés dans l'annexe 5.

## I. Matériel végétal et traitements

### 1. Etapes de culture *in vitro* du modèle mélèze hybride

Les masses pro-embryogènes initiales de mélèze (clone REVE-VERT lignée N23) ont été fournies par le Docteur Lelu-Walter de l'INRA d'Orléans. Toutes les phases de culture se déroulent à 23°C et selon le protocole de Lelu-Walter et Pâques (2009) (figure 40).



**Figure 40.** Etapes de l'embryogenèse somatique et du développement de jeunes plantules de mélèze en culture *in vitro*.

A) Masse pro-embryogène. B) Début de différenciation sur un milieu contenant du charbon actif. C, D) Embryons matures après 6 semaines sur un milieu contenant de l'acide abscissique. E) Plantule âgée de 2 semaines. F) Plantules âgées d'1 mois.

### 1.1. Prolifération

Les masses pro-embryogènes sont cultivées sur un milieu noté DC (DC : division cellulaire) contenant des facteurs de croissance qui favorisent la division cellulaire. Le milieu de base (MB) est composé des éléments suivants (quantités pour 1 L) : glutamine (1,45 g), KNO<sub>3</sub> (100 mg), CaCl<sub>2</sub>, 2 H<sub>2</sub>O (440 mg), MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O (370 mg), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (170 mg), KCl (740 mg), KI (0,83 mg), Na<sub>2</sub> / acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) (37,3 mg), FeSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O (27,8 mg), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (6,2 mg), MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O (16,9 mg), ZnSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O (8,6 mg), myo-inositol (100 mg), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 2 H<sub>2</sub>O (0,25 mg), CuSO<sub>4</sub>, 5 H<sub>2</sub>O (0,025 mg), CoCl<sub>2</sub>, 6 H<sub>2</sub>O (0,025 mg), acide nicotinique (0,5 mg), pyridoxine-HCl (0,5 mg), thiamine-HCl (0,1 mg). Le milieu DC est constitué du milieu MB supplémenté avec 60 mM de saccharose et deux facteurs de croissance, l'acide 2,4-dichlorophénoxy acétique (2,4D) (9 µM) et la benzylaminopurine (BAP) (2,3 µM). Le pH est ajusté à 5,8 et le milieu est solidifié avec 4 g de gomme gellane ou gelrite.

Les masses pro-embryogènes se présentent sous forme de petits filaments blanchâtres. Une quantité de 100 mg de masse pro-embryogène est prélevée et agitée vigoureusement dans 10 mL de ce même milieu (mais sans gelrite) pour la fragmenter. L'ensemble est filtré grâce à une pompe à vide reliée à un entonnoir de type Büchner sur lequel est déposé un papier filtre Whatman® (Grade 2 ; porosité 8 µm ; diamètre 70 mm) stérile. Le filtre recouvert de masse pro-embryogène est ensuite déposé dans une boîte de Pétri contenant le milieu DC pendant une semaine à l'obscurité.

### 1.2. Maturation des embryons somatiques

Le filtre recouvert des masses en prolifération est ensuite transféré dans un premier milieu de maturation (CA) qui correspond au milieu MB auquel sont ajoutés du charbon actif (10 g. L<sup>-1</sup>), 100 mM de saccharose et 4 g. L<sup>-1</sup> de gelrite (le pH étant toujours de 5,8). L'absence de facteurs de croissance (2,4-D et BAP) permet de stopper la prolifération et favorise la différenciation cellulaire. Le charbon actif permet de piéger les facteurs de croissance résiduels ainsi que des molécules sécrétées par les cellules dans le milieu et qui peuvent s'avérer défavorables à leur croissance (von Aderkas *et al.*, 2002a).

Après une semaine à l'obscurité, le filtre est transféré sur un second milieu de maturation (ABA) pendant 6 à 8 semaines en semi-obscurité (20 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) toujours dans les mêmes

conditions. Ce milieu correspond au milieu MB supplémenté avec 200 mM de saccharose, 8 g. L<sup>-1</sup> de gelrite et 60 µM d'acide abscissique (ABA). L'ABA a pour rôle de favoriser la maturation des embryons et leur déshydratation progressive jusqu'au stade de dormance ; il favorise l'accumulation de réserves et inhibe la germination trop précoce des embryons, mimant ainsi le processus de maturation zygotique (von Aderkas *et al.*, 2002b). A la fin de cette phase, des embryons somatiques matures sont donc obtenus.

### **1.3. Germination et croissance des plantules**

Les embryons sont transférés dans un milieu de germination constitué de milieu MB auquel sont ajoutés 90 mM de saccharose et 4 g. L<sup>-1</sup> de gelrite. L'absence d'ABA permet de lever la dormance et donc d'induire la germination. Les boîtes sont placées en position verticale pendant une semaine à l'obscurité afin de favoriser l'élongation de l'hypocotyle puis les jeunes plantules sont soumises à une photopériode de 16 h de lumière (50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) et 8 h d'obscurité pendant 3 semaines.

### **1.4. Exposition des plantules au cadmium**

Âgées d'un mois, les plantules sont ensuite transférées sur un même milieu de germination contenant ou non du cadmium, lequel est apporté sous forme de CdSO<sub>4</sub> pour une concentration finale dans le milieu de 250 ou 500 µM. Après 14 ou 28 jours d'exposition dans les mêmes conditions de température et de photopériode que précédemment, les plantes sont récoltées, les racines sont rincées à l'eau distillée puis essuyées sur papier absorbant et les racines et parties aériennes sont séparées puis congelées jusqu'aux analyses. Pour les plantules servant au dosage du Cd, les racines sont incubées pendant 20 minutes dans de l'EDTA à 10 mM (afin de désorber le Cd présent à la surface des racines) puis rincées à l'eau déminéralisée. Les différents organes sont ensuite séparés et congelés jusqu'aux analyses. La matière sèche (MS) est obtenue après incubation à l'étuve pendant 48 h à 80°C.

## **2. Germination des graines de mélèzes et de Douglas et semis sous serre**

Des cultures ont été initiées à partir de graines de mélèze d'Europe, de mélèze du Japon et de Douglas provenant des « Semences Du Puy » (Le Puy en Velay, Haute Loire, France). Toutes ces graines sont issues de vergers à graines dont il est essentiel de comprendre leur établissement pour connaître leur origine (voir annexe 3).

Des graines de mélèze hybride (même clone que celui des cultures *in vitro*) provenant de la pépinière « Sécherie de la Joux » (Jura, France) ont également été testées car le mélèze hybride était prévu dans le projet initial. Malheureusement, le protocole de germination fourni par la pépinière n'a pas permis d'obtenir des plantules. D'autres protocoles de germination n'ont pu être mis en œuvre par manque de disponibilité des semences.

### **2.1 Origine des graines**

#### **2.1.1. Mélèzes d'Europe et du Japon**

Les semences du Puy font venir les graines de mélèzes d'Europe de Hongrie (région de Sopron) et les graines de mélèze du Japon de Chine mais nous n'avons pas pu obtenir d'informations concernant les vergers d'origine et les sélections.

#### **2.1.2. Douglas**

Les graines de Douglas sont originaires d'un peuplement de verger à graines français classé : la Luzette (Lot, France). La Luzette est le verger à graines de Douglas le plus utilisé en France dont le maître d'ouvrage est le ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt et le maître d'œuvre l'ONF (Office National des Forêts). Le lieu de plantation se situe à 700 m d'altitude et associe les meilleures provenances américaines avec quelques peuplements français. Les clones ont été sélectionnés vers l'âge de 10 ans dans 10 plantations françaises (départements des Vosges, Haute-Vienne, Meurthe-et-Moselle, Dordogne) cultivant des Douglas de diverses provenances. La vigueur (croissance en hauteur à 11 ans), la tardiveté de débourrement et la qualité de la branchaison (branches fines et peu nombreuses) ont été les critères de sélection. Les 42 meilleures provenances américaines et les 20 meilleures provenances françaises ont été retenues. Ainsi, 343 clones ont été bouturés et plantés en 1981. Ce verger a donc au départ une base génétique très large, autorisant une éclaircie génétique pour améliorer encore certains critères. Celle-ci a été réalisée en 2006, après analyse des données collectées dans 20 tests de descendance et dans le verger lui-même. Ces tests ont été

réalisés en France entre 1992 et 2002 à des altitudes comprises entre 420 et 1050 m pour juger de la qualité de chaque clone à travers sa descendance. Ainsi, les clones du verger sont originaires pour 78 % de l'état de Washington (États-Unis), pour 17 % de l'Est de la France, pour 3 % de la Province de Colombie Britannique (Canada) et pour 2 % de l'Etat de l'Oregon (États-Unis). Le verger contient donc 83 % de clones américains avec certains peuplements particulièrement bien représentés comme Darrington (26 % des arbres du verger) ou Humtulips (13 %), ce dernier étant intéressant pour sa tardiveté de débourrement, ce qui le protège des gelées de printemps.

## **2.2. Stratification des graines**

### **2.2.1. Mélèzes d'Europe et du Japon**

Les graines de mélèze du Japon ou d'Europe sont incubées dans une solution d' $H_2O_2$  à 4 % à raison de 1,5 g de graines pour 40 mL de solution. Le traitement s'effectue pendant 48 h à l'obscurité et à 4°C. Les graines sont ensuite rincées abondamment à l'eau distillée puis semées directement en serre.

Ce protocole, inspiré de celui de Lebrun (1970), a été testé également sur les graines de Douglas mais a donné un pourcentage de germination plus faible et donc moins intéressant qu'avec la méthode de stratification au froid.

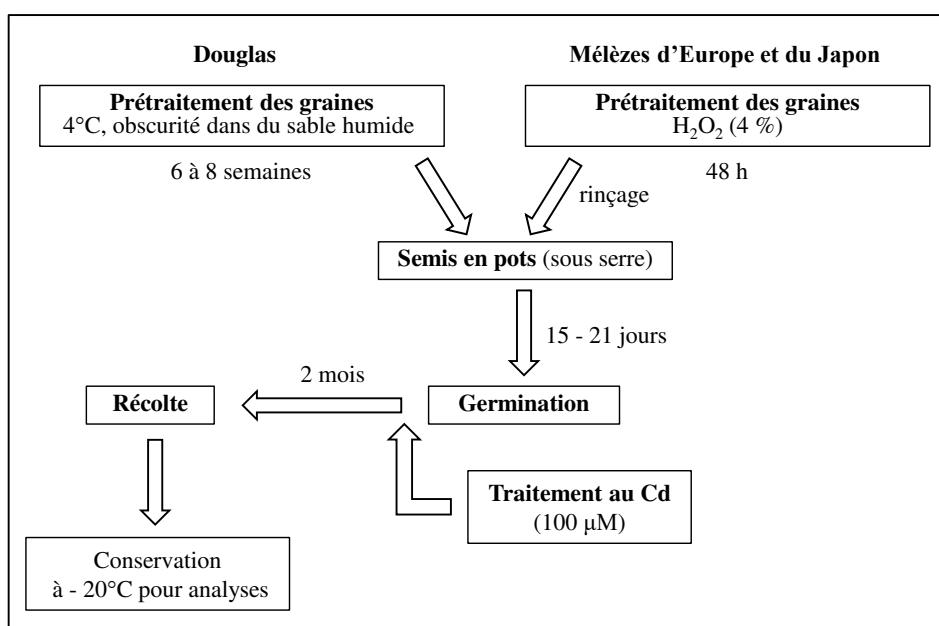
### **2.2.2. Douglas**

Les graines de Douglas sont stratifiées au froid de la manière suivante : des quantités de 1,25 g de graines sont mélangées à du sable humidifié à 10 % (le sable et l'eau ayant été préalablement stérilisés séparément à l'autoclave) puis enveloppées par 2 compresses de gaze stériles. Ces paquets de graines sont ensuite stockés dans des sacs en plastique contenant du sable humidifié à 10 % et sont placés à l'obscurité à 4°C pendant 6 à 8 semaines.

Ce protocole a également été testé avec les graines de mélèze du Japon et les graines de mélèze d'Europe mais leur germination était faible pour celles du mélèze du Japon et quasi nulle pour celles du mélèze d'Europe.

### 2.3. Conditions de culture et récolte des plantules exposées au cadmium

Les graines ont été semées dans des pots contenant un mélange de terreau (2/3) et de sable (1/3) préalablement humidifiés à l'eau distillée et recouvertes d'1 cm de substrat (terreau / sable). Lorsque les graines ont commencé à germer (entre 15 et 21 jours après le semis), le Cd a été apporté en une seule fois par arrosage avec une solution de CdCl<sub>2</sub>. Ainsi, deux conditions d'exposition sont prévues : une condition témoin (T) sans apport de CdCl<sub>2</sub> et une condition où l'apport de Cd permet d'obtenir une concentration finale en Cd de 100 µM. Le protocole de prétraitement des graines et leurs conditions de cultures sont schématisés sur la figure 41.



**Figure 41.** Protocole de germination des graines de Douglas, de mélèze d'Europe et de mélèze du Japon.

Les plantules ont été récoltées après 2 mois d'exposition puis leurs racines ont été nettoyées à l'eau distillée, incubées pendant 1 h dans de l'EDTA à 20 mM, rincées à l'eau déminéralisée (une partie étant consacrée au dosage du Cd) et séchées sur papier absorbant. Les parties aériennes (aiguilles et tige) ont ensuite été séparées des racines. Les masses fraîches (MF) des aiguilles, des tiges et des racines ont été pesées pour chaque condition, congelées dans l'azote liquide puis stockées à -20°C jusqu'aux différentes analyses. Pour l'obtention de la masse sèche (MS), une partie des organes récoltés a été mise 2 jours en étuve à 80°C.

## **2.4. Conditions de culture et récolte des plantules de Douglas ayant poussé sur des sols issus d'anciens sites miniers**

Les graines de Douglas ont été semées en serre sur trois sols préalablement collectés sur deux anciennes mines françaises. Le site de Pontgibaud (P) est une ancienne mine de plomb et d'argent située dans le Massif Central (Pascaud *et al.*, 2014) et le site de La Petite Faye (L) est une ancienne mine d'or située à 60 km au Nord-Est de Limoges (Wanat *et al.*, 2014). Pour L, deux zones distinctes (L1 et L2) ont été définies en fonction de leur concentration différente en ET (antimoine, arsenic et plomb). Des échantillons de sol (les 15 - 20 premiers cm) ont été collectés en 2014 et séchés à l'air au laboratoire avant d'être tamisés à 2 mm puis stockés à température ambiante dans des récipients en polyéthylène. Les graines ont été semées en serre dans des pots (15 cm de hauteur, 18 cm de diamètre) contenant les sols préalablement humidifiés à l'eau déminéralisée. Un sol témoin constitué de 75 % de terreau et de 25 % de sable (exempt d'ET) a été utilisé afin de comparer la croissance et le développement des plantes dans des conditions optimales. Après semis des graines, les pots ont été arrosés avec de l'eau déminéralisée pendant 10 semaines puis les plantes ont été récoltées et les racines incubées pendant 1 h dans une solution d'EDTA à 20 mM. Après rinçage des racines à l'eau déminéralisée et séchage sur papier absorbant, les différents organes ont été séparés, pesés et stockés à - 20 °C jusqu'au diverses analyses. Pour l'obtention de la masse sèche (MS), une partie des organes récoltée a été mise 2 jours en étuve à 80°C.

## **3. Culture sous serre de mélèzes âgés de 2 ans**

### **3.1. Origine des mélèzes**

Les jeunes arbres âgés de deux ans ont été obtenus auprès des pépinières Bauchery (Loir et Cher, France). Les mélèzes hybrides proviennent de la germination de graines de variétés FH201-Lavercantière (issues du verger à graines de Lavercantière LEU-VG-001) distribuées par la société Vilmorin. Les mélèzes du Japon et d'Europe sont issus de la germination de graines fournies par la Sécherie de la Joux mais ces graines sont natives d'un verger danois (code : VG-FP601) pour les mélèzes du Japon et du verger du Theil (Lot, France) (code : LDE-VG-001-Sudètes-Le Theil) pour les mélèzes d'Europe. La traçabilité des graines des différentes espèces de mélèze est résumée dans le tableau 17.



**Tableau 17.** Tableau résumant l'origine des graines et des jeunes arbres des trois espèces de mélèzes.

Espèce	Fournisseur des jeunes arbres (âgés de 2 ans)	Distributeur des graines dont sont issus les jeunes arbres	Site de production et de récolte des graines (code et nom des vergers à graines)	Provenance initiale des graines avant d'être semées en vergers
Mélèze d'Europe	« Les pépinières Bauchery » (Loire et Cher, France)	« La Sécherie de la Joux » (Jura, France)	LDE-VG-001 (Sudètes-Le Theil-VG) (Lot, France)	République Tchèque - Pologne (Région des Sudètes)
Mélèze du Japon			VG-FP601	Japon (Ile de Hondo) mais sélection au Danemark
Mélèze Hybride		Société « Vilmorin » (Maine et Loire, France)	LEU-VG-01 (Lavercantière) (Lot, France). Variété FH201 - Lavercantière	France

### 3.2. Conditions de culture, traitements et récoltes

Les mélèzes d'Europe, du Japon et les mélèzes hybrides âgés de deux ans ont été plantés en pot sous serre en Novembre 2012 dans un mélange 75 % terreau / 25 % sable. La hauteur et le diamètre du tronc (au collet) de chacun d'entre eux ont été mesurés avant leur mise en pot. Après 3 mois d'acclimatation, 3 lots de 10 à 15 arbres ont été constitués par espèce : un lot témoin (arrosé à l'eau distillée) et deux lots arrosés une seule fois avec une solution de CdCl<sub>2</sub> pour des concentrations finales de 50 et 100 µM de Cd dans le sol (correspondant respectivement à 12,5 et 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> de sol sec). Les arbres ont été arrosés par la suite avec de l'eau distillée puis récoltés en Novembre 2013.

Les mélèzes du Japon s'étant mal acclimatés en serre, la moitié des arbres plantés en Novembre 2012 a été perdue. Une nouvelle plantation a donc été réalisée en Novembre 2013 dans les mêmes conditions pour ainsi récolter plus d'une dizaine d'arbres par condition en Novembre 2014. Par ailleurs, en Novembre 2012 et 2013, les deux essais de plantations de Douglas (pour une comparaison avec les mélèzes) n'ont pas été concluants et le trop faible nombre d'arbres acclimatés n'a malheureusement pas permis d'étude sur ce modèle.

Le jour de la récolte, les arbres ont été déterrés et leur hauteur ainsi que leur diamètre (au collet) ont à nouveau été mesurés. Le système racinaire a été rincé puis mis à tremper 2 h dans 20 mM d'EDTA afin d'éliminer le Cd adsorbé en surface. Après rinçage de l'appareil

racinaire à l'eau déminéralisée, les organes ont été séparés : pivot, racines secondaires, aiguilles, bourgeons, rameaux, écorces et bois. Pour les écorces et le bois, la dernière année (année de croissance en serre) a été séparée des deux années précédentes (période de croissance à la pépinière) (figure 42). Les organes ont été pesés pour obtenir la MF puis séchés à l'étuve à 40°C pendant plus d'une semaine pour obtenir la MS. La MS pour chaque organe a ensuite été broyée en poudre (tamisée à 0,5 mm de diamètre) à l'aide d'un broyeur centrifuge (Retsch® ZM200) pour pouvoir être par la suite minéralisée (voir VIII.3.).

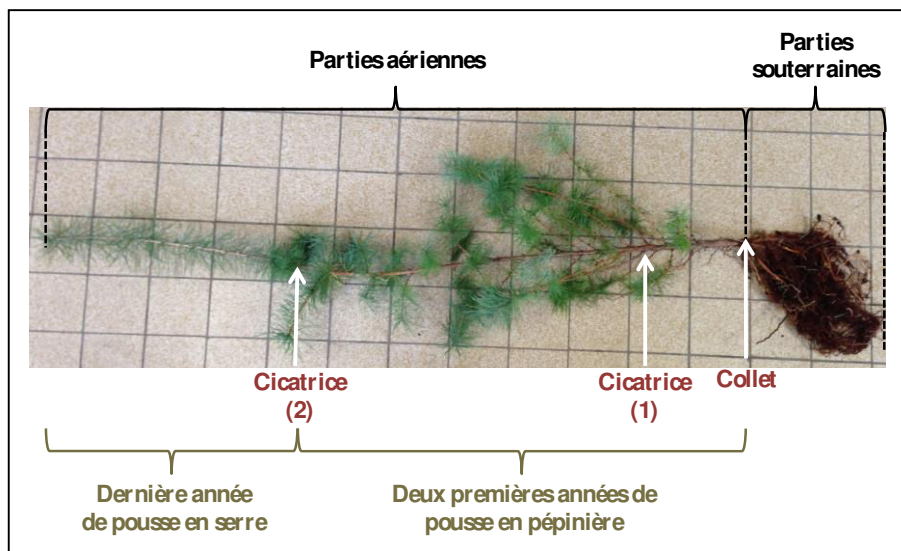


Figure 42. Schéma de découpe d'un mélèze du Japon ayant poussé un an en serre en condition témoin.

## II. Paramètres d'évaluation du métabolisme carboné

### 1. Dosage des pigments photosynthétiques

Une quantité 50 à 100 mg de MF d'aiguilles est broyée au mortier à 4°C avec 25 mg de  $MgCO_3$  afin de neutraliser l'acidité libérée par le contenu vacuolaire lors du broyage et ainsi limiter la dénaturation des pigments (Saladin *et al.*, 2003a). Le broyage se poursuit par l'ajout de 1,5 mL d'acétone à 80 %. Après centrifugation à 3000 g et à 4°C pendant 10 min, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 663, 647 et 470 nm, longueurs d'onde correspondant respectivement au maximum d'absorption des chlorophylles a et b et des caroténoïdes. La concentration de chaque pigment (en  $\mu g. mL^{-1}$ ) est calculée à partir des équations suivantes (Lichtenthaler, 1987) :

$$Ca = 12,25 \times Abs_{663} - 2,79 \times Abs_{647}$$

$$Cb = 21,50 \times Abs_{647} - 5,10 \times Abs_{663}$$

$$Cc = [1000 \times Abs_{470} - 1,82 \times Ca - 85,02 \times Cb] / 198$$

Avec : C : concentration      a : chlorophylle a      b : chlorophylle b      c : caroténoïdes

Abs<sub>663</sub> : Absorbance à 663 nm

Abs<sub>647</sub> : Absorbance à 647 nm

Abs<sub>470</sub> : Absorbance à 470 nm

Les résultats sont ensuite exprimés en mg. g<sup>-1</sup> MS.

## 2. Dosage de l'amidon

Une quantité de 150 à 200 mg de MF est broyée au mortier à 4°C avec 1,5 mL de tampon phosphate de potassium 0,1 M à pH 7,5 (Saladin *et al.*, 2003a). Le broyat est centrifugé 10 min à 10000 g et à 4°C. Le surnageant est conservé car il sert à doser les glucides solubles totaux. Le culot qui contient l'amidon est resuspendu dans 500 µL d'une solution contenant du diméthylsulfoxyde (DMSO) 8 N et de l'HCl à 37 % (4:1, v/v). Le mélange est alors incubé 30 min au bain-marie à 60°C puis centrifugé 15 min à 13000 g à 20°C. Le dosage est effectué en incubant pendant 15 min : 100 µL de surnageant, 1 mL d'eau distillée et 100 µL de réactif d'iode acide (composé de KI à 12,72 g. L<sup>-1</sup> et I<sub>2</sub> à 0,72 à g. L<sup>-1</sup> dans de l'HCl à 0,25 N). Après centrifugation pendant 5 min à 10000 g et 20°C, l'absorbance est lue à 580 nm au spectrophotomètre UV- visible (Shimadzu, PharmaSpec UV- 1700) et les résultats sont exprimés en mg. g<sup>-1</sup> MS grâce à une gamme étalon d'amylose réalisée en parallèle de 0 à 1 mg. mL<sup>-1</sup> dans du DMSO / HCl.

## 3. Dosage des glucides solubles totaux

Le surnageant de première centrifugation indiqué dans le paragraphe précédent est utilisé pour ce dosage à raison de 200 µL qui sont mélangés à 1 mL de réactif à l'antrone (Saladin *et al.*, 2003b). Le réactif est composé de 0,184 % (p/v) d'antrone et de 0,184 % (p/v) de thio-urée (stabilisateur) dans de l'acide sulfurique à 70 % (v/v). Le mélange est incubé 10 min au bain-marie à 100°C puis l'absorbance est lue à 625 nm au spectrophotomètre UV- visible (Shimadzu, PharmaSpec UV- 1700). Les résultats sont exprimés en µmol. g<sup>-1</sup> MS grâce

à une gamme étalon de glucose réalisée en parallèle de 0 à 1  $\mu\text{mol. mL}^{-1}$  dans du tampon phosphate de potassium 0,1 M à pH 7,5.

### III. Paramètres d'évaluation du métabolisme azoté

#### 1. Dosage des acides aminés libres totaux

Après la première centrifugation (paragraphe II.2.), une partie du surnageant servant au dosage des glucides totaux est mélangée avec de l'acide trichloroacétique (TCA) à 30 % (p/v) pour une concentration finale de TCA de 10 % afin de précipiter les protéines pouvant interférer avec le dosage (Magné et Larher, 1992 ; Saladin *et al.*, 2003b). Le mélange est centrifugé 10 min à 10000 *g* et 4°C et le surnageant sert à doser les acides aminés, la proline libre, les groupes thiols non protéiques et les substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS pour ThioBarbituric Acid Reactive Substances). Pour les acides aminés, 200  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont mélangés avec 200  $\mu\text{L}$  de réactif à la ninhydrine et 100  $\mu\text{L}$  de tampon citrate à 3,4 % (p/v) et pH 4,6. Le réactif, préparé dans du 2-méthoxyéthanol, est composé d'acide ascorbique à 0,003 % (p/v) et de 0,958 % (p/v) de ninhydrine. Le mélange est incubé 20 min au bain-marie à 100°C puis 600  $\mu\text{L}$  d'éthanol à 60 % sont ajoutés avant lecture de l'absorbance à 570 nm au spectrophotomètre UV- visible (Shimadzu, PharmaSpec UV- 1700). Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{mol. g}^{-1}$  MS grâce à une gamme étalon de leucine réalisée en parallèle de 0 à 0,5  $\mu\text{mol. mL}^{-1}$  dans du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,5.

#### 2. Dosage de la proline libre

Un volume de 200  $\mu\text{L}$  d'échantillon est mélangé avec 800  $\mu\text{L}$  de réactif composé de ninhydrine à 1 % (p/v) dans de l'acide acétique à 60 % (v/v) (Magné et Lahrer, 1992 ; Saladin *et al.*, 2003b). Le mélange est chauffé 20 min à 95°C au bain-marie puis additionné de 1 mL de toluène. Après agitation vigoureuse, les tubes sont laissés au repos au moins 4 h à température ambiante pour permettre une bonne séparation des phases. La phase supérieure contenant la proline est prélevée et l'absorbance est lue à 520 nm au spectrophotomètre UV- visible (Shimadzu, PharmaSpec UV- 1700). Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{mol. g}^{-1}$  MS grâce à une gamme étalon de proline réalisée en parallèle de 0 à 1  $\mu\text{mol. mL}^{-1}$  dans du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,5.

### **3. Dosage des protéines solubles totales**

Une quantité de 500 mg de MF est broyée à 4°C avec 1,5 mL de tampon d'extraction à pH 7,5 composé de Tris-Base 0,1 M, 1 mM d'EDTA et 1 mM de dithiothréitol (DTT) (Moussavou Moudouma *et al.*, 2013). Le DTT est un réducteur des ponts disulfures et va permettre de stabiliser la conformation des protéines. Le broyat est centrifugé à 4°C et 13000 g pendant 20 min. Le surnageant est déposé dans des tubes à ultrafiltration Amicon Ultra (Ultracel-10K, Millipore) possédant une membrane de porosité 10 kDa qui retient et concentre les protéines au-dessus de la membrane après centrifugation (20 min à 4°C et 5000 rpm) tout en éliminant les sels et autres petites molécules qui pourraient interférer avec les mesures. L'extrait protéique est récupéré et ajusté à 500 µL avec du tampon d'extraction. Le dosage est réalisé à l'aide du réactif Bio-Rad Protein Assay (BioRad, Munich, Allemagne) selon les instructions du fournisseur. Après 10 min, l'absorbance est lue à 595 nm au spectrophotomètre UV- visible (Shimadzu, PharmaSpec UV- 1700) et les résultats sont exprimés en mg. g<sup>-1</sup> MS grâce à une gamme étalon d'albumine de sérum bovin (BSA) réalisée en parallèle de 0 à 1 mg. mL<sup>-1</sup> dans du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,5.

### **IV. Évaluation du niveau d'oxydation (dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique)**

Les extraits correspondent aux mêmes surnageants que ceux ayant servi à doser notamment les acides aminés totaux. Le dosage est réalisé en mélangeant 500 µL de surnageant avec 500 µL de réactif composé de TCA à 20 % (p/v) et d'acide 2-thiobarbiturique (ATB) à 0,5% (p/v) (Saladin *et al.*, 2003b). Le mélange est incubé 30 min à 100°C au bain-marie puis centrifugé 10 min à 5000 g et 20°C. Le surnageant est récupéré et son absorbance mesurée au spectrophotomètre UV- visible (Shimadzu, PharmaSpec UV- 1700) à 532 nm et 600 nm (absorption non-spécifique). Les résultats sont exprimés en µmol. g<sup>-1</sup> MS grâce au coefficient d'extinction du complexe TBARS-ATB qui est de 155 mM<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup>.

## V. Dosage de molécules intracellulaires impliquées dans le piégeage du cadmium

### 1. Dosage des groupes thiols totaux non protéiques

Les groupes thiols (SH) sont présents au niveau de la cystéine libre et dans des oligopeptides (glutathion, phytochélatines) ou les protéines. Ce dosage est une estimation rapide et globale des thiols non protéiques qui ne permet pas de distinguer le glutathion des phytochélatines et des précurseurs (cystéine et glutamylcystéine), les précurseurs étant cependant assez minoritaires par rapport au glutathion et aux phytochélatines. Après précipitation des protéines résiduelles au TCA et centrifugation (paragraphe III.1.), 100  $\mu\text{L}$  de surnageant sont mélangés avec 100  $\mu\text{L}$  de triéthanolamine à 50 % (p/v) dans de l'eau (afin de neutraliser l'acidité du TCA) et 700  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate de potassium à 0,1 M et pH 7,5 contenant 6,3 mM d'acide diéthylènetriamine-pentaacétique (DTPA) (Gorinova *et al.*, 2007). Le DTPA chélate les ions  $\text{Cd}^{2+}$  et libère les groupes thiols pour le dosage. Après 10 min à température ambiante, 50  $\mu\text{L}$  de réactif sont ajoutés, réactif composé d'acide 5,5'-dithiobis-2-nitro-benzoïque (DTNB) à 10 mM dans du tampon phosphate / DTPA. Ce réactif oxyde les groupes thiols pour donner l'acide 2-nitro-5-mercaptobenzoate, un composé jaune dont l'absorbance est lue à 412 nm (spectrophotomètre UV- visible Shimadzu, PharmaSpec UV-1700) après 5 min à température ambiante (figure 43). Les résultats sont exprimés en  $\text{nmol. g}^{-1}$  MS grâce à une gamme étalon de cystéine réalisée en parallèle de 0 à 500  $\text{nmol. mL}^{-1}$  dans du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,5.

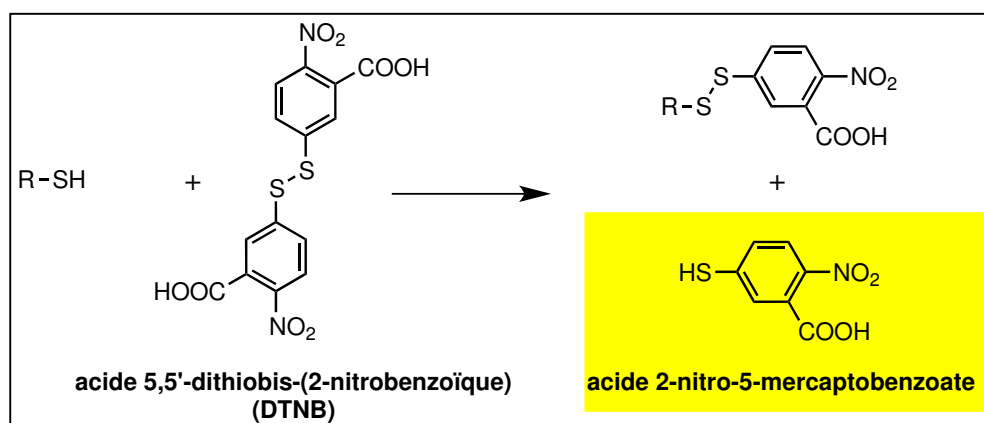


Figure 43. Réaction du DTNB avec les fonctions thiols.

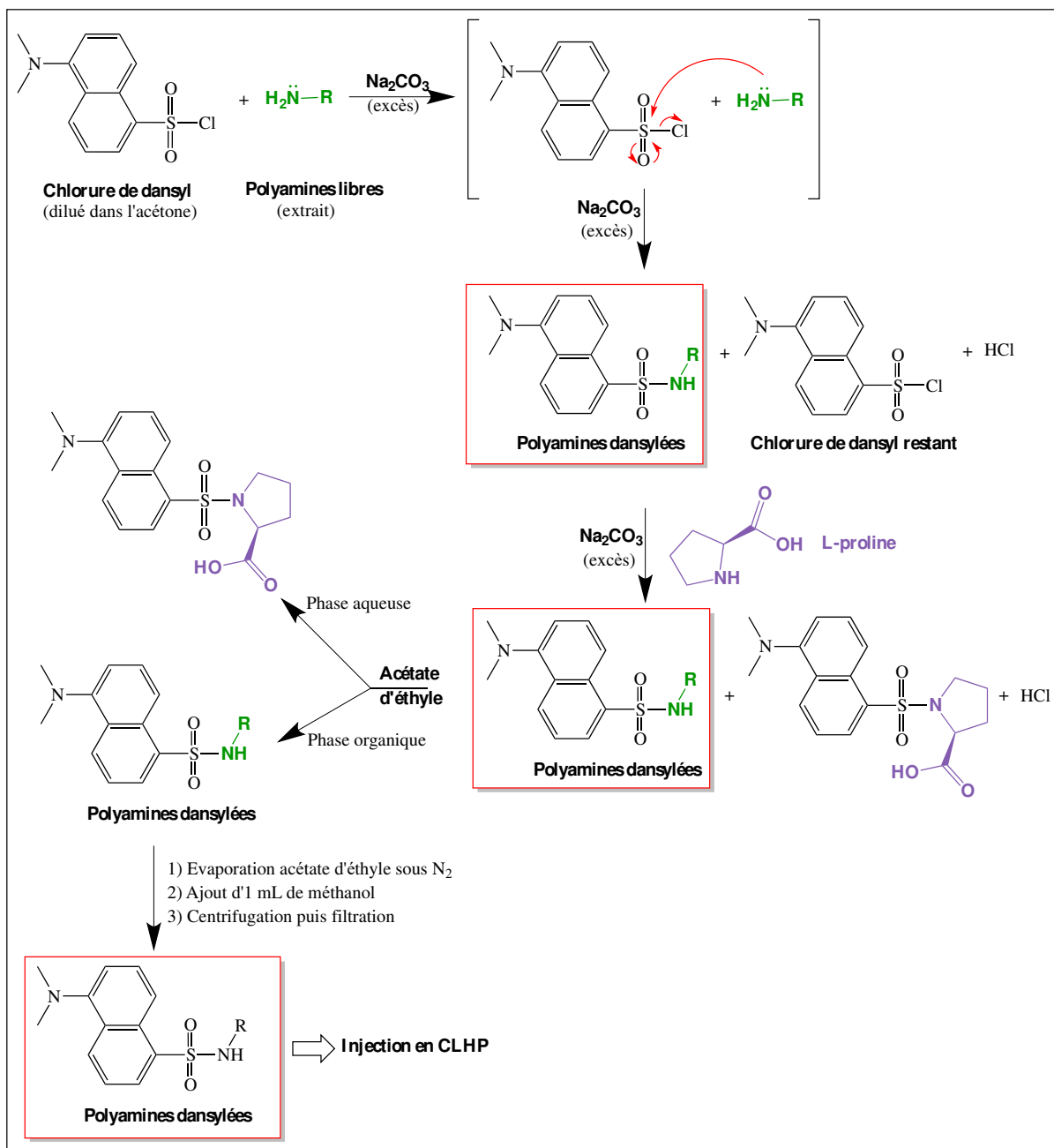
## **2. Dosage des polyamines libres**

### **2.1. Extraction**

Les aiguilles ou racines (200 mg de MF) sont broyées à l'azote liquide puis le broyage se poursuit par ajout de 0,5 mL d' $\text{HClO}_4$  à 4 % (v/v) contenant 5 mg.  $\text{L}^{-1}$  de 1,7-diaminoheptane (1,7-DAH) utilisé comme standard interne. Les échantillons sont ensuite mélangés fortement pendant environ 10 s et placés sous agitation à 4°C pendant 1 h de façon à laisser le broyat en contact avec l'acide. Après centrifugation (12000 g, 4°C, 20 min), les surnageants sont transférés dans des tubes de 1,5 mL tandis que les culots sont remis en suspension avec 0,5 mL d' $\text{HClO}_4$  pour une nouvelle extraction (répétition des étapes d'extraction décrites au début de ce paragraphe). Les deux surnageants sont mélangés et constituent l'extrait total à doser. Les extraits sont conservés à - 20°C jusqu'à leur dansylation.

### **2.2. Dansylation**

Pour pouvoir être détectables et quantifiables en CLHP (Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance), les polyamines doivent subir une réaction de dansylation selon le protocole modifié de Smith et Davies (1985). Les étapes de préparation des polyamines dansylées sont résumées dans la figure 44.



**Figure 44.** Mécanisme de la réaction de dansylation des polyamines libres et principe de séparation des polyamines dansylées.

Dans un tube à essai de 2 mL sont introduits successivement 200  $\mu\text{L}$  d'échantillon, 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaCO}_3$  saturé puis 500  $\mu\text{L}$  de chlorure de dansyl (dilués à raison de 20  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  dans de l'acétone). Les échantillons sont homogénéisés vigoureusement pendant 10 s puis incubés tubes ouverts à l'étuve à 60°C pendant 1 h à l'obscurité. Afin d'éliminer le chlorure de dansyl en excès, 250  $\mu\text{L}$  de L-proline (à 150  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) sont ajoutés puis les tubes sont vigoureusement agités pendant 10 s et stockés à l'obscurité pendant 1 h à température ambiante. Les échantillons



sont alors séchés sous azote pendant environ 30 min à 30°C pour évaporer l'acétone. Un volume d'1 mL d'acétate d'éthyle pur est ajouté ensuite pour extraire les polyamines dansylées et le tout est mélangé vigoureusement pendant 1 min. Les échantillons sont ensuite placés à 4°C pendant 20 min jusqu'à l'obtention d'une bonne séparation entre la phase supérieure blanche organique (fraction acétate d'éthyle contenant les polyamines dansylées) et la phase inférieure aqueuse jaune. La phase organique est alors isolée dans un nouveau tube à essai puis séchée sous azote pendant 1 h à 30°C. Les résidus secs obtenus sont remis en suspension dans 1 mL de méthanol, centrifugés (12000 g, 15 min) et filtrés (filtres de porosité 0,45 µm) avant d'être injectés en CLHP.

### **3. Caractérisation et quantification**

Les polyamines dansylées sont analysées et quantifiées par CLPH (Shimadzu). La détection est réalisée par fluorimétrie à l'aide d'un détecteur à fluorescence RF 20 A (Shimadzu) aux longueurs d'ondes d'excitation et d'émission respectives de 320 et 510 nm. Un volume de 5 µL d'échantillon, de standard ou de mélange de standards dansylés est injecté. Les standards dansylés (par la même méthode décrite précédemment) de putrescine (Put), spermidine (Spd), spermine (Spm) et agmatine (Agm) de concentration connue (de 0 à 100 µM) sont d'abord injectés un à un pour connaître leur temps de rétention puis en mélange pour vérifier leur bonne séparation, et ceci toujours en présence du 1,7-DAH comme standard interne afin de vérifier le rendement d'extraction.

La colonne analytique est une colonne phase inverse Nucleodur pyramid (C18 ; 125 mm x 4,6 mm ; taille des particules 5 µm). Elle est maintenue à 40°C grâce à un four CTO 20A (Shimadzu) et l'appareil à CLPH est relié à un ordinateur qui pilote le programme de séparation grâce au logiciel « labsolutions. » Les composés dansylés sont séparés en utilisant deux solvants : un solvant A qui est de l'acétonitrile (ACN) et un solvant B qui est de l'eau déminéralisée. Les deux solvants contiennent chacun 0,1 % (v/v) d'acide trifluoroacétique (TFA). Le programme d'élution est résumé dans le tableau 18 et s'effectue à une température constante de 40°C et un débit de 1 mL. min<sup>-1</sup>.

**Tableau 18.** Programme d'élution des échantillons de polyamines dansylées.

Temps (min)	% solvant A	% solvant B
0	40	60
20	91	9
22	100	0
30	100	0

## **VI. Extraction des protéines intracellulaires et pariétales et dosage de l'activité pectine méthylestérase**

### **1. Extraction des protéines intracellulaires**

Une quantité de 1 g de MF (racines, tiges ou aiguilles) est broyée au mortier avec du sable de Fontainebleau dans de l'azote liquide. Une quantité de 50 mg de Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) est ajoutée pour piéger les polyphénols. Le broyage se poursuit avec l'ajout de 8 mL de tampon d'extraction à pH 8 constitué de 500 mM de Tris HCl (Trizma® hydrochloride, Sigma), 290 mM de saccharose, 10 mM d'EDTA, 4 mM d'acide ascorbique (agent réducteur qui empêche l'oxydation excessive des protéines), 0,4 % de  $\beta$ -mercaptoéthanol (agent réducteur employé pour éviter l'oxydation des ponts disulfures présents dans les protéines), 0,1 % de Triton X-100 (détergent utilisé pour perméabiliser les membranes cellulaires) et un inhibiteur de protéases (Protease inhibitor cocktail Tablets EASY pack, ROCHE ; 1 comprimé à dissoudre pour 50 mL de tampon d'extraction) (Marsoni *et al.*, 2005). Les échantillons sont ensuite mis sous agitation à 4°C pendant 2 h puis centrifugés (13000 g ; 20 min ; 4°C). Les surnageants contenant les protéines cytosoliques et membranaires sont récupérés pour subir 3 sonications de 20 s avec un intervalle de 10 s puis conservés à - 20°C jusqu'à leur dosage à l'aide du réactif Bio-Rad Protein Assay (cf. paragraphe III.3.). Le culot est quant à lui conservé pour en extraire les protéines pariétales.

### **2. Extraction des protéines pariétales**

Cette extraction s'effectue à partir des culots obtenus à la fin de l'extraction des protéines intracellulaires (VI.1.). Les culots sont mélangés avec 4 mL de tampon salin qui correspond au tampon d'extraction précédent (paragraphe VI.1.) mais additionné de NaCl pour une concentration finale de 1 M. Le tout est vigoureusement mélangé pendant 1 min puis placé sous agitation à 4°C pendant 2 h. Les échantillons sont ensuite centrifugés (15000 g, 15 min, 4°C) et les surnageants obtenus subissent un dessalage à l'aide de tubes à ultrafiltration Amicon

Ultra (Ultracel-10K, Millipore), de porosité 10 kDa. La centrifugation s'effectue à 4°C et 8000 g pendant 30 min. Après cette étape, les échantillons (environ 1,5 mL) sont ajustés avec du tampon d'extraction (sans NaCl) pour obtenir un volume final de 2 mL. Enfin, les protéines pariétales qui s'y trouvent (extrait enzymatique noté EE) sont dosées à l'aide du réactif Bio-Rad Protein Assay (cf. paragraphe III.3.). Cet extrait EE est celui qui sert à doser l'activité pectine méthylestérase (PME) présentée dans le paragraphe suivant.

### **3. Dosage de l'activité pectine méthylestérase**

#### **3.1. Réaction enzymatique**

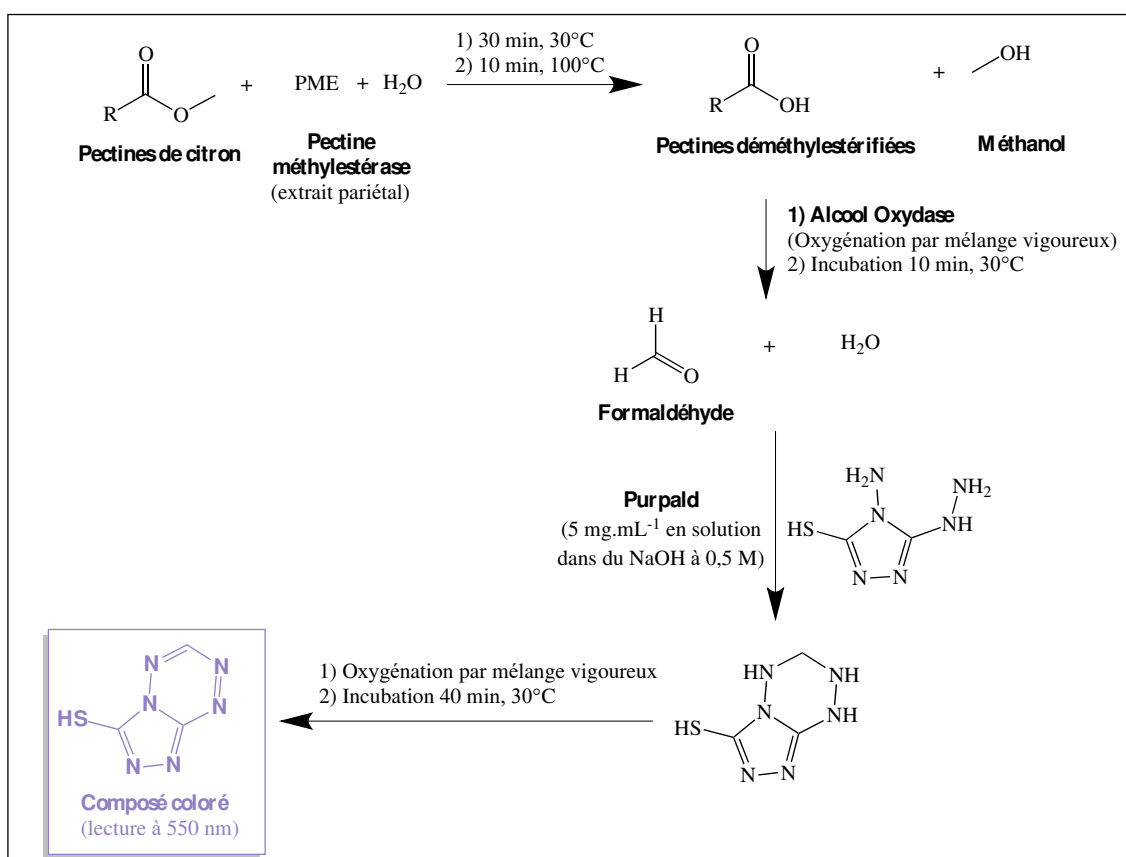
Il s'agit d'un dosage indirect consistant à mettre les pectine méthylestérases (PME ; EC 3.1.1.11) extraites en présence de leur substrat spécifique, c'est-à-dire des pectines fortement méthylestérifiées. Cette réaction entraîne une déméthylestérification et donc une libération de méthanol, lequel est ensuite dosé. Le dosage du méthanol est estimé par la transformation du méthanol en formaldéhyde par l'intermédiaire de l'alcool oxydase (Anthon et Barret, 2004 et 2008).

Un volume de 200 µL de tampon phosphate de sodium (pH 7,5 ; 100 mM) contenant 0,1 % (p/v) de pectines d'agrumes (Sigma) à fort degré de méthylestérification (DME supérieur à 85 %) est ajouté à 150 µL d'extrait enzymatique (EE). L'ensemble est ensuite incubé pendant 30 min à 30°C puis 10 min à 100°C pour arrêter la réaction. Les échantillons sont refroidis dans un bain de glace puis ramenés à température ambiante. En parallèle des échantillons, deux blancs sont réalisés et subissent la même réaction. Le blanc n°1 correspond à 150 µL de tampon phosphate de sodium et le blanc n°2 correspond à 150 µL d'EE préalablement dénaturés par chauffage au bain-marie pendant 10 min à 100°C. Les échantillons et les blancs sont centrifugés (7000 g, 10 min, température ambiante) puis le surnageant est récupéré pour doser le méthanol.

#### **3.2. Dosage du méthanol**

Un volume de 100 µL d'échantillon ou de gamme étalon de méthanol (réalisée entre 0 et 2 µg. mL<sup>-1</sup>) est mélangé avec 200 µL de tampon phosphate de potassium (pH 7 ; 200 mM) puis 100 µL d'une solution enzymatique d'alcool oxydase (EC 1.1.3.13) à 0,001 U. µL<sup>-1</sup> (Sigma) préparée extemporanément dans du tampon phosphate. Les échantillons sont agités

puis incubés à 30°C pendant 10 min. L'arrêt de la réaction se fait par refroidissement dans la glace. Il est important de respecter ce temps d'incubation de 10 min qui est la durée optimale pour oxyder le méthanol en formaldéhyde car après 10 min, le formaldéhyde est oxydé en acide formique. Les échantillons sont ensuite mélangés avec 200 µL de Purpald® (4-Amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole, 4-Amino-5-hydrazino-1,2,4-triazole-3-thiol) à 5 mg. mL<sup>-1</sup> (préparé juste avant la réaction dans de la soude à 0,5 M) puis incubés à 30°C pendant 40 min. Enfin, une étape de dilution des échantillons ou de la gamme est effectuée par ajout de 600 µL d'eau distillée. Après homogénéisation, l'absorbance est lue à 550 nm au spectromètre UV- visible (Shimadzu, PharmaSpec UV- 1700) (figure 45) et les résultats sont exprimés en nkatal. mg<sup>-1</sup> protéines pariétales.



**Figure 45.** Principe du dosage du méthanol estimé par la transformation du méthanol en formaldéhyde par l'intermédiaire de l'alcool oxydase.

## VII. Extraction et quantification des constituants pariétaux

### 1. Protocole général d'extraction des pectines

Le protocole d'extraction est une adaptation de celui d'Astier *et al.* (2014). Les échantillons végétaux secs (bois et écorces de dernière année des mélèzes cultivés sous serre) sont sous forme de poudre de granulométrie inférieure à 0,5 mm pour le fractionnement. Pour les mélèzes d'Europe et les mélèzes hybrides, la MS de départ était de 0,1 g lors de la première étape et les volumes des solutions lors des différentes étapes étaient de 40 mL. Pour les mélèzes du Japon, la MS de départ était de 0,5 g et les volumes des solutions de 200 mL. Le protocole d'extraction sélective des pectines faiblement et hautement méthylestérifiées est résumé dans la figure 46.

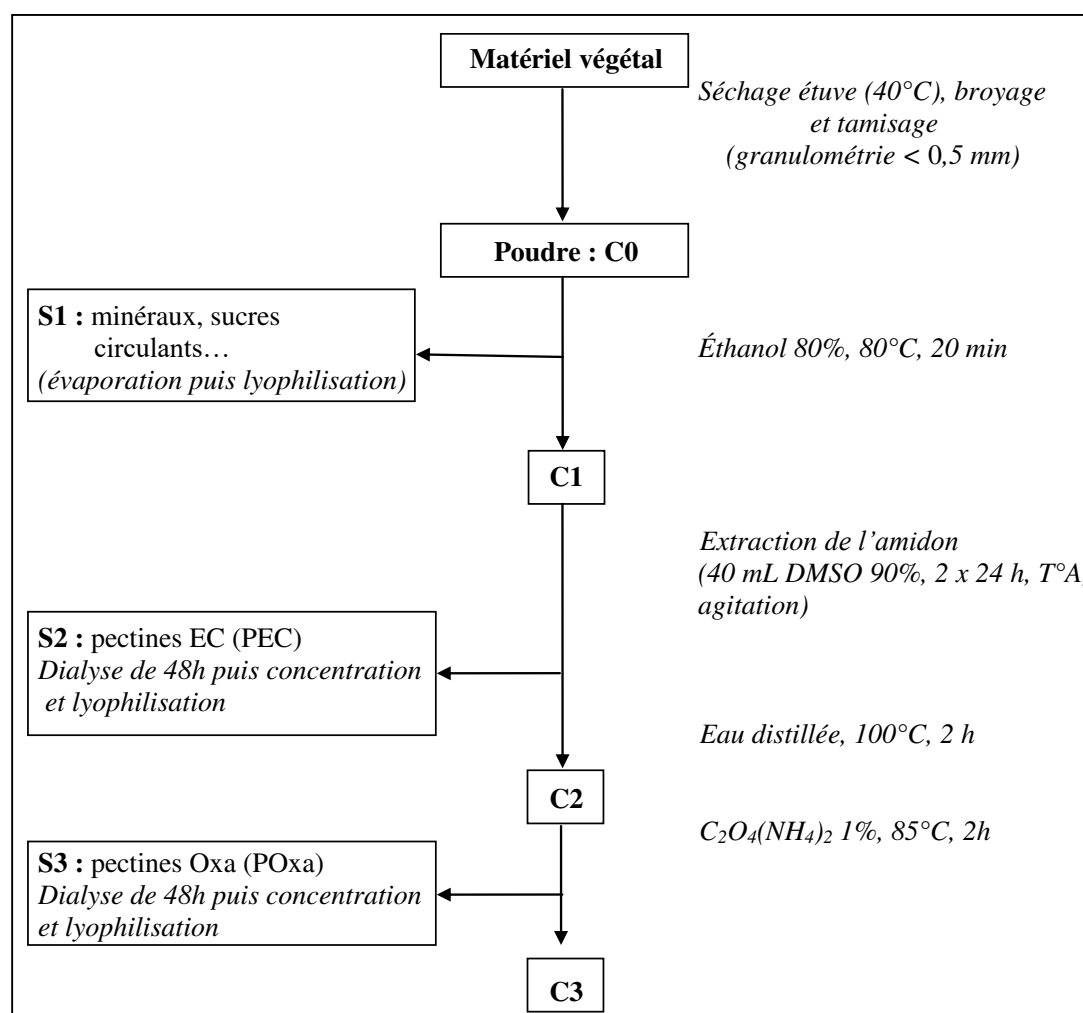


Figure 46. Étapes d'extraction des pectines du bois et des écorces de mélèzes.

### **1.1. Extraction par l'éthanol**

Le fractionnement commence une agitation à 80°C pendant 20 min de la poudre végétale (C0) avec de l'éthanol à 80 %. Le résidu C1 est récupéré par filtration de ce mélange puis est rincé avec 200 mL d'éthanol 80 %. Le filtrat S1, contenant essentiellement des composés minéraux, des sucres circulants et des tanins, est concentré puis lyophilisé pour quantifier l'extrait sec.

### **1.2. Élimination de l'amidon**

Afin de se débarrasser de la présence éventuelle d'amidon qui pourrait fausser l'analyse de la composition monosaccharidique des pectines (notamment la composition réelle en glucose), la poudre C1 est mélangée avec 40 mL de DMSO à 90 % sous agitation pendant 48 h à température ambiante, avec un renouvellement du DMSO après 24 h. La poudre C1 est abondamment rincée sur filtre à l'eau déminéralisée.

### **1.3. Extraction séquentielle des pectines**

L'extraction des pectines s'effectue en deux étapes. Tout d'abord, les pectines sont extraites à l'eau à 100°C pendant 2 h à partir du résidu C1. Après filtration et rinçage avec 200 mL d'eau distillée, cette étape conduit au résidu C2. Ensuite, ce dernier subit à son tour une extraction des pectines par une solution d'oxalate d'ammonium à 1 % (p/v) à 85°C pendant 2 h (l'oxalate d'ammonium est un chélateur de calcium qui permet de déstabiliser les structures en « boîte à œuf » et faciliter l'extraction). Après filtration et rinçage avec 200 mL d'eau distillée, cette étape conduit au résidu C3. Les filtrats S2 et S3 sont pour leur part dialysés (membrane SpectraPor avec un seuil de coupure de 6-8000 Da) contre de l'eau déminéralisée pendant 48 h (avec 3 changements d'eau par jour) afin d'éliminer les sels résiduels. Les dialysats obtenus sont alors concentrés sous pression réduite jusqu'à un volume d'environ 15 mL. Leur MS est obtenue après lyophilisation.

## **2. Méthode d'analyse des glucides**

### **2.1. Dosages colorimétriques**

La quantification associe la méthode au phénol sulfurique (Dubois, 1956) pour le dosage des oses neutres et celle au méta-hydroxydiphényl (m-HDP) de Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973) pour les acides uroniques.

#### **2.1.1. Dosage des oses neutres au phénol sulfurique**

Un volume de 200  $\mu\text{L}$  d'échantillon ou de gammes étalons de galactose (0 à 100  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ) et d'acide galacturonique (0 à 200  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ) est mélangé avec 200  $\mu\text{L}$  d'une solution aqueuse de phénol à 5 % (v/v). Le mélange est homogénéisé au vortex puis 1 mL d'acide sulfurique concentré est rapidement introduit dans le milieu réactionnel. Après homogénéisation, le mélange est porté au bain-marie à 100°C durant 5 min. Les tubes sont refroidis dans un bain de glace puis placés à l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre UV- visible (Shimadzu, PharmaSpec UV- 1700) à 492 nm.

#### **2.1.2. Dosage des acides uroniques**

Un volume de 200  $\mu\text{L}$  d'échantillon ou de gammes étalons de galactose (0 à 500  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ) et d'acide galacturonique (0 à 100  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ) est mélangé avec 1,25 mL d'une solution de tétraborate de sodium à 0,0125 M préparée dans de l'acide sulfurique concentré. Le mélange est homogénéisé au vortex puis les tubes sont portés à 100°C au bain-marie durant 5 min. Après refroidissement dans un bain de glace, 20  $\mu\text{L}$  d'une solution de métahydroxydiphényle (m-HDP) sont ajoutés. La solution de m-HDP est à 0,15 % (p/v) dans une solution de soude à 0,5 % (p/v). Les tubes sont agités puis placés à l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre UV- visible (Shimadzu, PharmaSpec UV- 1700) à 520 nm.

#### **2.1.3. Méthode de correction pour quantifier les oses neutres et les acides uroniques**

Des interférences liées à la présence d'acides uroniques nécessitent d'appliquer la méthode de correction proposée par Montreuil *et al.* (1963) qui permet d'établir les quantités relatives d'oses neutres et d'acides uroniques par combinaison des résultats obtenus lors des deux précédents dosages selon les équations suivantes :

$$\begin{aligned} \text{DO}_{492} &= \alpha \times [\text{ON}] + \beta \times [\text{AU}] & [\text{ON}] &= [\text{DO}_{492} - \beta [\text{AU}]] / \alpha \\ \text{DO}_{520} &= \alpha' \times [\text{ON}] + \beta' \times [\text{AU}] & [\text{AU}] &= [\text{DO}_{520} - \alpha' / \alpha \text{ DO}_{492}] / [(\alpha \beta' - \alpha' \beta) / \alpha] \end{aligned}$$

Avec :

- [ON] : concentration en oses neutres (en  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ )
- [AU] : concentration en acides uroniques (en  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ )
- $\text{DO}_{492}$  et  $\text{DO}_{520}$  : densité optique de l'échantillon lue à 492 nm et à 520 nm
- $\alpha$  : pente de la droite étalon de galactose obtenue par dosage d'ON
- $\alpha'$  : pente de la droite étalon de galactose obtenue par dosage d'AU
- $\beta$  : pente de la droite étalon d'acide galacturonique obtenue par dosage d'ON
- $\beta'$  : pente de la droite étalon d'acide galacturonique obtenue par dosage d'AU

Après correction des concentrations, les teneurs en oses neutres sont exprimées en  $\text{mg. g}^{-1}$  MS et les acides uroniques en pourcentage (%).

## 2.2. Détermination de la composition monosaccharidique par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Cette méthode repose sur l'obtention de méthylglycosides triméthylsilylés par méthanolyse suivie d'une *per*triméthylsilylation des monosaccharides libérés.

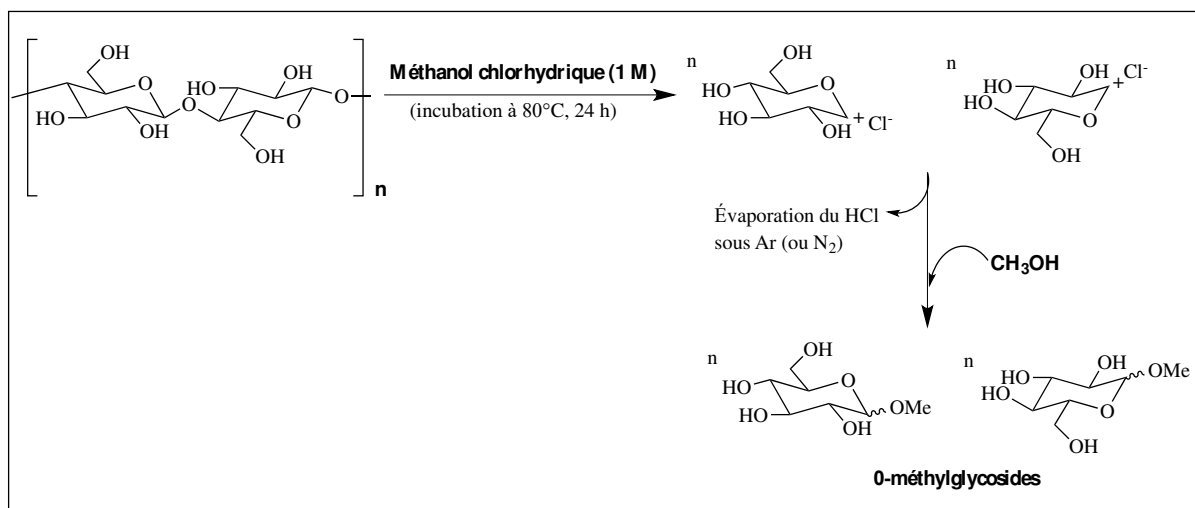
### 2.2.1. Préparation des échantillons

Les monosaccharides neutres et les acides uroniques sont identifiés et analysés sous forme de méthylglycosides O-triméthylsilylés (Kamerling *et al.*, 1975 ; Montreuil *et al.*, 1986). Cette méthode a été adaptée à l'analyse de poudres d'origine végétale (Marga *et al.*, 1995) et peut aussi être appliquée pour l'étude de la composition monosaccharidique des pectines S2 et S3 après extraction. L'analyse est effectuée sur 150  $\mu\text{g}$  de polysaccharides auxquels est ajouté un témoin interne, le méso-inositol (MI), à raison de 100  $\mu\text{L}$  de MI à 0,2  $\text{mg. mL}^{-1}$ , soit 20  $\mu\text{g}$  par échantillon. L'échantillon est ensuite lyophilisé pour l'étape suivante de méthanolyse.

### 2.2.2. Méthanolyse

Les monosaccharides sont libérés sous forme de méthylglycosides (figure 47) par ajout de 1 mL de méthanol chlorhydrique 1 M à l'échantillon polysaccharidique anhydre contenant 20  $\mu\text{g}$  de MI. Après 24 h à 80°C dans un tube scellé, la méthanolyse est stoppée par évaporation de l'hydrolysate sous un flux d'azote.



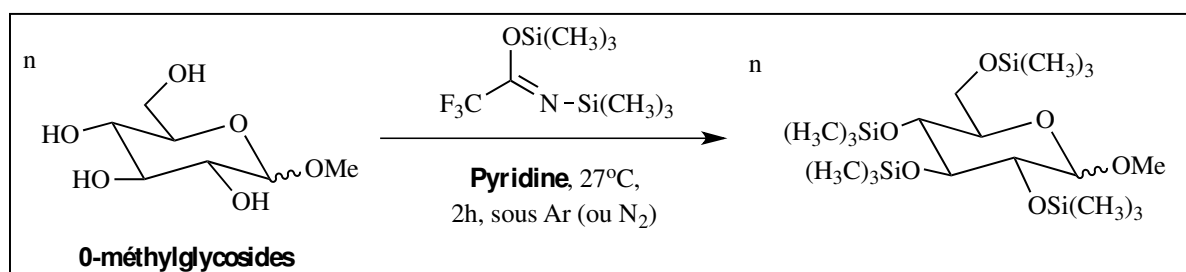


**Figure 47.** Etapes de la méthanolyse permettant d'aboutir à la formation de O-méthylglycosides.

Une fois les échantillons secs, ils sont mélangés avec 1 mL de méthanol anhydre puis 1 mL d'heptane pour éliminer les traces d'acides gras éventuellement présents. La phase supérieure (heptane + lipides) est éliminée, la phase inférieure méthanolique subit deux autres lavages successifs à l'heptane (2 fois 1 mL) puis elle est finalement séchée sous flux d'azote.

### 2.2.3. Triméthylsilylation

Les méthylglycosides sont ensuite triméthylsilylés (figure 48) par ajout dans chaque échantillon de 100  $\mu$ L de pyridine et 100  $\mu$ L de N,O-bis-triméthylsilyl-trifluoroacétamide (BSTFA) à 1 % (v/v) dans du triméthylchlorosilane (TMCS). Le mélange est ensuite incubé à l'obscurité pendant 2 h à 27 °C. Ces échantillons sont maintenus à - 22°C avant d'être injectés en CPG.



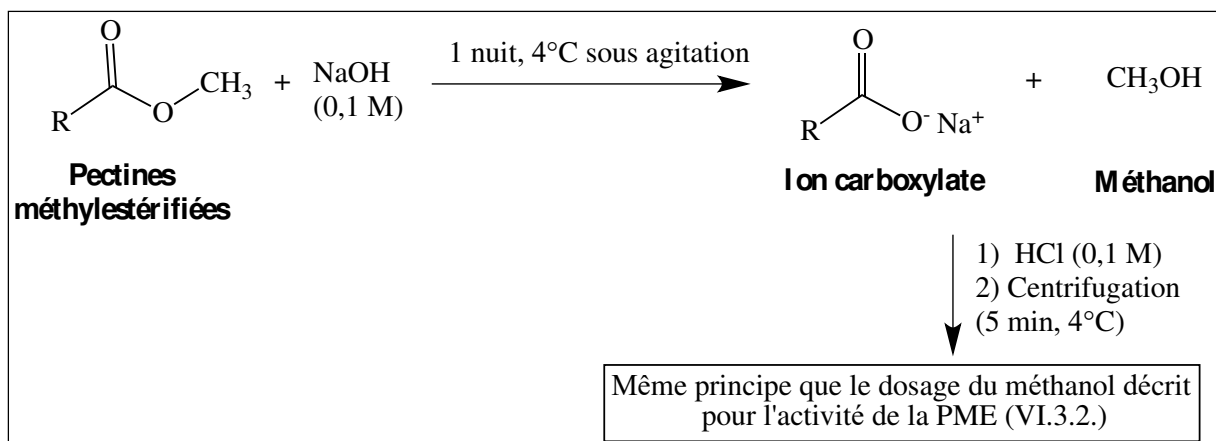
**Figure 48.** Méthode de triméthylsilylation des O-méthylglycosides.

#### **2.2.4. Identification et quantification par CPG des méthylglycosides triméthylsilylés**

Les méthylglycosides triméthylsilylés précédemment obtenus sont identifiés par comparaison avec des échantillons aux temps de rétention connus à l'aide d'un chromatographe Perichrom PR 2100 équipé d'une colonne capillaire (0,32 mm x 60 m) OPTIMA®-1-Accent 0,25 µM (Macherey-Nagel) et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Le gaz vecteur est de l'azote utilisé à une pression de 75 kPa et la température de l'injecteur est fixée à 260°C. L'élévation de la température du four est programmée de 130 à 210°C à raison de 2°C. min<sup>-1</sup> avec un palier de 5 min à 190°C, puis de 210 à 260°C à raison de 5°C. min<sup>-1</sup>. Le chromatographe est piloté par le logiciel Winilab III (Perichrom). Les résultats sont exprimés en pourcentage molaire après correction des aires des pics chromatographiques par les facteurs de correction.

#### **2.3. Évaluation du degré de méthylestérification des pectines par le dosage du méthanol**

Afin de déterminer le DME des pectines, un dosage biochimique du méthanol est estimé par la transformation du méthanol en formaldéhyde par l'intermédiaire de l'alcool oxydase (Anthon et Barret, 2004 et 2008) après saponification des fractions pectiques extraites S2 et S3. Une quantité de S2 ou S3 équivalente à 1 mg d'oses totaux est lyophilisée et reprise par 100 µL de soude à 0,1 M afin de saponifier les fonctions ester (figure 49). La suspension (après lyophilisation, une partie des pectines n'est plus soluble) est maintenue sous agitation à 4°C pendant une nuit. Après neutralisation de la soude en excès par ajout de 100 µL d'acide chlorhydrique à 0,1 M, les particules en suspension sont éliminées par centrifugation (12000 g, 5 min, 4°C). Le surnageant constitue l'échantillon à doser (voir le dosage du méthanol en VI.3.2). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la quantité molaire de méthanol par rapport à la quantité molaire d'acide galacturonique de l'extrait obtenu par CPG.



**Figure 49.** Principe de saponification des pectines méthylestérifiées afin de libérer et quantifier le méthanol (estimation du DME).

#### 2.4. Évaluation du degré de méthylestérification des pectines par infrarouge

Une seconde méthode faisant appel à la spectroscopie infrarouge (IR) a été employée pour caractériser le DME des pectines de bois et d'écorces. Cette méthode est adaptée de celles de Chatjigakis *et al.* (1998) et Manrique et Lajolo (2002). Elle consiste à localiser des bandes de vibration émises par des fonctions spécifiques d'intérêt. Dans notre étude, nous nous intéressons au signal issu des carbonyles des fonctions acide carboxylique, ester et carboxylate. Leurs signaux respectifs bien que dépendant de leur environnement chimique, se situent selon Pretsch *et al.* (2009) à :

- 1750-1735  $\text{cm}^{-1}$  : C=O (ester aliphatique)
- 1725-1700  $\text{cm}^{-1}$  : C=O (acide carboxylique)
- 1550-1630  $\text{cm}^{-1}$  : C=O (carboxylate)

Des quantités appropriées d'acide galacturonique (DME de 0 %) et de pectines d'agrumes (DME de 85 %) commerciaux ont été mélangées afin d'obtenir un échantillon standard ayant un DME de 21,25 %. Les pectines de DME connu ainsi que les fractions pectiques S2 et S3 (extraites selon le protocole décrit dans le paragraphe V.1.3) sont solubilisées dans de l'eau ultra pure. Considérant que le pKa de l'acide polygalacturonique est de 3,38 (Ravanat et Rinaudo, 1980), le pH des échantillons et des standards a été ajusté à pH 6 avec une solution de KOH (0,1 M) afin de garantir l'ionisation totale des fonctions acide carboxylique en fonctions carboxylate. En effet, le groupe qui apparaît à environ 1740  $\text{cm}^{-1}$  peut être attribué non seulement à la vibration des fonctions carbonyle (C=O) des fonctions acide carboxylique

méthylestérifiées (COOCH<sub>3</sub>) mais aussi des acides carboxyliques (COOH). Par cette procédure, nous nous assurons alors de caractériser à 1740 cm<sup>-1</sup> exclusivement la fonction C=O des carboxyles méthylestérifiés. Une fois le pH ajusté à 6, les échantillons sont congelés puis lyophilisés. Des pastilles constituées de 180 mg de KBr et 2 mg d'échantillon (gamme ou échantillons pectiques de DME inconnu) sont placées dans le faisceau d'un spectromètre Perkin Elmer (spectrum 1000) à transformée de Fourier puis les spectres IR obtenus sont analysés sur une gamme de nombres d'ondes compris entre 500 et 4000 cm<sup>-1</sup>.

Dans ces conditions expérimentales, la bande à 1630 cm<sup>-1</sup> correspond à la vibration des fonctions carboxylate COO<sup>-</sup> (originaires des acides galacturonique non méthylestérifiés) tandis que la seconde bande à 1740 cm<sup>-1</sup> est attribuée à celle des carbonyles des acides galacturoniques méthylestérifiés. La détermination du DME des échantillons s'effectue grâce à la droite obtenue à partir des échantillons standards de DME connu et selon l'équation suivante :

$$\text{DME} = \alpha [\text{A}_{1740} / (\text{A}_{1740} + \text{A}_{1630})]$$

Avec :  $\text{A}_{1740}$  : aire du pic à 1740 cm<sup>-1</sup>.

$\text{A}_{1630}$  : aire du pic à 1630 cm<sup>-1</sup>.

$\alpha$  : coefficient directeur de la droite d'étalonnage.

## VIII. Dosage du cadmium dans les plantes et les substrats de culture

### 1. Préparation des échantillons

La spectrométrie d'absorption atomique (SAA) permet de doser les éléments métalliques en solution. Ainsi, les échantillons à doser doivent subir une minéralisation à partir de matière sèche réduite en poudre. Concernant les plantules de mélèze hybride issues de culture *in vitro*, la répartition du Cd a également été déterminée dans les compartiments pariétaux et intracellulaires.

#### 1. 1. Obtention des fractions intracellulaires et pariétales

L'obtention des fractions est réalisée selon le protocole modifié de Fernández *et al.* (2014). Toutes les étapes se déroulent à température ambiante et les centrifugations sont de 20 min à 8 000 g et 20°C. La MF (100 mg de racines ou 200 mg de parties aériennes) est broyée dans 5 mL d'eau déminéralisée puis le mélange est centrifugé. Le surnageant est conservé (il correspond à la majorité du contenu intracellulaire) et le culot est repris successivement sous agitation dans 10 mL d'éthanol à 80 % pendant 1 h, 10 mL de chloroforme / méthanol (2:1 v/v)

pendant 15 min puis 2 fois dans 10 mL d'acétone pendant 15 min. Entre chaque étape, le surnageant est conservé et rajouté au premier pour constituer la fraction intracellulaire totale. Celle-ci est réduite à l'évaporateur rotatif à un volume final de 3 mL. Le culot restant est rincé à l'acétone, filtré sur nylon (porosité 11  $\mu\text{m}$ ) puis séché à l'étuve à 80°C pendant 24 h. Il est ensuite pesé et constitue la fraction pariétale. La masse de fraction intracellulaire est calculée en faisant la différence entre la MF initiale et la masse pariétale.

## **1.2. Obtentions des différentes fractions du sol**

Préalablement à toute analyse, le substrat a été séché à l'étuve ventilée (40°C) puis tamisé à une granulométrie inférieure à 2 mm. Par la suite, quatre préparations ont été réalisées afin de caractériser les substrats utilisés pour les cultures en serre et déterminer soit leur teneur totale en Cd, soit déterminer la disponibilité du Cd dans le sol :

- Extraction du Cd total présent dans le substrat. Pour ce faire, une quantité de 0,5 g a été pesée puis minéralisée. La quantité de Cd présente dans le minéralisat est déterminée par SAA en mode flamme (paragraphe VII.3.1.)
- Extraction au  $\text{CaCl}_2$ . Elle correspond au Cd faiblement lié aux particules du sol (donc facilement phytodisponible).
- Extraction au Rhizo-A. Elle mime les acides libérés par des exsudats racinaires et correspond à du Cd rendu phytodisponible par action de la plante.
- Extraction à l'EDTA. Elle correspond au Cd fortement lié à la matière organique du sol.

### **1.2.1. Extraction au $\text{CaCl}_2$**

Dix grammes de sol sont mélangés sous agitation avec 25 mL d'une solution aqueuse de  $\text{CaCl}_2$  à 10 mM pendant 3 h à température ambiante (Novozamsky *et al.*, 1993). Après centrifugation (5 min à 7000 g), les surnageants sont à nouveau centrifugés à 7000 g pendant 20 min afin d'éliminer les dernières particules en suspension. Après minéralisation, la concentration en Cd des surnageants est ensuite déterminée par SAA en mode four (paragraphe VII.3.2.) en utilisant 5 mL de surnageant.

### **1.2.2. Extraction au Rhizo-A**

Une quantité de 1,5 g de sol est mélangée sous agitation à 15 mL de solution de Rhizo-A pendant 16 h à température ambiante (Feng *et al.*, 2005). Le Rhizo-A est un mélange d'acides à 0,1 M composé d'acides acétique, lactique, citrique, malique et formique à un ratio 4/2/1/1/1 (soit 44,44 mM d'acide acétique, 22,22 mM d'acide lactique et 11,11 mM d'acides citrique, malique et formique). Après centrifugation (5 min à 7000 g), les surnageants sont à nouveau centrifugés à 7000 g pendant 20 min afin d'éliminer les dernières particules en suspension. Après minéralisation, la concentration en Cd des surnageants est ensuite déterminée par SAA en mode four (paragraphe VII.3.2.) en utilisant 5 mL de surnageant.

### **1.2.3. Extraction par l'EDTA**

Une quantité de 1,5 g de sol est mélangée sous agitation à 15 mL de solution d'EDTA à 50 mM neutralisée à pH 7 par ajout d'ammoniaque (20 %) pendant 1 h à température ambiante (Wear et Evans, 1968). La suspension est ensuite placée sous agitation magnétique à température ambiante pendant 1 h. Après centrifugation (5 min à 7000 g), les surnageants sont à nouveau centrifugés à 7000 g pendant 20 min afin d'éliminer les dernières particules en suspension. Après minéralisation, la concentration en Cd des surnageants est ensuite déterminée par SAA en mode four (paragraphe VII.3.2.) en utilisant 5 mL de surnageant.

## **2. Méthodes de minéralisation**

### **2.1. Minéralisation micro-ondes**

Cette méthode nécessite une masse d'échantillon sec de 250 à 500 mg. Elle a été utilisée pour quantifier le Cd dans le sol brut, les fractions de sol (extractions CaCl<sub>2</sub>, Rhizo-A et EDTA), dans les fractions intracellulaires et pariétales du mélèze hybride cultivé *in vitro*, dans les organes des mélèzes de 3 ans (sauf les écorces et bois de la dernière année de croissance) et dans les plantules en serre. Pour les plantules en serre, lorsque la MS disponible n'atteignait pas 500 mg, une quantité de 250 mg a été utilisée.

Pour la minéralisation avec 500 mg de MS, les échantillons végétaux et le sol brut sont placés dans les tubes du minéralisateur puis sont additionnés de 6 mL d'acide nitrique à 68 % (qualité Normapur) et 2 mL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30 %. Les volumes d'acide nitrique et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ont été

divisés par deux pour la minéralisation des fractions intracellulaires et pariétales (mélèze hybride cultivé *in vitro*) et pour les organes des plantules en serre lorsque la MS utilisée était de 250 mg. Concernant les différentes fractions de sol, 5 mL de surnageant sont introduits dans les tubes puis sont ajoutés 5 mL d'acide nitrique et 2 mL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les réacteurs sont ensuite placés dans un minéralisateur à micro-ondes (Multiwave 3000, Anton Paar, Perkin Elmer) pour subir un programme de chauffage en quatre phases :

- phase 1 : 200 W pendant 1 min.
- phase 2 : de 200 à 500 W en 15 min puis un plateau de 5 min.
- phase 3 : de 500 à 850 W en 10 min puis un plateau de 15 min.
- phase 4 : de 850 à 0 W en 15 min.

Au cours de la minéralisation, la pression et la température maximales sont respectivement de 60 bars et 260°C. Les échantillons sont ensuite récupérés dans des tubes gradués et le volume final est ajusté avec de l'eau ultra-pure à :

- 10 mL pour les organes végétaux,
- 5 mL pour les fractions intracellulaires et pariétales (mélèze *in vitro*) et pour les plantules lorsque la MS initiale était de 250 mg,
- 12 mL pour le sol brut et les différentes fractions extraites à partir de sol et le sol brut.

Les minéralisats sont ensuite dosés au SAA à flamme selon la méthode décrite au paragraphe VII.3.1.

## **2.2. Micro-minéralisation**

Ce protocole a été mis au point pour déterminer la concentration en éléments traces lorsque la quantité de biomasse disponible est limitée (Bonet *et al.*, 2016). Il permet de réaliser une minéralisation avec une MS de 50 mg. Il a utilisé pour les plantules de Douglas ayant poussé sur les sols multipollués L et P ainsi que pour le bois et les écorces de la dernière année de culture en serre des mélèzes.

Une quantité de 50 mg de MS est introduite dans des tubes en verre borosilicaté puis 2 mL d'acide nitrique concentré (68 %, qualité Normapur) sont ajoutés et chaque tube bouché

hermétiquement. L'acide est laissé à agir pendant 9 h à température ambiante puis les tubes sont placés à l'étuve à 80°C pendant 48 h. Les échantillons sont ensuite mis à refroidir sous une hotte aspirante puis débouchés délicatement pour éviter les éventuelles projections d'acide dues à la pression à l'intérieur des tubes. Un volume de 2 mL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30 % est ensuite ajouté et les tubes sont laissés pendant 9 h à température ambiante. Pendant cette dernière étape, les tubes ne sont pas fermés hermétiquement afin d'éviter leur explosion sous la pression exercée par la réaction du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec les échantillons. Les échantillons sont ensuite récupérés comme pour la méthode de minéralisation micro-onde avec un ajustement du volume final à 5 mL.

### **3. Dosage des ET par spectrométrie d'absorption atomique**

#### **3.1. Dosage du Cd en mode flamme**

La concentration en Cd dans les minéralisats est estimée par dosage au spectromètre d'absorption atomique (SAA) en mode flamme (AAAnalyst 400, Perkin Elmer). La flamme est formée à partir d'un mélange oxy-acétylénique et atteint une température de 2100°C. L'appareil mesure une absorbance qui permet de doser le nombre de particules dans la flamme et donc la concentration de l'élément suivant une formule proche de la loi de Beer-Lambert :  $A = k \times l \times C$  où A correspond à l'absorbance, k au coefficient d'absorption de l'élément à doser, l au parcours optique dans le brûleur et C à la concentration de la solution en mol. L<sup>-1</sup>.

Le dosage est effectué à la longueur d'onde correspondant à la raie de résonance (la plus intense du spectre) et implique par conséquent d'utiliser une gamme adaptée. Ainsi, la gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution commerciale standardisée de Cd à 1000 ppm et est comprise entre 0 et 3 ppm. L'intensité de la lampe à Cd est de 4 mA et la longueur d'onde de 228,8 nm. Les résultats sont exprimés en µg. g<sup>-1</sup> MS.

#### **3.2. Dosage du Cd, de l'As, du Pb et de Sb en mode four**

Le mode four est utilisé lorsque les MS sont en quantités limitantes. Il a été utilisé pour doser le Cd dans les bois et écorces de dernière année de pousses des mélèzes en serre et pour les plantules de Douglas qui ont poussé sur les sols contaminés issus d'anciens sites miniers. Le SAA en mode four graphite (Varian SpectrAA 880 Z) est équipé d'un passeur automatique (Varian GTA 100Z). Le principe du dosage est le même que celui décrit pour le dosage en mode



flamme mais avec une gamme d'étalonnage et des paramètres différents selon l'ET mesuré (tableau 19). Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g. g}^{-1}$  MS.

**Tableau 19.** Paramètres utilisés pour le dosage du Cd, de l'As, du Pb et de Sb par spectroscopie d'absorption atomique en mode four.

ET dosé	Intensité de la lampe (mA)	Longueur d'onde (nm)	Gamme d'étalonnage (ppb)
Cd	4	228,8	0 à 2
As	10	193,7	0 à 40
Pb		217,0	
Sb		217,6	0 à 50

#### 4. Détermination des teneurs totales en As, Pb et Sb des sols par spectrométrie de fluorescence à rayons X

Les teneurs totales en As, Pb et Sb des sols issus des anciens sites miniers ont été déterminées par le laboratoire GRESE (Groupement de Recherche Eau, Sol, Environnement) de Limoges par spectrométrie de fluorescence X ou analyse par fluorescence à rayons X (XRF), en utilisant un dispositif XMET 5100 commercialisé par Oxford Instruments.

## IX. Analyses statistiques

Les paramètres de croissance et les différents dosages ont été réalisés sur 4 lots indépendants pour le mélèze hybride cultivé *in vitro* et sur 3 lots indépendants pour les plantules. Pour les mesures de longueur de racines et hauteur de tige, une vingtaine de plantules a été utilisée par lot indépendant pour les cultures *in vitro* et 30 à 40 pour les plantules en serre. Pour les arbres en serre, les moyennes des différents paramètres correspondent à 10 à 15 arbres pour chaque espèce de mélèze et pour chaque condition (arbres témoins et arbres exposés au Cd).

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel PAST (PAleontological STatistics, site internet 27) développé au départ pour la paléontologie mais utilisé depuis dans de nombreuses disciplines. Pour les arbres et les plantules en serre, les résultats ont été traités par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et par un test de Tukey (pour la comparaison de paires de moyennes) avec un seuil de confiance de 95 % ( $P < 0,05$ ). Pour

l'étude *in vitro*, les résultats ont été traités par analyse de la variance à deux facteurs (two-way ANOVA), ces derniers correspondant au traitement (0, 250 et 500  $\mu\text{M}$  Cd) et à la durée d'exposition (2 et 4 semaines). Les résultats significatifs pour l'analyse à deux facteurs le sont pour des seuils de confiance allant de 95 % ( $P < 0,05$ ) à 99,9 % ( $P < 0,001$ ).



**RESULTATS**  
**ET**  
**DISCUSSION**



Les résultats obtenus au cours de la Thèse sont présentés et discutés sous forme de trois chapitres complémentaires. Nous avons choisi de débiter ce travail par une approche fondamentale puis de l'orienter vers des objectifs plus appliqués afin de qualifier, d'interpréter et de valoriser la réponse des conifères à la contamination par les éléments traces.

- ✓ Le premier chapitre est consacré aux réponses physiologiques d'un mélèze hybride (*Larix x eurolepis* Henry) cultivé *in vitro* et exposé au Cd. L'objectif était de mettre en évidence le niveau de tolérance de ce mélèze, ses réponses physiologiques, ses mécanismes de défense ainsi que la distribution du Cd dans la plante.
- ✓ Le second chapitre porte sur les réponses physiologiques de différentes espèces de conifères (le Douglas, le mélèze d'Europe, le mélèze du Japon et le mélèze hybride) exposées au Cd. La comparaison des espèces a également été entreprise dans un cadre plus appliqué qui est de tester l'efficacité de phytoextraction du Cd par ces conifères. L'étude a été menée en serre sur des plantules exposées quelques semaines au Cd et sur des arbres de deux ans (exposés pendant 9 mois) pour prendre en compte la capacité d'absorption du Cd en fonction de l'âge des plantes et de la biodisponibilité du Cd dans le substrat.
- ✓ Le troisième chapitre traite des réponses physiologiques du sapin de Douglas soumis à une pollution multi-métallique du sol. La distribution des ET dans le Douglas a également fait l'objet d'un suivi afin de déterminer l'intérêt potentiel de cette espèce en phytoextraction ou phytostabilisation. L'étude a été conduite en serre sur des plantules ayant poussé sur des sols issus d'anciens sites miniers du Limousin et d'Auvergne.



# **- CHAPITRE 1 -**

**Réponses du mélèze hybride cultivé *in vitro*  
et exposé au cadmium**





## Chapitre 1

# Réponses du mélèze hybride cultivé *in vitro* et exposé au cadmium

Ce premier chapitre est rédigé sous la forme d'une publication scientifique ayant été soumise dans *Environmental Science and Pollution Research* et intitulée « Physiological responses of the hybrid larch (*Larix x eurolepis* Henry) to cadmium exposure and distribution of cadmium in plantlets ». Les auteurs sont Amandine Bonet, Marie-Anne Lelu-Walter, Céline Faugeron, Vincent Gloaguen et Gaëlle Saladin. Ce manuscrit a été accepté le 8 Janvier 2016 (DOI: 10.1007/s11356-016-6094-6) (annexe 6).

L'étude a été menée sur des plantules de mélèze hybride (*Larix x eurolepis* Henry) cultivées *in vitro* et exposées à 250 et 500  $\mu\text{M}$  de Cd pendant 2 et 4 semaines. Ce mode de culture en conditions contrôlées permet de réduire le temps d'exposition car la croissance est optimale et le Cd très phytodisponible. Il est ainsi possible d'évaluer rapidement les réponses des plantules obtenues ainsi que leur efficacité d'accumulation du Cd. De plus, l'obtention rapide et en masse de clones conduit à une grande répétabilité expérimentale, limitant ainsi la variabilité de réponses liées aux facteurs génétiques. Cette démarche a été utilisée par Di Lonardo *et al.* (2011) qui ont testé *in vitro* une concentration de 250  $\mu\text{M}$  de Cd pendant 2 semaines sur différentes espèces de peuplier afin d'établir le niveau de tolérance et la capacité d'accumulation du Cd de chaque espèce. Cette même démarche avait auparavant été suivie par Buendia-Gonzalez *et al.* (2010) qui avaient testé *in vitro* la tolérance au Cd de jeunes germinations de *Prosopis laevigata* avec une durée d'exposition de 50 jours à 300 et 650  $\mu\text{M}$  de Cd.

Comme nous avons pu le voir dans le troisième chapitre de l'introduction bibliographique, le Cd perturbe diverses voies métaboliques et a tendance à réduire la croissance des plantes (Sandalo *et al.*, 2001 ; Sobkowiak et Deckert, 2003 ; Rodriguez-Serrano *et al.*, 2009 ; Farid *et al.*, 2013). Nous avons donc tout d'abord étudié l'effet du Cd sur la croissance des plantules de mélèze hybride (taille et biomasse) ainsi que sur les métabolismes azoté et carboné. De plus, le Cd peut induire un stress oxydant conduisant à la production

d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), lesquelles causent de nombreux dommages cellulaires, voire la mort cellulaire (Sandalio *et al.*, 2001 ; Heyno *et al.*, 2008 ; Rodriguez-Serrano *et al.*, 2009). Nous nous sommes donc intéressés dans un second temps à la réponse des plantules face au stress oxydant, notamment à travers l'évaluation du niveau de peroxydation des lipides et de la teneur en molécules connues pour jouer un rôle de défense contre l'oxydation, notamment la proline et les thiols non protéiques. Enfin, nous avons étudié la capacité d'accumulation du Cd et de son transfert vers les parties aériennes ainsi que sa distribution entre les compartiments intracellulaire et pariétal des organes souterrains et aériens.

**Environmental Science and Pollution Research**  
**Physiological responses of the hybrid larch (*Larix x eurolepis* Henry) to cadmium exposure and distribution of cadmium in plantlets**  
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	ESPR-D-15-04512R2
Full Title:	Physiological responses of the hybrid larch ( <i>Larix x eurolepis</i> Henry) to cadmium exposure and distribution of cadmium in plantlets
Article Type:	Research Article
Corresponding Author:	Gaëlle Saladin, Dr Université de Limoges Limoges, FRANCE
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Université de Limoges
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Amandine Bonet
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Amandine Bonet Marie-Anne Lelu-Walter, Dr Céline Faugeron, Dr Vincent Gloaguen, Pr Gaëlle Saladin, Dr
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	Phytoextraction of Cd is a growing biotechnology although we currently know few Cd-hyperaccumulators, i.e. plant species able to accumulate at least 0.1 mg Cd g <sup>-1</sup> dry weight in aerial organs. Owing their deep root system and high biomass, trees are more and more preferred to herbaceous species for phytoextraction. Assuming that conifers could be relevant models under cold climates, we investigated cadmium tolerance of the hybrid larch <i>Larix x eurolepis</i> Henry ( <i>L. decidua</i> × <i>L. kaempferi</i> ) and the efficiency of this species to store this metal. In vitro grown larches were chosen in order to reduce time of exposure and to more rapidly evaluate their potential efficiency to accumulate Cd. One-month-old plantlets were exposed for 2 and 4 weeks to 250 and 500 µM Cd. Results showed that they tolerated a four-week exposure to 250 µM Cd whereas the content of photosynthetic pigment strongly dropped in plantlets growing in presence of 500 µM Cd. In presence of 250 µM Cd, shoot growth slightly decreased but photosynthetic pigment and total soluble carbohydrate contents were not modified and no lipid peroxidation was detected. In addition, these plantlets accumulated proline, particularly in shoots (2 - 3 times more than control). In roots, Cd concentration in the intracellular fraction was always higher than in the cell wall fraction contrary to shoots where Cd concentration in the cell wall fraction increased with time and Cd concentration in the medium. In shoots, Cd concentration was lower than in roots with a ratio of 0.2 after 4 weeks of exposure but stayed around 0.2 mg g <sup>-1</sup> dry weight, thus a value higher than the threshold requested for Cd-hyperaccumulators. Hybrid larch would thus be a relevant candidate for field test of Cd-phytoextraction.

**Keywords**

Gymnosperm, *in vitro*, metal, phytoaccumulation, phytoextraction, phytoremediation, trace element, somatic seedling.

## INTRODUCTION

Trace elements (TE) released by many human activities progressively entered the environment to the point that they are considered as a matter of ongoing concern. Contrary to organic pollutants such as pesticides, TE are not biodegradable and thus accumulate in soils and waters with subsequent potential accumulation and poisoning along the trophic chain (Ali et al. 2013). TE can be removed from contaminated sites by phytoextraction. This ecofriendly technology consists in growing selected plant species on polluted sites (Ali et al. 2013). After plant harvest, the biomass is valorized in various sectors to reduce the cost of the process and TE can be concentrated and reused (Vigil et al. 2015). This method is less expensive than the conventional one consisting in soil excavation, remote treatment and waste management. Efficient phytoextraction requires plant species with high growth rate and biomass, deep root system, and high TE uptake capacity. In addition, these plants must be able to translocate TE to their aerial parts which can be eventually harvested and processed. Owing to their more developed root system and higher biomass, trees appear as better candidates than herbaceous species. Moreover, they can stay on the contaminated site for 3 - 5 years (short rotation coppice) without new plantings, thus reducing the cost of phytoextraction (Pulford and Watson 2003; Marmiroli et al. 2011). Among the 550-600 currently known hyperaccumulators, less than 20 % are woody species (van der Ent et al. 2012; Saladin 2015).

Cadmium is considered as one of the most toxic TE, and Cd-tolerant plants species are actually hard to find (Clemens 2006; Amouei et al. 2013). Cadmium concentrations ranging from 3 to 10 mg kg<sup>-1</sup> dry weight (DW) can cause leaf roll, chlorosis, water uptake disturbance and stomatal closure (Balsberg Pålsson 1989; Clemens 2006). Cadmium can bind to sulfhydryl groups of proteins and inactivates thiol-dependent enzymes (DalCorso et al. 2008; Farid et al. 2013). In addition, Cd exhibits chemical similarities with other divalent cations, leading to mineral deficiency. Moreover, Cd generates oxidative stress characterized by an increased production reactive oxygen species (ROS), particularly H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, that induces cell death associated with the disruption of membrane integrity (Gallego et al. 2012; Farid et al. 2013).

The term “hyperaccumulator” qualifies plants which accumulate in their aerial parts at least 1 or 10 mg of most TE per g of DW (Baker and Brooks 1989). Around 20 Cd-hyperaccumulators are currently known but the few woody species of this group grow in tropical areas, thus limiting the candidates under temperate or cold climate (Saladin 2015). An

emerging and efficient alternative for temperate climates is the use of non-hyperaccumulator trees with fast growing species such as willows or poplars (Fischerova et al. 2006; Zacchini et al. 2011; He et al. 2013). Despite the fact that these trees are well adapted to various soil conditions, their growth can be strongly reduced in cold climates or on very acidic soils in contrast to conifers. Other tree species should thus be considered to enlarge the choice in relation to climate and soil characteristics.

The aim of this work is to study the effects of Cd on the hybrid larch (*Larix x eurolepis*) physiology and to evaluate the capacity of this tree to uptake Cd and to store it in aerial organs. Somatic embryos were grown in order to obtain *in vitro* clonal plantlets (Moussavou Moudouma et al. 2013; Lelu-Walter et al. 2015). Indeed, *in vitro* model can be an interesting first step to select potential candidates as time and space for culture are reduced compared to field experiments (Di Lonardo et al. 2011). In addition, the use of clonal material avoids genetic variation and the observed effects are thus only due to the tested factors. Moreover, *in vitro* culture allows the testing of phytoextraction efficiency out of complex interferences between plants, microorganisms, climatic conditions and soil type which influence TE bioavailability (Smykalova et al. 2010; Marmioli et al. 2011). Of course, these factors have to be taken into account to evaluate the actual efficiency of phytoextraction but a first *in vitro* evaluation can be a fast tool to select plants with a long life cycle. A previous work showed that one-month-old hybrid larch plantlets tolerated a Cd concentration as high as 1.5 mM in the culture medium during one week but plantlets began to turn yellow after two weeks of treatment (Moussavou Moudouma et al. 2013). In this study we thus used lower (but still high) concentrations of 250 and 500  $\mu\text{M}$  Cd and we exposed plantlets to Cd for longer time (2 and 4 weeks) in order to assess the tolerance of hybrid larch to this TE.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Plant materials and growth conditions**

Experiments were conducted at  $24 \pm 1$  °C with the N23 embryogenic line of the hybrid larch *Larix x eurolepis* (*L. decidua*  $\times$  *L. kaempferi*) (Lelu-Walter and Pâques 2009). Embryonal masses were sub-cultured every 2 weeks in the dark at 25 °C on proliferation medium that consisted in basal MSG medium (Becwar et al. 1990) containing 1.45 g L<sup>-1</sup> L-glutamine, supplemented with 9  $\mu\text{M}$  2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2.3  $\mu\text{M}$  6-benzylaminopurine, 60

mM sucrose and solidified with 4 g L<sup>-1</sup> gellan gum. Basal MSG medium contained (per liter) 1.5 g glutamine, 0.44 g CaCl<sub>2</sub>, 2 H<sub>2</sub>O, 0.37 g MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O, 0.17 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.74 g KCl, 0.1 g KNO<sub>3</sub>, 0.1 g myo-inositol, 37.3 mg Na<sub>2</sub>EDTA, 27.8 mg FeSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O, 16.9 mg MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, 8.6 mg ZnSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O, 6.2 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.83 mg KI, 0.5 mg nicotinic acid, 0.5 mg pyridoxin-HCl, 0.25 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 2 H<sub>2</sub>O, 0.1 mg thiamine-HCl, 25 µg CuSO<sub>4</sub>, 5 H<sub>2</sub>O, and 25 µg CoCl<sub>2</sub>, 6 H<sub>2</sub>O. Maturation of the somatic embryo was obtained according to Lelu-Walter and Pâques (2009). Briefly one week after subculture on the proliferation medium, embryonal masses were first transferred in the dark to plant growth regulator-free MSG medium containing 1 % (w/v) activated charcoal, 0.1 M sucrose and solidified with 4 g L<sup>-1</sup> gellan gum. Thereafter, embryonal masses were transferred to the second maturation medium containing 0.2 M sucrose, 60 µM cis-trans (±) abscisic acid and solidified with 8 g L<sup>-1</sup> gellan gum. Light intensity was set at 20 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. After 8 weeks, cotyledonary somatic embryos were removed from the embryonal masses and transferred onto plant growth regulator-free MSG medium containing 90 mM sucrose and 4 g L<sup>-1</sup> gellan gum. Light intensity was set at 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> with a 16 h-photoperiod. Somatic embryos germinated within 1 week and then developed into plantlets (*i.e.* germinated somatic embryos with aerial parts). ABA and L-glutamine were filter-sterilized and added to cooled autoclaved media.

### **Cadmium treatment**

Four-week-old plantlets were transferred onto germination medium supplemented with 0, 250 or 500 µM CdSO<sub>4</sub> according to Moussavou Moudouma et al. (2013). Plantlets were harvested after 2 and 4 weeks of Cd treatment. Roots were incubated for 20 min in 10 mM Na<sub>2</sub>-EDTA to desorb Cd from the root surface. Root and shoot fresh biomass was frozen in liquid N<sub>2</sub> and stored at - 20 °C until analysis. Dry weights were measured on samples dried in a ventilated oven at 80 °C during 24 h.

### **Photosynthetic pigment determination**

One hundred milligrams of fresh larch needles were ground at 4 °C with 2 mL of 80 % (v/v) acetone and 0.5 % (w/v) MgCO<sub>3</sub> (Saladin et al. 2003a). After centrifugation at 4 °C for 15 min at 12 000 g, the supernatant was used to measure chlorophylls a and b as well as carotenoids by spectrophotometry at wavelengths of 663, 647 and 470 nm, respectively. Lichtenthaler equations were used to determine total chlorophyll and carotenoid levels (Lichtenthaler 1987).

### **Total soluble carbohydrate and starch determination**

Two hundred milligrams of fresh shoots and roots were ground at 4 °C with 2 mL of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5). After centrifugation at 4 °C and 12 000 g for 30 min, the supernatant was used for total soluble carbohydrate (TSC) assay whereas the pellet was dissolved at 60 °C for 30 min in 1 mL of a solution containing 8 N dimethyl sulfoxide and 37 % HCl (4:1 v/v) for starch assay. TSC and starch were quantified according to Saladin et al. (2003b and a, respectively). TSC were quantified by spectrophotometry at 625 nm after incubation at 100 °C for 10 min of 0.2 mL sample with 1 mL reagent (0.1 % anthrone and 0.1 % thiourea in 12.5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) whereas starch was quantified at 600 nm by mixing 0.1 mL sample at room temperature with 1 mL distilled water and 0.1 mL reagent (0.03 % I<sub>2</sub> and 0.06 % KI in 0.05 N HCl).

### **Total soluble protein, total free amino acid, free proline and non-protein thiol determination**

For total soluble protein assay, 200 mg of fresh shoots or roots were ground at 4 °C with 2 mL of 0.1 M Tris-Base buffer (pH 8) containing 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 5 mM EDTA (Moussavou Moudouma et al. 2013). After centrifugation at 4 °C and 12 000 g for 30 min, supernatants were concentrated with Amicon Ultra-15 centrifugal filters (Millipore Corporation, USA). Protein assay was performed on concentrated supernatants according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, Germany). For quantification of total free amino acids (TFAA), proline and non-protein thiols (NPT), 200 mg of fresh shoots or roots were ground with 2 mL of 10 % (w/v) trichloroacetic acid (TCA) containing 6.3 mM diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA). After centrifugation at 4 °C and 12 000 g for 30 min, the supernatant was used for the 3 assays. TFAA and proline were quantified according to Saladin et al. (2003b). For TFAA, 200 µL sample were mixed with 100 µL citrate buffer (0.2 M, pH 4.6) and 200 µL ninhydrin reagent (0.003% ascorbic acid and 0.96% ninhydrin in ethylene glycol monomethyl ether). After 20 min at 100 °C, 600 µL ethanol (60 %) were added and absorbance was read at 570 nm. Proline was quantified by mixing 200 µL sample with 800 µL ninhydrin reagent (1 % ninhydrin in a 60 % acetic acid solution). After 20 min at 100 °C, 1 mL toluene was added and absorbance was read at 520 nm. NPT were measured with Ellman's reagent: 100 µL of supernatant was mixed at room temperature with 100 µL triethanolamine (50 % w/v), 800 µL phosphate buffer (0.1 M, pH 7.5) containing 6.3 mM DTPA and 50 µL of



10 mM 5,5'-dithiobis-2-nitro-benzoic acid. Absorbance was read after 5 min at 412 nm and cysteine was used as a standard.

### **Quantification of thiobarbituric acid reactive substances**

The supernatant used for the assay was the same than for TFAA, proline and NPT assay. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), a byproduct of lipid peroxidation, were quantified by spectrophotometry after incubation at 95 °C for 30 min of 200 µL samples with 800 µL of 20 % (w/v) TCA containing 0.5 % (w/v) 2-thiobarbituric acid according to Saladin et al. (2003b). Absorbance was read at 532 nm and corrected by subtracting the value obtained at 600 nm (non-specific absorbance).

### **Cd quantification**

One hundred milligrams of fresh roots and 200 mg of fresh shoots were ground with 5 mL deionized water and centrifuged at 20 °C for 20 min at 8 000 g. The supernatant (S1) was stored and the pellet was successively suspended in 10 mL of 80 % ethanol for 1 h, 10 mL chloroform / methanol (2:1 v/v) for 15 min and 10 mL acetone (twice) for 15 min. After each mix, samples were centrifuged and the supernatants were added to S1. The whole extract corresponded to the intracellular fraction, which was evaporated in a rotary evaporator to a final volume of 5 mL. After the last centrifugation, the pellet was subjected to acetone rinsing and filtration on nylon mesh filter (pore size 11 µm). The residue, dried during 24 h in an oven at 80 °C, corresponded to the cell wall fraction. Cd content was measured for both intracellular and cell wall fraction according to Moussavou Moudouma et al. (2013): samples were mixed with 6 mL of 69 % nitric acid and 2 mL of 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and digested under microwave exposure (Multiwave 3000, Anton Paar, France). Cd was then quantified by flame atomic absorbance spectrometer at 228.8 nm (SpectrAA 880Z, Varian, France). In addition, we calculated the translocation factor (TF), *i.e.* the ratio of shoot (needles and stem) Cd concentration to root Cd concentration (Bonet et al. 2016).

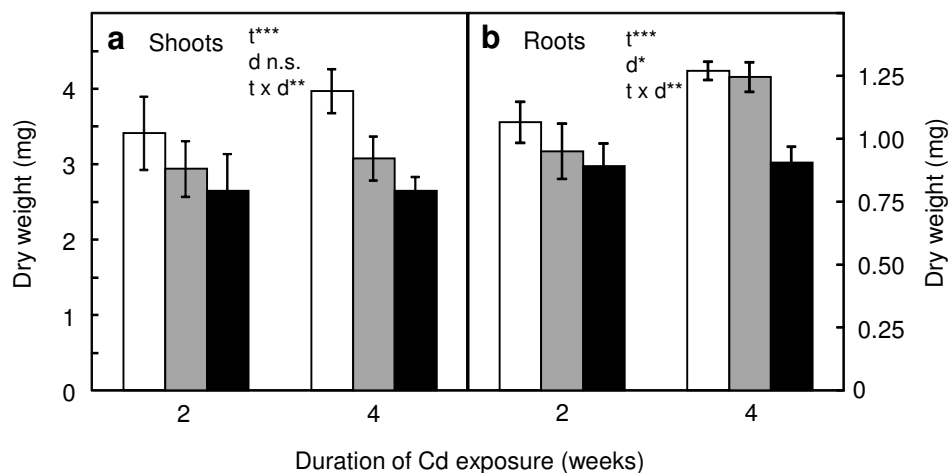
### **Statistical analyses**

All data are the mean of 4 independent experiments. Biomass measurements were done on 10 to 20 plants per independent experiment and per condition. Two-way ANOVA test was performed with PAST software (version 2.17) to analyze the effect of Cd treatment, the duration of exposure, and the interaction between both factors.

## RESULTS

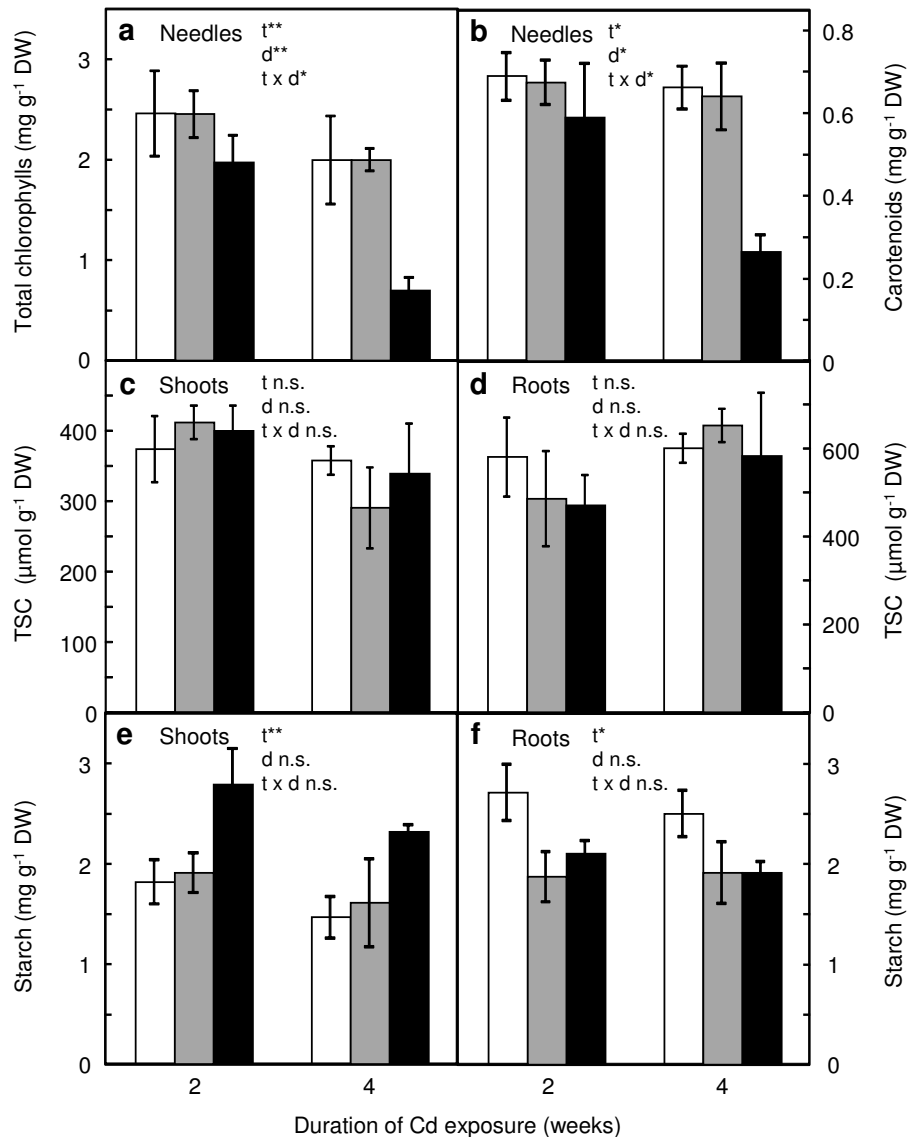
### Larch plantlet growth and carbon assimilation

After 2 week-exposure to Cd, dry biomass of shoots (Fig. 1a) and roots (Fig. 1b) was not different from those of control plantlets. After 4 week-exposure to 250  $\mu\text{M}$  Cd, root biomass was not affected but aerial biomass was significantly reduced by 20 % compared to the control. In the presence of 500  $\mu\text{M}$  Cd, aerial and underground biomasses were reduced by 33 and 28 %, respectively, in the same period. In parallel we found a lower number of needles and shorter roots but the water content was not modified (data not shown).



**Fig. 1** Effect of Cd on shoot (a) and root (b) biomass of hybrid larch after 2 and 4 weeks of treatment. Control plants (*i.e.* plants not exposed to Cd) and plants treated with 250 and 500  $\mu\text{M}$  Cd correspond to white, grey and black bars, respectively. Data are mean  $\pm$  standard error of 4 independent experiments with 10 to 20 plants per independent experiment and per condition. Asterisks indicate significant differences (\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ ) and n.s. indicates no significant differences between treatments (t), durations of exposure (d), and interaction between both factors (t x d).

The measurement of total chlorophyll (Fig. 2a) and total carotenoid (Fig. 2b) contents showed that exposure to 250  $\mu\text{M}$  Cd did not modify the concentration of these photosynthetic pigments in plantlets. A decrease in pigment content was observed after 2 week-exposure to 500  $\mu\text{M}$  Cd but the difference was not significant compared to control. However, after 4 weeks, chlorophyll and carotenoid concentrations dramatically decreased by 65 and 60 %, respectively, compared to control.



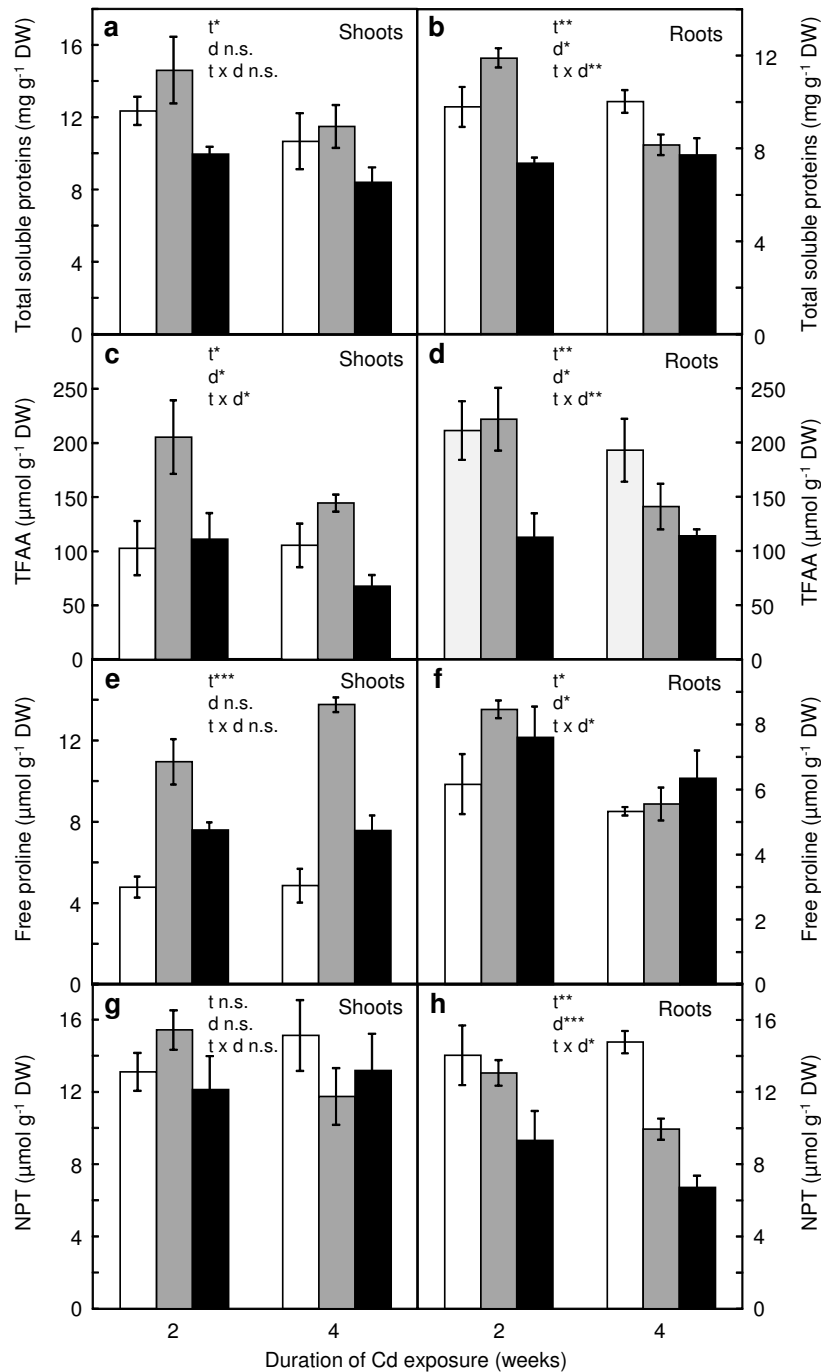
**Fig. 2** Effect of Cd on carbon nutrition of hybrid larch after 2 and 4 weeks of exposure. Total chlorophyll (a) and carotenoid (b) contents were measured in needles. Total soluble carbohydrate (TSC) (c, d) and starch (e, f) contents were assayed on shoots and roots. Control plants and plants treated with 250 and 500  $\mu\text{M}$  Cd correspond to white, grey and black bars, respectively. Data are mean  $\pm$  standard error of 4 independent experiments. Asterisks indicate significant differences (\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ ) and n.s. indicates no significant differences between treatments (t), durations of exposure (d), and interaction between both factors (t x d).

This decrease was easily seen as needles began to turn yellow. Results showed that total soluble carbohydrate (TSC) content was not significantly modified in presence of Cd regardless to concentration, time of exposure or organs (shoots or roots) (Fig. 2c, d). In their aerial parts, plantlets exposed to 250  $\mu\text{M}$  Cd had a starch content similar to that of the control whereas starch concentration significantly increased by 53 and 59 % after 2 and 4 week-exposure to 500  $\mu\text{M}$  Cd, respectively (Fig. 2e). In roots, starch content was significantly reduced by 22 - 23 % after

2 and 4 weeks in presence of 500  $\mu\text{M}$  Cd (Fig. 2f). Treatment with 250  $\mu\text{M}$  Cd resulted in a transient decrease by 30 % after 2 weeks but this difference vanished after 4 weeks.

### **Effect of Cd on nitrogen nutrition**

Total soluble protein content was not significantly modified in aerial organs when plantlets were exposed to 250  $\mu\text{M}$  Cd whereas it decreased by 20 % after exposure to 500  $\mu\text{M}$  Cd during 2 and 4 weeks (Fig. 3a). In roots, the treatment with 500  $\mu\text{M}$  Cd reduced the soluble protein concentration by 25 % after 2 and 4 weeks of exposure (Fig. 3b). The 250  $\mu\text{M}$  Cd treatment increased soluble protein concentration by 20 % after 2 weeks but protein content was 20 % lower than control after 4 weeks of treatment. Total free amino acid (TFAA) concentration was doubled after 2 week-exposure to 250  $\mu\text{M}$  Cd and increased by 37 % after 4 weeks whereas it decreased by 36 % after 4 weeks in presence of 500  $\mu\text{M}$  Cd (Fig. 3c). In roots, TFAA content was reduced by 47 and 41 % after 2 and 4 week-exposure to 500  $\mu\text{M}$  Cd, respectively, whereas no significant difference with control was recorded when plantlets were grown in presence of 250  $\mu\text{M}$  Cd (Fig. 3d). Free proline significantly accumulated in shoots by factors 2.3 and 2.8 after 2 and 4 week-exposure to 250  $\mu\text{M}$  Cd, respectively (Fig. 3e). This accumulation was less important with the 500  $\mu\text{M}$  Cd treatment as proline concentration increased by a factor 1.6. In roots, the only significant difference compared to control, was a transient 37 % increase after 2 weeks in presence of 250  $\mu\text{M}$  Cd (Fig. 3f).

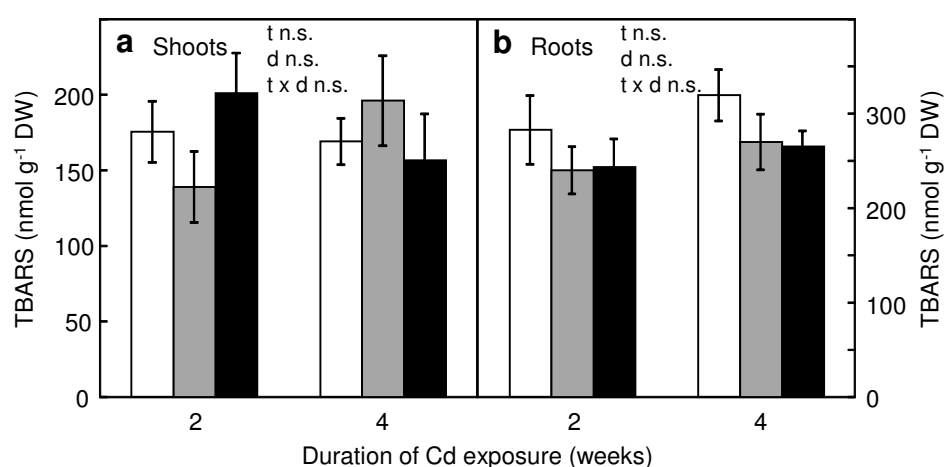


**Fig. 3** Effect of Cd on nitrogen nutrition of hybrid larch after 2 and 4 weeks of exposure. Total soluble protein (a, b), total free amino acid (TFAA) (c, d), free proline (e, f) and non-protein thiol (NPT) (g, h) contents were assayed on shoots and roots. Control plants and plants treated with 250 and 500 μM Cd correspond to white, grey and black bars, respectively. Data are mean ± standard error of 4 independent experiments. Asterisks indicate significant differences (\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ ) and n.s. indicates no significant differences between treatments (t), durations of exposure (d), and interaction between both factors (t x d).

Concerning non-protein thiol (NPT) content, no significant difference between control and treated plantlets was observed in aerial organs (Fig. 3g). In roots, Cd reduced NPT concentration by 33 and 54 % after 2 and 4 weeks in presence of 500  $\mu\text{M}$  Cd, respectively, whereas it decreased only after 4 weeks (by 33 %) on 250  $\mu\text{M}$  Cd (Fig. 3h).

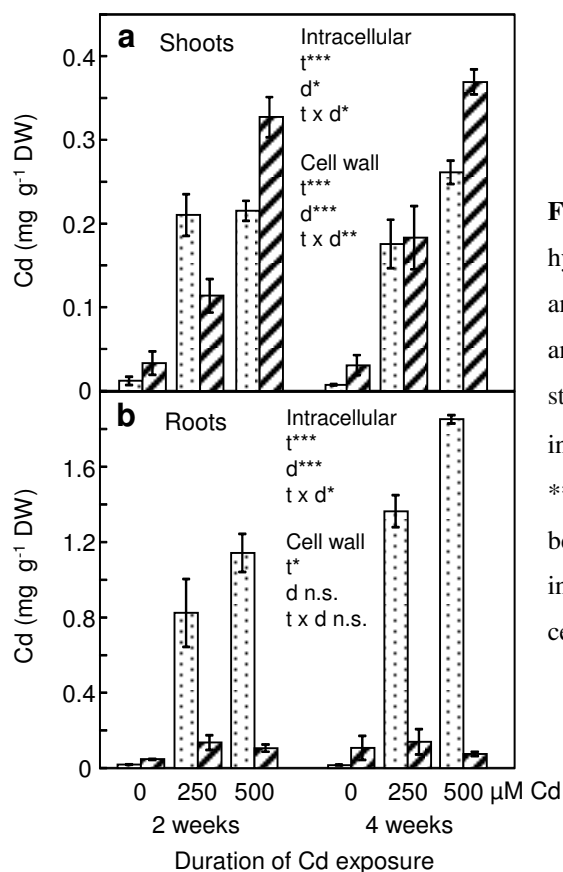
### Peroxidation level and Cd distribution in larch plantlet

Results showed that thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) content was quite similar in control and Cd-exposed plantlets in both aerial and underground organs (Fig. 4a, b).



**Fig. 4** Effect of Cd on shoot (a) and root (b) thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) content in hybrid larch after 2 and 4 weeks of treatment. Control plants and plants treated with 250 and 500  $\mu\text{M}$  Cd correspond to white, grey and black bars, respectively. Data are mean  $\pm$  standard error of 4 independent experiments. Asterisks indicate significant differences (\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ ) and n.s. indicates no significant differences between treatments (t), durations of exposure (d), and interaction between both factors (t x d).

In shoots, Cd concentration in cell wall increased from 0.11 to 0.18  $\text{mg g}^{-1}$  DW between 2 and 4 week-exposure to 250  $\mu\text{M}$  whereas in the same time course, Cd concentration in the intracellular fraction remained constant around 0.2  $\text{mg g}^{-1}$  DW (Fig. 5a). In the presence of 500  $\mu\text{M}$  Cd, shoot Cd concentration in the cell wall was more important than in the intracellular fraction. Indeed, Cd concentrations in cell wall and intracellular fractions were 0.33 and 0.21  $\text{mg g}^{-1}$  DW, respectively, after 2 weeks and 0.37 and 0.26  $\text{mg g}^{-1}$  DW after 4 weeks.



**Fig. 5** Accumulation of Cd in shoots (a) and roots (b) of hybrid larch after 2 and 4 weeks of treatment. Bars with dots and hatching correspond to Cd concentration in intracellular and cell wall fractions, respectively. Data are mean  $\pm$  standard error of 4 independent experiments. Asterisks indicate significant differences (\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ ) and n.s. indicates no significant differences between treatments (t), durations of exposure (d), and interaction between both factors (t x d) for intracellular and cell wall Cd concentrations.

Cd concentration was higher in roots than in shoots and much more important in the intracellular fraction than in cell wall, irrespective of Cd concentration or exposure time (Fig. 5b). Cd concentration in the intracellular fraction increased from 0.8 to 1.2 mg g<sup>-1</sup> DW after 2 and 4 week-exposure to 250 μM Cd, respectively, and from 1.1 to 1.8 mg g<sup>-1</sup> DW in presence of 500 μM Cd. Cd concentration in cell wall was around 0.14 and 0.1 mg g<sup>-1</sup> DW in presence of 250 and 500 μM Cd, respectively. The translocation factor (TF) was around 0.3 for both treatments after 2 weeks and decreased after 4 weeks: it was 0.20 and 0.24 in presence of 250 and 500 μM Cd, respectively. We estimated Cd repartition between shoots and roots and found that around 50 % of accumulated Cd was stored in shoots for both Cd conditions after 2 weeks. After 4 weeks, the percentage of Cd accumulated in shoots decreased as Cd concentration in roots increased faster than in shoots. Thus, after 4 weeks, the Cd amount in aerial organs corresponded to 30 and 40 % of total Cd accumulated in plantlets in presence of 250 and 500 μM Cd, respectively.

## DISCUSSION

Results showed that a high concentration of 500  $\mu\text{M}$  Cd began to slowdown plantlet growth after 4 weeks of exposure: biomass of both shoots and roots was reduced by 30 % compared to control and the photosynthetic pigment content dramatically decreased. However TSC content remained close to control and starch concentration increased in shoots whereas it decreased in roots. This suggests that carbohydrate translocation from shoots to roots was slowed down maybe to maintain a high level of carbohydrates in aerial organs to protect as long as possible the photosynthetic apparatus which is more sensitive to Cd (Cho and Seo 2005). Starch accumulation without perceptible decrease in TSC content has already been observed *in vitro* in grapevine in response to salt stress and in apple plantlets infected by pathogenic bacteria (Oliveira et al. 2009; Giorno et al. 2013). Moreover, it is possible that plantlets absorbed soluble carbohydrates from the culture medium to maintain a high pool of carbohydrates as previously observed on *in vitro* grown grapevine exposed to flumioxazin, a herbicide altering photosynthesis activity (Saladin et al. 2003c). Compared to exposure to 500  $\mu\text{M}$  Cd, stress was less obvious when plantlets were exposed to 250  $\mu\text{M}$  Cd for 4 weeks as only aerial biomass decreased whereas photosynthetic pigment, TSC and shoot starch concentrations remained unchanged. The decrease in root starch level may be a first index of reserve hydrolysis to increase TSC and counteract the stress generated by Cd.

Cd exposure modified nitrogen nutrition in plantlets. Soluble protein concentration rapidly decreased when plantlets were grown in presence of 500  $\mu\text{M}$  Cd in both shoots and roots. It has been reported that Cd is involved in protein oxidation and cross-linking, and inhibits enzyme activities (Farid et al. 2013). In the present study, Cd probably generated protein degradation and / or slowing down of protein synthesis. When plantlets were exposed to 250  $\mu\text{M}$  Cd, protein content was not modified in shoot, suggesting that plantlets can tolerate this Cd concentration. Protein level in roots decreased only after 4 weeks of exposure, after a 20 % transient increase that might indicate an induction of defense mechanisms after 2 weeks. An increase in total protein content has been observed in *Sorghum bicolor* exposed to Cd (Muratova et al. 2015). Several proteins such as heat-shock proteins, proteinases, pathogenesis-related proteins or glutathione-S-transferases have been reported to be induced as a response to Cd (Tran and Popova 2013). In addition to potential induction of defense proteins, our results showed that in presence of this Cd concentration (250  $\mu\text{M}$ ), free proline content in roots was higher than control after 2 weeks of treatment and close to control after 4 weeks. Proline is not



only an osmoprotectant but also a free radical and Cd scavenger, suggesting that roots enhanced defense pathways against oxidation and stimulated Cd chelation (Rai 2002; Szabados and Saviouré 2010). In roots of plantlets treated with 500  $\mu\text{M}$  Cd, proline concentration remained close to control. Moreover, results showed that proline content in shoots was higher than in control and that this content was at the highest level when plantlets were exposed to 250  $\mu\text{M}$  Cd, indicating that anti-oxidative defenses and / or Cd scavenging would be more efficient with this lower Cd concentration. In addition, in presence of this Cd concentration, TFAA content in shoots was higher than in the control (without decrease of total protein content) contrary to what happened in presence of 500  $\mu\text{M}$  Cd, highlighting probably an increased biosynthesis of amino acids. It has been reported that a high content in foliar amino acids can play an important role in maintaining both chlorophyll synthesis and integrity of cell structure and can reduce DNA and RNA degradation caused by stress (Sadak et al. 2015). According to the present study, it appears that the strategy of plantlets to counteract Cd stress was to stimulate nitrogen metabolism in order to maintain carbon metabolism and thus plant growth.

The NPT content mainly corresponds to the oligopeptides glutathione, an anti-oxidant compound, and phytochelatins which are molecules able to bind Cd *via* the sulfhydryl group of the cysteine residue (Yadav 2010). Results showed that NPT content was not modified in shoots after Cd exposure and that a decrease occurred in roots after 2 weeks of exposure to 500  $\mu\text{M}$  Cd and after 4 weeks in presence of 250  $\mu\text{M}$  Cd. This result suggests that NPT would not be involved in defense against Cd in larch. We previously showed that NPT content as well as the activity of enzymes involved in glutathione and phytochelatin biosynthesis increased in both shoots and roots by a factor 1.5 to 1.8 when plantlets were exposed during one week to 1.5 mM Cd (Moussavou Moudouma et al. 2013). It is thus possible that NPT synthesis is early and transiently stimulated in larch plantlets in response to Cd but NPT would not play a prominent role in long-term tolerance to this TE. However, Fernández et al. (2014a) showed that *Dittrichia viscosa* grown *in vitro* on a nutrient-rich culture medium and exposed to Cd exhibited lower NPT content (glutathione and phytochelatins) than plantlets grown on this culture medium diluted to 1/2 and to 1/4. The authors highlighted that mineral elements in the culture medium could interfere with Cd uptake and phytochelatin synthesis when their concentration was high. In our previous work (Moussavou Moudouma et al. 2013), interferences were maybe quite low after one week of exposure to Cd but in this present study, it is possible that the high nutrient concentration disturbed NPT synthesis. Furthermore, other molecules can be involved in Cd

chelation such as organic acid or polyamines as reported in willow species by Zacchini et al. (2011). In addition, it has been shown that *Noccaea caerulescens*, a Cd/Zn hyperaccumulator, does not stimulate phytochelatin synthesis but enhances the synthesis of anti-oxidant enzymes (Hernández-Allicia et al. 2006; Liu et al. 2008). Our results suggest that larch tolerance can be explained by anti-oxidant defenses such as, for example, proline synthesis and maybe ligands other than phytochelatins. It has been reported that exogenous proline enhanced the tolerance to low temperature and NaCl of embryogenic cultures of hybrid larch, sitka spruce and oak (Gleeson et al. 2004). Moreover, Gleeson et al. (2005) showed that a surexpression of pyrroline 5-carboxylate synthase in hybrid larch enhanced endogenous proline synthesis and resulted in higher tolerance to cold and salinity. This highlights the important role of proline in protecting larch against abiotic stress. In the present work, we showed that no lipid peroxidation occurred (TBARS level remained close to control values) indicating that under our experimental conditions, plantlets were able to counteract the Cd-generated oxidative stress.

The quantification of Cd showed that concentration was higher in roots than in shoots, a distribution that has often been observed in herbaceous as well as tree species, even in Cd-hyperaccumulators (Fernández et al. 2008; Wang et al. 2008; Liu et al. 2009; Wu et al. 2010b; Di Lonardo et al. 2011). In roots, Cd concentration was much higher in the intracellular fraction than in the cell wall that may promote Cd transfer from roots to shoots. Cd which accumulates in the cell wall generally binds to cell wall components such as pectins and hemicellulose (Zhu et al. 2013). Zhu et al. (2013) showed that an increase in hemicellulose content of root cell walls reduced the translocation of Cd from roots to shoots. In aerial organs of the hybrid larch, Cd concentration was always higher in cell wall when plantlets were exposed to 500  $\mu\text{M}$  Cd, suggesting that cell wall may be an efficient storage compartment for Cd. Results showed that in presence of 250  $\mu\text{M}$  Cd, Cd concentration in shoots was first higher in the intracellular fraction (after 2 weeks) and then similar in both fractions (after 4 weeks). This confirmed the storage of Cd in cell wall when Cd concentration increased in aerial organs. A study on the Cd-hyperaccumulator *Impatiens walleriana* showed similar Cd distribution, *i.e.* a lower cell wall accumulation of Cd in roots (compared to intracellular fraction) and a higher storage in this compartment in shoots (Lai 2015). However, in other plants cell wall is the main accumulation compartment for Cd in both roots and shoots from 50 - 60 % in rice (non hyperaccumulator) (He et al. 2008; Liu et al. 2014) and *Bechmeria nivea* (Cd-hyperaccumulator) (Wang et al. 2008) up to 95 % in the Cd-hyperaccumulator *Dittrichia viscosa* (Fernández et al. 2014b). Cd

distribution between cell wall and intracellular fraction would thus depend not only on the Cd concentration in soil but also on the plant species regardless of its level of Cd tolerance.

Whatever the time of exposure and the Cd concentration in culture medium, Cd concentration in aerial organs of larch plantlets (0.2 to 0.3 mg g<sup>-1</sup> DW) was higher than the threshold of 0.1 g kg<sup>-1</sup> DW requested for Cd-hyperaccumulators (Baker and Brooks 1989). In a previous work, we showed that the growth of hybrid larch plantlets exposed to 1.5 mM Cd for one week was not modified (compared to control) and that plantlets exhibited a shoot Cd concentration of 0.21 mg g<sup>-1</sup> DW (Moussavou Moudouma et al. 2013). As plantlets began to turn yellow a couple of days later in response to this Cd exposure, Cd concentration probably increased in shoots and this concentration was toxic for plantlets. As growth was reduced and photosynthetic pigment content strongly decreased after 4 weeks on 500 µM Cd (but without increase in TBARS content), the beginning of toxicity caused by Cd could correspond to a Cd concentration in shoots slightly higher than 0.3 mg g<sup>-1</sup> DW. The Cd concentrations we measured were within the same range as other values detected in tree species grown *in vitro*. Indeed, several clones of *Betula celtiberica* and *Populus alba* exhibited a Cd concentration in shoots between 0.3 - 0.4 and 0.3 - 0.6 mg Cd g<sup>-1</sup> DW, respectively (Fernández et al. 2008; Di Lonardo et al. 2011). Our results indicated that larch was able to translocate Cd to shoots. However, TF was around 0.3 after 2 weeks of treatment and 0.2 - 0.24 after 4 weeks, indicating a slowdown of translocation. As a result, 50 % of total absorbed Cd accumulated in shoots after 2 weeks of exposure and 30 to 40 % after 4 weeks. A similar decrease in Cd translocation was observed by Wang et al. (2008) in *Beckhamia nivea* and the authors suggested that this modification was related to internal barriers to protect aerial organs. In many hyperaccumulators, TF is equal to 1 or higher (Liu et al. 2009) but this was not currently the case for the larch plantlets. However, as previously mentioned, Cd concentration is often higher in roots than shoots, even for some Cd-hyperaccumulators. For example, *in vitro* grown *Prosopis laevigata* seedlings exposed for 50 days to 0.3 and 0.65 mM Cd showed TF around 0.4 although this species is considered as a potential Cd-hyperaccumulator (Buendía-González et al. 2010).

## CONCLUSION

We showed that hybrid larch plantlets were able to tolerate a high Cd concentration for at least 4 weeks and that proline may play an important role in this tolerance as anti-oxidant and/or Cd-chelating compound. Moreover, Cd concentration in roots was much higher in the intracellular fraction than in the cell wall, promoting a Cd translocation to shoots. In shoots, Cd concentration exceeded the threshold of Cd-hyperaccumulators, indicating that hybrid larch may be a promising candidate for phytoextraction (despite the low TF compared with several Cd-hyperaccumulators). However, Cd was freely bioavailable in the culture medium thus field tests are required to establish whether hybrid larch can be recommended for Cd-phytoextraction. Indeed, there are complex interactions in field between root systems, microorganisms, soil and climatic conditions. However, assisted phytoextraction with synthetic or natural amendments can be a good strategy to improve bioavailability of TE as well as nutrients and arbuscular mycorrhizal fungi.

## Acknowledgments

Amandine Bonet was supported by a PhD grant from the Region Limousin (France). The authors thank Nafissa Dorinthié for her work during her first year of Master's Degree and Pr. Michel Guilloton for help in manuscript editing.

*N.B. : Les références bibliographiques de cette publication ont été reportées à la fin du manuscrit (avec l'ensemble des autres références bibliographiques) afin d'éviter les redondances et de faciliter la lecture de cette partie.*



## Interprétation et discussion des principaux résultats obtenus

Les résultats de cette étude indiquent qu'après 2 semaines d'exposition à 500  $\mu\text{M}$  de Cd, la croissance du mélèze hybride est restée proche de celle du témoin et les paramètres liés aux métabolismes carboné et azoté ont été peu modifiés. Par contre, un traitement plus long de 4 semaines a provoqué un arrêt de croissance comme l'a montré la réduction de biomasse. Une diminution drastique de la teneur en pigments photosynthétiques a également été observée avec cependant un maintien des concentrations en glucides solubles et amidon (avec toutefois une baisse de l'amidon racinaire), ce qui laisse penser à une utilisation des glucides du milieu de culture pour limiter l'altération de l'activité de photosynthèse générée par le Cd. Une diminution dans les racines des teneurs en protéines, acides aminés et thiols totaux non protéiques a aussi été mise en évidence, confirmant la toxicité du Cd à ce niveau de concentration dans le milieu.

Les résultats ont montré que les plantules étaient toutefois capables de tolérer une concentration plus faible de Cd à savoir 250  $\mu\text{M}$ , ceci pendant une durée de 4 semaines. La biomasse des parties aériennes a cependant diminué, ce qui suggère que même si l'organogenèse a été maintenue (un comptage des aiguilles a été réalisé mais n'a pas été présenté dans la publication), les nouvelles aiguilles formées étaient plus petites et/ou plus légères que celles des témoins. Ce phénomène est difficile à confirmer visuellement car les aiguilles des plantes témoins sont de taille modeste. Les teneurs en pigments photosynthétiques et en glucides sont restées stables par rapport au témoin ainsi que la teneur en amidon dans les parties aériennes. Néanmoins, nous avons observé une tendance à une légère diminution (mais non significative) du niveau d'amidon dans les racines qui pourrait constituer un premier indice de son hydrolyse afin d'augmenter le pool de glucides solubles pour lutter contre le stress causé par le Cd. Au niveau des parties aériennes, nous avons montré que la teneur en acides aminés libres était plus élevée que dans les témoins sans aucune diminution de la teneur en protéines solubles totales. Ce résultat pourrait suggérer que la plante stimulerait le métabolisme azoté afin de maintenir une certaine croissance.

N'ayant observé aucune variation de la teneur en TBARS (produits de peroxydation des lipides), les plantules ont été en mesure de résister à l'oxydation générée par le Cd. Il est possible que des enzymes antioxydantes y aient contribué comme par exemple des peroxydases. En

effet, cette enzyme peut jouer un rôle efficace dans la dégradation d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , espèce réactive de l'oxygène souvent surproduite en réponse au Cd (Cho et Seo, 2005). Nous avons pu remarquer que la proline pouvait être une des molécules favorisant la tolérance du mélèze hybride au Cd, probablement grâce à son rôle antioxydant (piégeage des radicaux libres) mais aussi d'agent chélatant du Cd. Par ailleurs, d'après nos résultats, la synthèse supplémentaire d'oligopeptides riches en groupes thiols n'a pas semblé être impliquée chez le mélèze hybride en réponse au Cd. Ces composés ne seraient donc pas responsables de la prise en charge et du transport du Cd vers les parties aériennes. Il serait donc intéressant de vérifier si d'autres ligands comme par exemples des acides organiques (malate, oxalate, citrate) ou des polyamines (putrescine, spermidine, spermine) pourraient jouer ce rôle de complexation et de transport du Cd chez le mélèze.

D'un point de vue de la répartition du Cd, les résultats ont montré une distribution différente selon les organes. En effet, dans les racines, le compartiment intracellulaire accumule le plus de Cd, suggérant un potentiel de translocation du Cd vers les organes aériens. Dans les parties aériennes, nous avons pu montrer que la concentration en Cd dans les parois était plus importante et qu'elle augmentait avec le temps et la concentration en Cd du milieu. Bien que le facteur de translocation soit très inférieur à 1 (nous avons obtenu une valeur de l'ordre de 0,2), nos résultats ont montré que la concentration en Cd dans les parties aériennes pouvait atteindre  $0,2 \text{ mg Cd. g}^{-1}$  de MS, ce qui représente 2 fois la valeur seuil pour considérer qu'une espèce est hyperaccumulatrice de Cd. Ainsi, le mélèze hybride pourrait être un bon modèle pour la phytoextraction du Cd. Enfin, environ 30 % du Cd total absorbé a été stocké dans les parties aériennes ce qui s'annonce intéressant pour une espèce produisant une forte biomasse au cours du temps.

En conclusion, après 4 semaines sur  $250 \mu\text{M}$  de Cd, les résultats ont donc montré une bonne tolérance des plantules de mélèze hybride, lesquelles pourraient probablement tolérer cette concentration dans le milieu pendant une durée plus longue. Cependant, le modèle *in vitro* n'est pas immédiatement représentatif du comportement du mélèze hybride dans des conditions naturelles. En effet, le Cd présent dans le milieu de culture est très phytodisponible, ce qui entraîne une absorption rapide par les plantules. Il est peu probable que le Cd soit aussi facilement mobilisable dans un substrat plus riche en matières organiques comme du terreau. C'est pourquoi, le second chapitre présente une étude effectuée dans des conditions moins

artificielles afin d'établir si le mélèze peut être recommandé pour la phytoextraction du Cd. Cette étude a été réalisée sur deux modèles en serre (des plantules et des arbres de deux ans) en utilisant des concentrations plus proches de ce qui peut être rencontré sur certains sols pollués en Cd. Nous avons donc sélectionné deux concentrations en Cd, 50 et 100  $\mu\text{M}$ , ce qui correspond à 12,5 et 25 mg Cd.  $\text{kg}^{-1}$  de sol sec, respectivement. Ces concentrations ne sont pas les plus importantes connues à ce jour car plusieurs auteurs ont reporté des concentrations en Cd dans le sol pouvant aller de 75 à 150 mg.  $\text{kg}^{-1}$ , voire de 600 à plus de 1000 mg.  $\text{kg}^{-1}$  sur des sites en Angleterre, au Pays de Galle ou au Japon (Alloway et Steinnes, 1999; Adriano, 2001; Schützendübel et Polle, 2002). Dans nos expériences, nous avons exposé les plantules au Cd pendant une durée de 2 mois et les arbres pendant 9 mois (de Février à Novembre).





## **- CHAPITRE 2 -**

**Réponses au cadmium du sapin de Douglas  
et de trois espèces de mélèzes cultivés en  
serre**



## Chapitre 2

### **Réponses au cadmium du sapin de Douglas et de trois espèces de mélèzes cultivés en serre**

Dans ce second chapitre, nous avons travaillé sur deux modèles : un modèle « plantule » issu de la germination de graines et un modèle « arbre », deux modèles se trouvant ainsi chacun à un stade différent dans leur développement. Ils sont tous les deux cultivés sous serre sur un substrat constitué d'un mélange terreau/sable (2/3 ; 1/3) contaminé artificiellement au Cd à des teneurs en Cd plus faibles mais sur une durée plus longue que pour le modèle *in vitro*. Cette approche permet de se placer dans un contexte moins artificiel tout en conservant encore un contrôle des paramètres environnementaux par rapport à une étude en extérieur sur site pollué. Ce chapitre se divise en deux parties :

1) Une première partie porte sur la distribution du Cd dans les différents organes des conifères et sur l'efficacité de phytoextraction de cet ET. Elle s'articule en deux sous-parties :

- La première sous-partie est liée à l'effet d'une exposition de deux mois à 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> sur la croissance des plantules de Douglas, de mélèze du Japon (MJ) et de mélèze d'Europe (ME) obtenues après germination de graines. La distribution du Cd au sein des différents organes (feuilles, tiges et racines) a ensuite été déterminée afin de comparer l'efficacité de la phytoextraction du Cd entre espèces.
- La seconde sous-partie concerne une étude similaire à celle des plantules mais cette fois avec des arbres âgés de 2 ans. Cette étude a été menée sur 3 espèces de mélèzes, le mélèze hybride (MH), le mélèze d'Europe et le mélèze du Japon. Ces arbres ont été soumis à une contamination artificielle de 12,5 et 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> de sol pendant une saison de croissance (9 mois). Dans un premier temps, l'effet du Cd sur la croissance des mélèzes a été étudié ainsi que sa répartition dans les différents organes. Ces données permettent de comparer l'efficacité d'accumulation du Cd pour chaque espèce et d'apporter des premiers éléments de réponse quant à l'opportunité d'utiliser une ou plusieurs espèces de mélèzes en phytoextraction. Ces résultats sont présentés sous la

forme d'une publication scientifique en soumission dans le journal *Chemosphere* et s'intitule : « Comparaison of cadmium phytoextraction efficiency by three larch species ».

Par delà le constat d'une capacité variable à extraire et accumuler le Cd dans les organes aériens des plantules et des arbres étudiés, la question sous-jacente porte sur la nature et la variabilité des stratégies développées par ces végétaux pour tolérer un environnement contaminé par des ET.

2) La seconde partie de ce chapitre aborde les processus impliqués dans la tolérance au Cd et plus particulièrement des composés potentiellement impliqués dans le piégeage du Cd. Celle-ci s'articule en deux sous-parties :

- La première porte sur des molécules pouvant piéger le Cd au niveau intracellulaire comme par exemple les oliopeptides riches en cystéine et les polyamines.
- La seconde s'intéresse aux composés impliqués dans l'adsorption du Cd au niveau pariétal (première barrière physico-chimique de la cellule avec son environnement), plus précisément les pectines dont la richesse en acides galacturoniques peut constituer une zone d'adsorption privilégiée comme indiqué dans l'introduction bibliographique. Les modifications chimiques quantitatives et qualitatives des pectines ont été évaluées dans le bois et les écorces des arbres formés au cours de la période d'exposition au Cd. De plus, l'activité des pectines méthylestérases (PME) a été quantifiée chez des plantules exposées à des doses variables de Cd car ces enzymes sont connues pour moduler l'acidité des pectines et donc leur capacité d'adsorption de cations métalliques comme le Cd.

# RESULTATS - *Première partie*

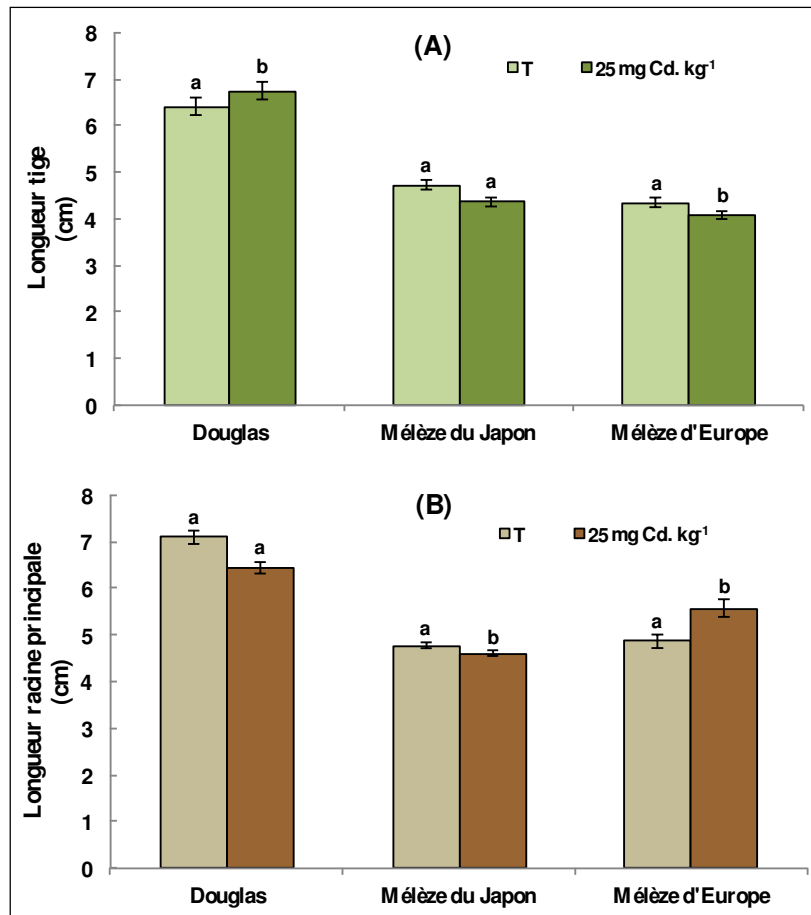
## Distribution du Cd dans les différents organes et comparaison du potentiel de phytoextraction entre les espèces.

### I. Comparaison entre les plantules de Douglas et deux espèces de mélèzes

#### 1. Effets du Cd sur la croissance

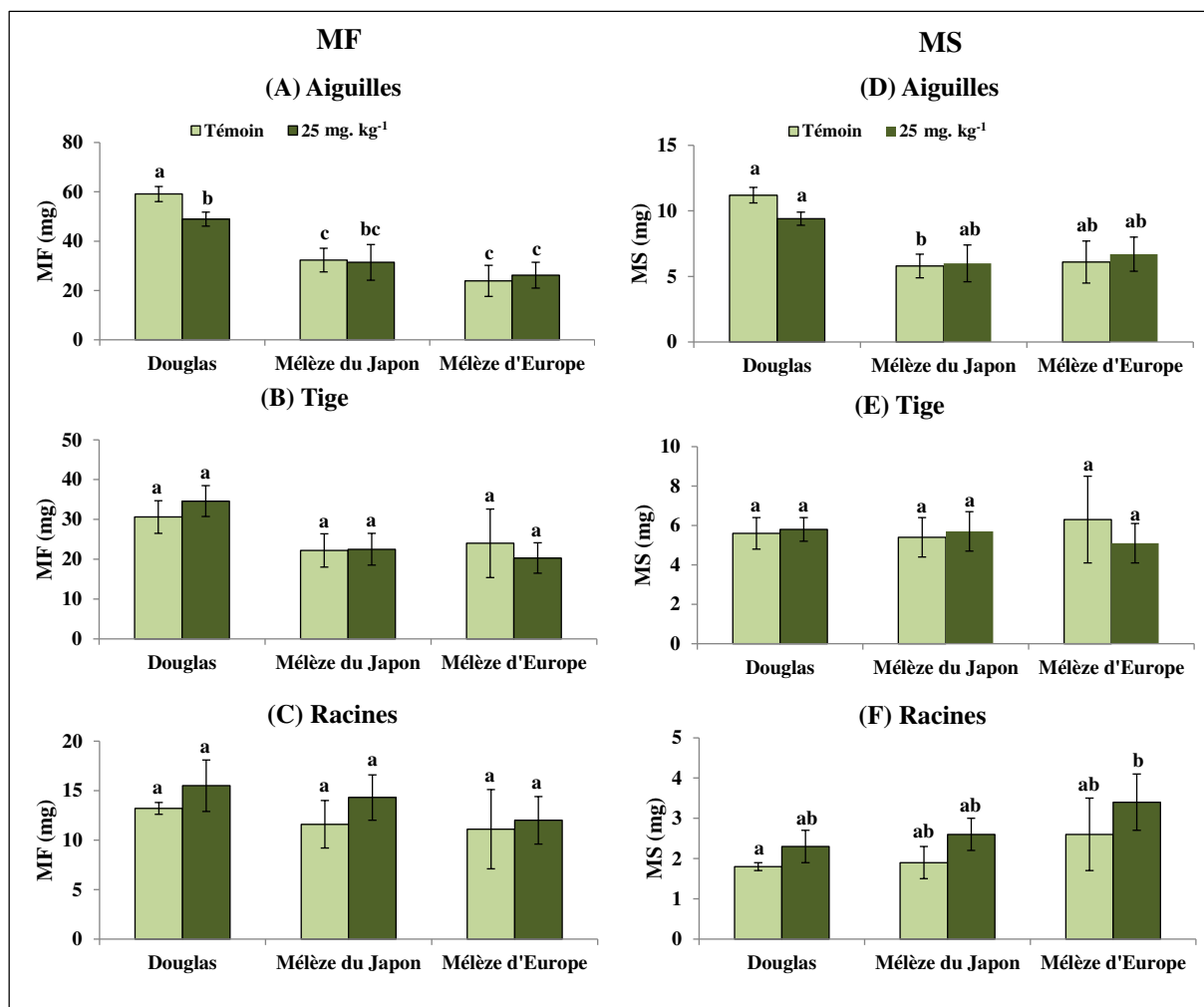
L'effet d'une exposition au Cd (25 mg Cd. kg<sup>-1</sup>) a été examiné sur des plantules issues de la germination de graines de Douglas, de mélèze du Japon (MJ) et de mélèze d'Europe (ME) après deux mois d'exposition. Après un traitement de stratification, les graines ont été semées sur un mélange terreau / sable puis le substrat a été arrosé une seule fois avec une solution de CdCl<sub>2</sub>. La culture s'est déroulée sous serre pendant deux mois au cours desquels les plantules ont été arrosées par de l'eau déminéralisée une fois le traitement au Cd réalisé. La capacité de tolérance des plantules a tout d'abord été évaluée par des mesures biométriques de longueur de racine principale et de hauteur de tige (figure 50).

L'exposition au Cd a entraîné une légère stimulation de la croissance de la tige (+ 5,4 %) des plantules de Douglas (figure 50A) sans affecter l'appareil racinaire (figure 50B). Concernant le MJ, seule une légère inhibition de croissance (- 3,5 %) du système racinaire (figure 50B) a été observée. Quant au ME, une légère diminution de croissance (- 6,2 %) de la tige (figure 50A) a été accompagnée d'une augmentation de croissance (+ 14,3 %) de la racine (figure 50B). La comparaison des différentes espèces montre que les plantules de Douglas ont eu une croissance plus rapide que celle des mélèzes avec une hauteur de tige et une longueur de racine principale plus élevées. Bien que des différences significatives aient été observées entre les témoins et les plantules exposées au Cd pour plusieurs espèces et organes, ces différences sont cependant faibles et tendent à montrer qu'aux doses expérimentales le Cd n'a pas d'effet fortement marqué sur la croissance des plantules.



**Figure 50.** Effet du Cd sur la croissance des plantules de Douglas, de mélèze du Japon et de mélèze d'Europe. Les plantules ont été exposées pendant 2 mois à 25 mg Cd.kg<sup>-1</sup> de sol. La longueur de la tige (A) et de la racine principale (B) a été mesurée lors de la récolte. Chaque barre d'histogramme représente la moyenne  $\pm$  l'erreur standard de 6 expériences indépendantes avec 20 plantules par condition. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les conditions d'exposition ( $p < 0,05$ ).

La biomasse fraîche (MF) et sèche (MS) de ces plantules a également été quantifiée. Quels que soient l'espèce et l'organe, le Cd n'a pas eu d'effet sur la MF moyenne par plantule (figure 51A, B et C) et sur la MS (figure 51D, E et F) à l'exception d'une diminution de la masse des aiguilles pour le Douglas de 17,3 % pour la MF (figure 51A). Par ailleurs, bien que non significative, une légère tendance à une augmentation de la MS (et MF) des racines a été observée pour les trois espèces de conifères. En comparant les différentes espèces, les résultats ont montré que les plantules de Douglas possèdent une biomasse plus importante que celles des mélèzes.



**Figure 51.** Effet du Cd sur la matière fraîche et la matière sèche des plantules. La MF et la MS des plantules correspondent aux figures de gauche et de droite, respectivement. A et D : masse des aiguilles ; B et E : masse des tiges ; C et F : masse des racines. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'erreur standard de 4 expériences indépendantes. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre condition d'exposition ( $p < 0,05$ ).

Pour chaque espèce, le pourcentage moyen de MS a été calculé dans les différents organes et les résultats ont montré qu'il n'y avait aucune différence significative entre les témoins et les plantules exposées au Cd (tableau 20).



**Tableau 20.** Pourcentage moyen de matière sèche dans les différents organes des plantules.

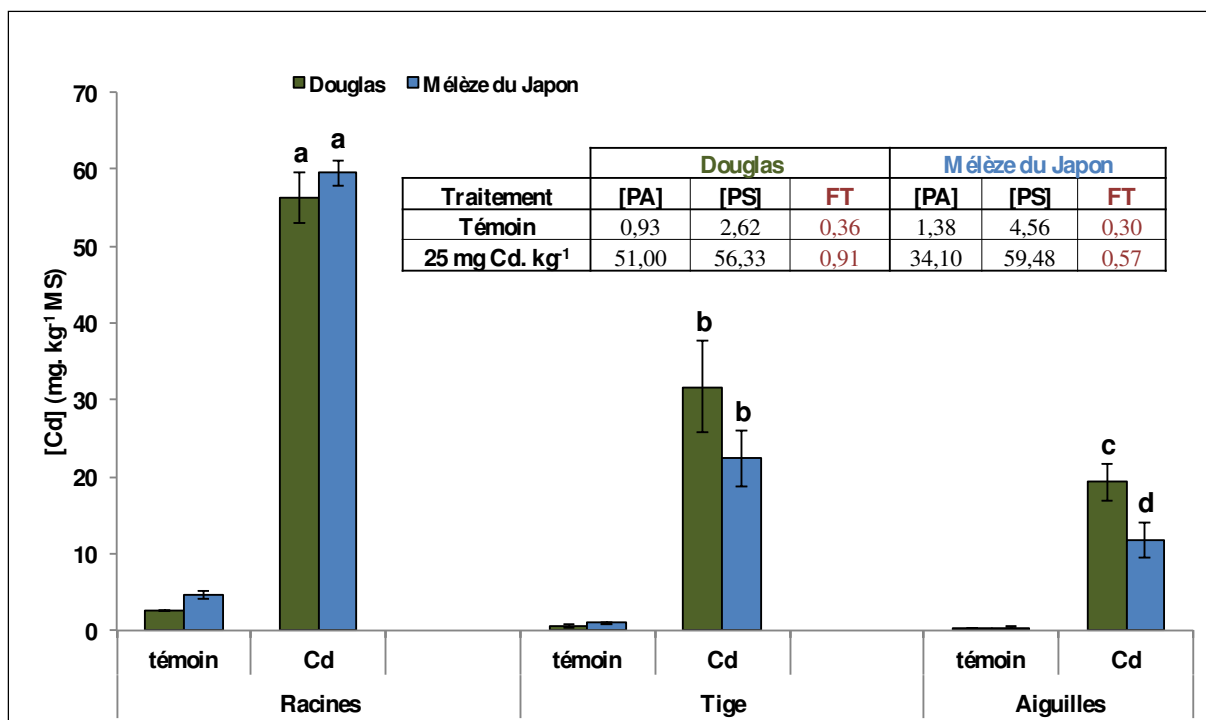
	Condition d'exposition	Aiguilles	Tige	Racines
<b>Douglas</b>	<b>Témoin</b>	18,92 ± 0,46	18,34 ± 0,26	13,26 ± 0,66
	<b>25 mg Cd. kg<sup>-1</sup></b>	19,21 ± 0,16	18,17 ± 0,29	15,07 ± 0,98
<b>MJ</b>	<b>Témoin</b>	18,27 ± 0,29	24,41 ± 2,33	16,35 ± 1,78
	<b>25 mg Cd. kg<sup>-1</sup></b>	19,24 ± 0,70	24,17 ± 2,42	16,91 ± 2,18
<b>ME</b>	<b>Témoin</b>	23,85 ± 2,23	26,39 ± 1,01	23,65 ± 0,04
	<b>25 mg Cd. kg<sup>-1</sup></b>	25,57 ± 1,32	23,93 ± 1,66	25,03 ± 1,87

Les plantules de Douglas, de mélèze du Japon (MJ) et de mélèze d'Europe (ME) ont été exposées ou non à 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> pendant 2 mois. Les résultats sont la moyenne ± l'erreur standard de 3 expériences indépendantes.

## 2. Répartition du Cd dans les différents organes

La distribution du Cd dans les différents organes des plantules a été déterminée. Ne disposant pas de suffisamment de biomasse pour le ME à cause du faible pourcentage de germination et du manque de disponibilité des graines, le dosage du Cd dans les organes du ME n'a pas pu être effectué sur trois lots indépendants. Les résultats concernant le ME ne seront donc pas présentés.

Pour le Douglas et le MJ, les résultats indiquent que les racines présentent les concentrations en Cd les plus importantes (figure 52). Celles-ci sont de 56 mg. kg<sup>-1</sup> MS pour le Douglas et de 59 mg. kg<sup>-1</sup> MS pour le MJ. Une décroissance progressive est observée des racines jusqu'aux aiguilles, indiquant qu'une partie du Cd absorbé est transportée vers les parties aériennes. Le Douglas concentre significativement plus de Cd que le MJ (environ 1,5 fois) au niveau aérien avec 51 mg. kg<sup>-1</sup> MS contre 34 mg. kg<sup>-1</sup> MS pour le MJ. Il en résulte un facteur de translocation (FT) 1,7 fois plus important pour le Douglas que pour le MJ. Le FT du Douglas est de l'ordre de 0,9 et celui du MJ est de 0,57. Par ailleurs, la présence de Cd dans les organes des plantules témoins peut être due à un effet de matrice, à des interférences lors du dosage mais peut-être aussi à la présence initiale en Cd dans le substrat (0,34 mg Cd. kg<sup>-1</sup> ; voir tableau 1 p 215).



**Figure 52.** Comparaison de la concentration de Cd accumulée dans les organes des plantules. La condition indiquée Cd correspond au substrat contaminé artificiellement à une dose de Cd de 25 mg.kg<sup>-1</sup>. Les résultats sont la moyenne de 3 expériences indépendantes. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les deux espèces par organe ( $p < 0,05$ ). Le tableau résume la concentration moyenne de Cd exprimée en mg. kg<sup>-1</sup> MS dans les parties aériennes (PA) et les parties souterraines (PS) et indique la valeur du facteur de translocation (FT) pour chaque espèce.

Les résultats ont aussi été exprimés en quantité de Cd par plantule et en pourcentage de Cd dans les parties aériennes qui sont les organes récoltés lors du procédé de phytoextraction. Les données présentées dans le tableau 21 indiquent que le Douglas transporterait plus efficacement le Cd vers les parties aériennes par rapport au MJ.

**Tableau 21.** Comparaison de la quantité moyenne de Cd accumulée par plantule dans les différents organes et pourcentage de répartition du Cd.

	Quantité Cd ( $\mu\text{g}$ )		Pourcentage Cd (%)	
	Douglas	Mélèze du Japon	Douglas	Mélèze du Japon
<b>Aiguilles</b>	182	70	37	20
<b>Tige</b>	184	127	37	36
<b>Racines</b>	128	153	26	44
<b>PA</b>	366	197	74	56
<b>Total</b>	494	350		

Le pourcentage de répartition correspond à la quantité dans un organe par rapport à la quantité totale de Cd accumulée par plantule.

En effet, le Douglas stocke presque deux fois plus de Cd dans ses PA que le MJ (366  $\mu\text{g}$  contre 197) et dans les mêmes proportions entre la tige et les aiguilles. Quant au MJ, ce transport semble fortement réduit entre les tiges et les aiguilles (deux fois moins dans les aiguilles que dans les tiges). Chez les deux espèces, le Cd est davantage stocké au niveau des PA avec toutefois des proportions variables : 75 % pour le Douglas et seulement 56 % pour le MJ.

## II. Comparaison entre trois espèces de mélèzes avec le modèle « arbre »

Pour rappel, des arbres de 2 ans ont été exposés pendant 9 mois en serre à deux concentrations en Cd (12,5 et 25  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). Comme dans la partie précédente, l'effet du Cd sur la biomasse a été étudié ainsi que la distribution du Cd dans les différents organes avec cette fois une séparation des plantes en un plus grand nombre d'organes (notamment le bois et les écorces qui ont été séparés au niveau du tronc).

Manuscript Number:

Title: Cadmium distribution in three larch species and comparison of phytoextraction efficiency

Article Type: Research paper

Section/Category: Environmental Chemistry (including Persistent Organic Pollutants and Dioxins)

Keywords: conifer; gymnosperm; Larix; phytoaccumulation; phytoremediation; trace element

Corresponding Author: Dr. Gaëlle Saladin, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: University of Limoges

First Author: Amandine Bonet, PhD student

Order of Authors: Amandine Bonet, PhD student; Céline Faugeron, Ph.D.; Vincent Gloaguen, Pr.; Gaëlle Saladin, Ph.D.

Manuscript CHEM-S-15-04681

## **Cadmium distribution in three larch species and comparison of phytoextraction efficiency.**

### **ABSTRACT**

Phytoextraction of metallic trace elements by trees is more and more studied but conifers are not often used as models. However, they could be relevant for several contaminated sites, especially under cold climates or on soils with a quite acid pH. This study focused on three larch species: a hybrid larch (*Larix x eurolepis* Henry) (HL) and its parents, European larch (*Larix decidua* Mill.) (EL), and Japanese larch (*Larix kaempferi* (Lamb.) Carrière) (JL). Two-year-old trees were exposed for 9 months to 12.5 and 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> dry soil. Results showed that Cd treatments had no significant effect on aerial and underground biomass, indicating that these species can tolerate a moderately polluted soil. Cd concentration was higher in aerial biomass of JL compared to HL and EL whereas HL and EL exhibited higher Cd concentration than JL in root system. JL stored more than 60 % of absorbed Cd in the aboveground organs against 30 and 20 % for HL and EL, respectively. Transfer factors followed the same trend: 0.7

for JL, and around 0.3 and 0.2 for HL and EL, respectively. According to our results, JL would be a better candidate for Cd phytoaccumulation.

## 1. Introduction

Human activities (mining, agriculture, waste incineration...) considerably increased the release of metallic trace elements (TE) in environment, leading to TE accumulation along the food chain and potential risks for health (Ali et al., 2013). Concerning contaminated soils, the most common technique to clean them is soil excavation and removal for a subsequent treatment outside the polluted site but this process is expensive and environmentally unfriendly as it disturbs and alters the ecosystem for a long period (Dermont et al., 2008). Phytoremediation is considered as a set of green alternative methods. Phytoextraction (or phytoaccumulation) is one of them and consists in TE uptake by plant roots on the contaminated site and translocation to aboveground organs (Wu et al., 2010b). Then, aerial biomass is harvested and exploited in various sectors such as energy, ash recycling, biofermentation or biocatalysis to reduce the waste volume and the cost of process (Nzihou and Stanmore, 2013; Willscher et al., 2013; Escande et al., 2014).

First experiments of phytoextraction were performed with hyperaccumulators, *i.e.* plant species storing high amounts of TE in aerial organs from 1 to 10 g. kg<sup>-1</sup> dry weight (DW) for most TE (Baker and Brooks, 1989). Cd is an exception as it is very toxic for plants at low level thus the minimal concentration for Cd-hyperaccumulators was set at 0.1 g. kg<sup>-1</sup> DW. Among the 550-600 known hyperaccumulators, most species are Ni-hyperaccumulators (around 75 %) and 80 % are herbaceous species (Saladin, 2015). The main disadvantages are i) the limited choice for phytoextraction of other TE, and ii) the low aerial biomass and the short root system of herbaceous hyperaccumulators. A couple of hyperaccumulator trees were reported as good candidates for several TE but they are tropical species thus not relevant for temperate or cold climates (Li et al., 2009; Saladin, 2015). However, metal uptake by several non-hyperaccumulator trees was reported to be more efficient than herbaceous hyperaccumulators as trees have a higher biomass to store TE (Mench et al., 2009; Vangronsveld et al., 2009). For example, Fischerová et al. (2006) showed that Cd concentration was 2-4 times higher in *Arabidopsis halleri*, a Cd herbaceous hyperaccumulator, than in *Salix dasyclados*, *S. caprea* and *Populus trichocarpa* but the annual remediation factor was higher for trees (5 to 8 %) than *A. halleri* (4.7 %). Another study showed than *Salix viminalis* could remove 5-6 times more Cd

per ha and per year than two herbaceous Cd-hyperaccumulators *Alyssum murale* and *Noccaea caerulescens* (Greger and Landberg, 1999).

Actually, phytoextraction with trees is performed with fast-growing angiosperms such as poplars or willows (Vandecasteele et al., 2005; Lewandowski et al., 2006; Di Lonardo et al., 2011; Zacchini et al., 2011). Although conifers have a lower growth rate than poplars and willows under temperate climates, several species were reported as less sensitive to low temperatures and freeze-thaw embolism and sometimes to water deficit (Hamanishi and Campbell, 2011; Carnicer et al., 2013). Moreover, most conifers can grow on more acidic soils than poplars or willows. It is known that TE are more bioavailable when soil pH is acid: for example, Cd solubility increased by a factor 8.8 when pH decreased from 7 to 6 (Olaniran et al., 2013). Taken together, these data suggest that conifers may be relevant candidates for phytoextraction in cold regions and / or on acidic soils. Moreover, one of the processes to recover waste after tree harvest and thus to reduce the cost of phytoaccumulation is biomass combustion. It was shown that this combustion tended to be more efficient in biomass with high lignin content due to the higher heating value of lignin (Amaral et al., 2014). As softwood of conifers contains more lignin than hardwood of angiosperms, conifers could present more attractive financial returns (Amaral et al., 2014). Moreover, another method of waste recycling is the production of ethanol. A comparison between softwood (loblolly pine) and hardwood (eucalyptus) showed that ethanol yield was better with loblolly pine (Gonzalez et al., 2012).

The aim of our study was to compare the effect of Cd on growth of three larch species and the metal distribution in trees in order to select the most efficient species for Cd accumulation. We worked on Cd because it is one of the most toxic TE for plants at low level and more than 50 % of world Cd reserves (and thus potential pollution) are located in temperate or cold areas (U.S. Geological Survey, 2013). In French non-polluted soils, mean Cd content is lower than 0.2 mg. kg<sup>-1</sup> dry soil (INERIS, 2014). There is no official threshold to consider a soil as polluted by Cd in France but it is currently accepted that a concentration of 2-3 mg. kg<sup>-1</sup> dry soil can be a beginning of pollution for an agricultural soil. In this work, we selected the 3 larch species which are present in the French region Limousin: hybrid larch (*Larix x eurolepis* Henry) (HL), European larch (*Larix decidua* Mill.) (EL), and Japanese larch (*Larix kaempferi* (Lamb.) Carrière) (JL). These species have a good growth rate compared to most conifers and are used for reforestation and as lumber. Moreover, previous work performed *in vitro* showed

that hybrid larch was tolerant to a high concentration of Cd (Moussavou Moudouma et al., 2013).

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Plant material, culture conditions and sampling**

For the 3 larch species, two-year-old trees were purchased from the forest nursery Bauchery (Loir-et-Cher, France). Trees were planted in November 2012 in pots (22 cm diameter, 17 cm height) containing a mixture of horticultural soil and sand (75/25, v/v). The temperature was maintained frost-free without artificial illumination and trees were watered with demineralized water. After an acclimation of 3 months, larches were divided into 3 batches of 10 trees: a control group and two batches watered once with an aqueous solution of CdCl<sub>2</sub>, resulting in final concentrations of 12.5 and 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> dry soil, respectively. Plants were subsequently watered with demineralized water until their harvest in November 2013, when needles just began to turn yellow. When trees were harvested, root system was rinsed with water and then incubated for 2 h in 20 mM EDTA in order to remove Cd adsorbed on root surface. Stem height and diameter (at the root collar) of each tree were measured just before potting in greenhouse and the day of harvest. Each tree was divided into 9 samples: taproot, roots, needles, buds, branches, bark trunk and wood trunk. For the 2 last samples, the last year (LY) was separated from the 2 previous years (PY). Fresh weight (FW) was recorded and samples were then dried in a ventilated oven at 40°C to obtain dry weight (DW). Samples were then reduced into powder with an Ultra Centrifugal Mill ZM 200 (Retsch, Germany) and a sieve size of 0.5 mm for subsequent Cd quantification.

### **2.2. Cd extraction from substrate**

After tree harvest, 5 pots per exposure condition were dried at 40°C in a ventilated oven and then sieved to particles lower than 2 mm. The Cd bioavailability was estimated with 3 different extractions at room temperature. For exchangeable fraction (weakly bound Cd), 10 g of soil were mixed with 25 mL of CaCl<sub>2</sub> at 10 mM and stirred for 3 h (Novozamsky et al., 1993). The mixture was then centrifuged at 5000 g for 10 min and the supernatant was then centrifuged at 7000 g for 30 min to remove the remaining particles. For the following extractions, the protocol of centrifugation was similar. The low-molecular-weight organic acid extractable fraction is a rhizosphere-based method corresponding to weakly bound Cd potentially released by root exudates. A quantity of 1.5 g of soil was mixed with 15 mL Rhizo-

A for 16 h (Feng et al., 2005). Rhizo-A is composed of 44.44 mM acetic acid, 22.22 mM lactic acid and 11.11 mM citric acid, malic acid and formic acid. The mixture was centrifuged as previously indicated to obtain the final extract. For organically complexed fraction (potential Cd mobility and availability), 1.5 g of soil were mixed for 1 h with 15 mL of 50 mM EDTA neutralized to pH 7 by addition of ammonia (Wear and Evans, 1968).

### **2.3. Cd quantification in trees and soil fractions**

Dry samples (0.5 g) of soil and plant organs reduced into powder (except bark and wood of the last year) were mixed with 6 mL nitric acid (68 %, Normapur) and 2 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %). For soil fractions, 5 mL of supernatant were mixed with 5 mL nitric acid and 2 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. All samples were mineralized by microwaves (Multiwave 3000, Anton Paar, Perkin Elmer). The final volume was adjusted to 10 mL with demineralized water for plant samples and to 12 mL for soil fractions and bulk soil. Cd concentration was then measured with a flame atomic absorbance spectrometer (AAAnalyst 400, Perkin Elmer) with a Hollow Cathod lamp intensity of 4 mA and a wavelength of 228.8 nm. The calibration range (0 to 3 mg Cd. L<sup>-1</sup>) was made with a standard commercial solution (1000 mg Cd. L<sup>-1</sup>).

Wood and bark biomass of the last year (LY) being low, we used an alternative method (Bonet et al., 2016). Dry samples (50 mg) were mixed with 2 mL nitric acid (68 %) and incubated for 9 h at room temperature and then for 48 h at 80°C in an oven. A volume of 2 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) was added and samples were maintained for 9 h at room temperature. The final volume was adjusted to 5 mL with demineralized water and samples were then filtrated on PTFE filters (pore diameter 0.45 µm, Millipore Corporation, USA). Cd concentration was determined by graphite furnace atomic absorption spectrometry using a Varian SpectrAA 880 Z with a Zeeman background correction system. The calibration range (0 to 2 µg Cd. L<sup>-1</sup>) was made with a standard commercial solution (1 g Cd. L<sup>-1</sup>). Lamp settings remain unchanged. All results were expressed in mg. kg<sup>-1</sup> DW.

We calculated translocation and bioconcentration factors (TF and BF, respectively) for each larch species and each treatment. TF is the ratio between aboveground and underground Cd concentrations whereas BF corresponds to the ratio between aboveground and bulk substrate Cd concentrations.



## **2.4. Statistical analysis**

Results were the mean  $\pm$  standard error (SE) of 10 trees per condition (control and Cd-treatments) for each larch species. Cd quantification in soil fractions is the mean  $\pm$  SE of 5 pots per condition. Statistical analysis consisted of one-way ANOVA test performed with the PAST software (version 2.17) to compare each set of plants or soil fractions with respect to the measured parameter. When significant difference was found ( $P < 0.05$ ), Tukey's test was carried out.

## **3. Results**

### **3.1. Cd availability in substrate**

Results showed a significant increase in soil pH between the beginning of experiment (T0) with a mean pH of 5.7 - 5.8 and 9 months later (T9) at tree harvest with a mean pH of 6.2 - 6.5 in control and Cd-treated trees (Table 1).

**Table 1.** Concentration of Cd in soil and bioavailability as a function of time and Cd treatment.

[Cd] applied	Soil collect	Soil pH	Cd concentration			
			Bulk soil	CaCl <sub>2</sub>	Rhizo-A	EDTA
0	T0	5.8 ± 0.08 a	0.34 ± 0.07 a	n.m.	n.m.	n.m.
	T9	6.2 ± 0.19 b	0.44 ± 0.03 a	n.m.	n.m.	n.m.
12.5	T0	5.7 ± 0.07 a	10.68 ± 0.31 b	0.284 ± 0.007 a	2.81 ± 0.05 a	5.21 ± 0.37 a
	T9	6.4 ± 0.11 b	8.03 ± 1.84 b	0.030 ± 0.013 b	0.12 ± 0.01 b	4.27 ± 0.79 a
25	T0	5.7 ± 0.09 a	19.08 ± 0.27 c	0.591 ± 0.023 c	4.23 ± 0.32 c	10.73 ± 0.45 b
	T9	6.5 ± 0.09 b	16.40 ± 1.43 d	0.066 ± 0.013 b	0.12 ± 0.03 b	6.11 ± 0.80 a

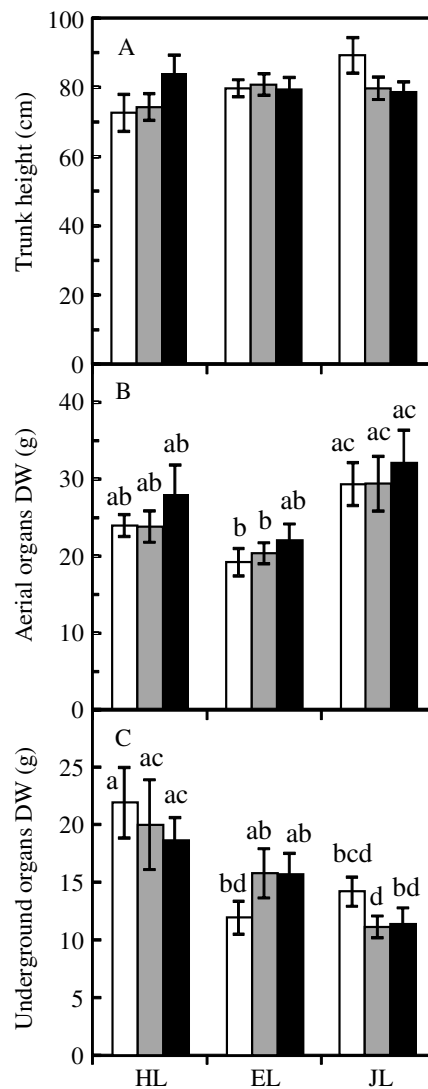
n.m.: not measured. Total Cd (bulk soil) and Cd extracted by CaCl<sub>2</sub>, Rhizo-A and EDTA solutions were measured at the beginning of treatment (T0) with 12.5 and 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> dry soil and 9 months later (T9) which corresponded to Japanese larch harvest. Results are the mean ± SE of 5 pots for each condition and are expressed in mg Cd. kg<sup>-1</sup> dry soil. For pH, bulk soil and each soil fraction (*i.e.* each column), different letters between two means (± SE) correspond to significant differences ( $P < 0.05$ ).

The concentration of Cd in control bulk soil was very low (0.34 to 0.44 µg. kg<sup>-1</sup> dry soil) thus the labile fractions of Cd (CaCl<sub>2</sub>-, Rhizo-A-, and EDTA- exchangeable Cd) were not assayed. For Cd treated trees, Cd concentration in bulk soil decreased by 14 % between T0 and T9 for the condition 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup>. Potentially mobilizable Cd concentration (EDTA fraction) was approximately 50 % of Cd concentration recorded in bulk soil at T0 as well as T9. The most exchangeable fraction (CaCl<sub>2</sub> fraction) corresponded approximately to 2.5 - 3 % of total Cd (bulk soil fraction) at T0 and less than 1 % at T9 whereas the Rhizo-A fraction corresponded to more than 20 % of total Cd at T0 and was only between 0.7 and 1.5 % at T9.

### 3.2. Cd exposure did not modify larch growth

Results showed that Cd did not modify significantly trunk height whatever the Cd treatment and the larch species (Fig. 1A). Similar results were obtained with trunk diameter (data not shown). A slight (but not significant) increase in aerial biomass was observed when trees were exposed to 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> soil (Fig. 1B). With this Cd treatment, the aerial biomass

was significantly higher for JL (around 30 g DW per tree) than EL (around 20 g per tree) whereas HL had an intermediary biomass between JL and EL. For each larch species and whatever the treatment, aerial biomass corresponded approximately to 45 - 50 % trunk (with a quite similar proportion between wood and bark), 30 % needles, 20 % branches and less than 5 % buds (Table 2).



**Fig. 1.** Effect of Cd exposure on larch growth. Two-year-old larches were exposed to Cd for 9 months and the trunk height (A), aerial dry biomass (B) and underground dry biomass (C) were measured in hybrid larch (HL), European larch (EL) and Japanese larch (JL). Control trees and trees treated with 12.5 and 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> dry soil correspond to white, grey and black bars, respectively. The means  $\pm$  SE correspond to 10 trees.

**Table 2.** Dry weight of underground and aerial organs in larches exposed or not to Cd for one growing season.

Larch species	[Cd] <sub>soil</sub>	Taproot	Roots	Needles	Buds	Branches	Wood (PY)	Wood (LY)	Bark (PY)	Bark (LY)
HL	0	2.9 ± 0.4 ab	18.9 ± 2.7 a	7.6 ± 0.4 a	0.7 ± 0.09 ab	4.7 ± 0.3 a	5.8 ± 0.4 a	0.14 ± 0.06 ab	4.6 ± 0.3 ad	0.17 ± 0.05 ab
	12.5	2.3 ± 0.2 a	17.6 ± 3.7 ab	7.3 ± 0.7 ab	0.8 ± 0.09 ab	4.8 ± 0.5 a	6.2 ± 0.6 a	0.12 ± 0.05 ab	5.1 ± 0.3 a	0.15 ± 0.05 ab
	25	3.4 ± 0.4 b	15.2 ± 1.6 ab	8.5 ± 1.0 ac	0.9 ± 0.07 b	5.4 ± 0.6 ab	6.8 ± 0.3 a	0.14 ± 0.07 ab	5.6 ± 0.2 b	0.23 ± 0.06 b
EL	0	2.5 ± 0.2 a	9.7 ± 1.1 c	5.4 ± 0.7 bc	0.6 ± 0.09 b	3.9 ± 0.4 a	6.1 ± 0.6 a	0.05 ± 0.01 a	3.6 ± 0.1 c	0.06 ± 0.01 a
	12.5	2.7 ± 0.2 ab	13.1 ± 1.9 ac	5.1 ± 0.4 c	0.7 ± 0.08 ab	4.1 ± 0.6 a	6.1 ± 0.4 a	0.07 ± 0.01 a	4.0 ± 0.1 d	0.08 ± 0.01 a
	25	2.6 ± 0.4 ab	13.0 ± 1.4 bc	5.9 ± 0.6 bc	0.8 ± 0.06 ab	4.2 ± 0.4 a	6.2 ± 0.8 a	0.07 ± 0.02 a	4.3 ± 0.3 ad	0.07 ± 0.01 a
JL	0	2.5 ± 0.3 ab	10.1 ± 1.1 c	11.1 ± 0.7 d	1.1 ± 0.13 b	7.4 ± 0.9 b	7.0 ± 0.7 a	0.22 ± 0.06 b	6.4 ± 0.1 e	0.40 ± 0.09 b
	12.5	2.7 ± 0.2 ab	10.3 ± 0.5 c	9.8 ± 1.4 de	1.0 ± 0.15 b	6.7 ± 0.9 b	6.2 ± 0.7 a	0.15 ± 0.03 b	6.3 ± 0.1 e	0.33 ± 0.06 b
	25	2.6 ± 0.4 ab	10.7 ± 1.0 c	9.9 ± 1.1 de	1.1 ± 0.15 b	7.2 ± 1.1 b	6.1 ± 0.5 a	0.20 ± 0.07 b	6.0 ± 0.3 be	0.31 ± 0.06 b

Results are the mean ± SE of 10 trees. [Cd]<sub>soil</sub> and the DW of all organs are expressed in mg. kg<sup>-1</sup> dry soil and in g per plant, respectively. For each organ (*i.e.* each column), different letters between two means (± SE) correspond to significant differences ( $P < 0.05$ ).

However, a significant increase by 20 % in the DW of bark from previous years (PY) was observed for HL and EL when exposed to 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> dry soil and compared to the controls. By contrast to aerial biomass, underground biomass tended to decrease as a response to Cd exposure for HL and JL (but not for EL) but differences were not significant (Fig. 1C). Underground biomass was composed of 80 % secondary roots and 20 % taproot for HL whereas secondary roots corresponded to 80 - 85 % and 75 % of the total underground biomass for EL and JL, respectively (Table 2). When comparing the proportion between aerial and underground biomass, results showed that HL and EL had a ratio between 1 and 1.5 whereas JL had a ratio between 2 and 2.5.

### **3.3. Comparison of Cd concentration as a function of organs in the three larch species**

For HL, the highest Cd concentrations in aerial organs were recorded in PY bark and buds (3.4 mg. kg<sup>-1</sup> DW) followed by branches (2.8 mg) and needles (2 mg) when trees were exposed to 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> soil (Table 3). Similar distribution was observed in EL for the same Cd-exposure with 3.14 mg. kg<sup>-1</sup> DW in PY bark, 2.36 mg in buds and 2 mg in branches and needles. In JL, distribution was different in the aerial organs as the highest Cd concentration was registered in branches (4.14 mg. kg<sup>-1</sup> DW) followed by buds (3.36 mg), needles (2.82 mg) and PY bark (2.45 mg). Buds, LY bark and LY wood corresponding to a low percentage of aerial biomass (around than 5 %), the most important organs to compare are thus needles, branches, PY bark and PY wood. For Cd concentration in each of these organs and each larch species, statistical analysis showed that there was no significant difference between both Cd exposures. Overall, Cd concentration in needles and branches was 1.5 to 2 times higher in JL than in HL and EL. Cd concentration in PY bark of JL was slightly lower than HL and EL but not significant whereas Cd concentration in PY wood of JL (1.26 - 1.29 mg. kg<sup>-1</sup> DW) was between EL (0.71 - 0.92 mg. kg<sup>-1</sup> DW) and HL (1.21 - 1.46 mg. kg<sup>-1</sup> DW).

**Table 3.** Concentration of Cd in organs of hybrid larch (HL), European larch (EL) and Japanese larch (JL) after 9 months of exposure to Cd.

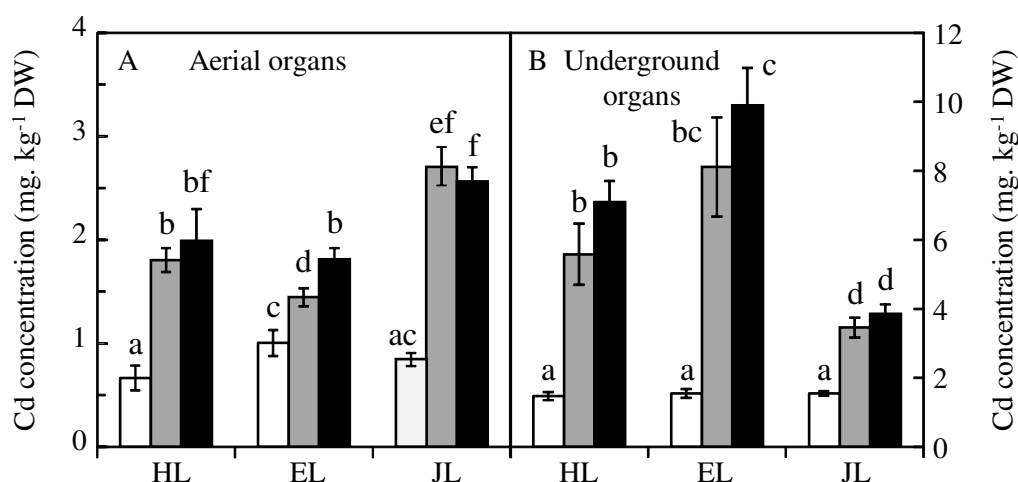
Larch species	[Cd] <sub>soil</sub>	Roots	Taproot	Needles	Buds	Branches	PY Bark	LY Bark	PY Wood	LY Wood
HL	0	1.43 ± 0.09 a	1.05 ± 0.11 a	0.31 ± 0.02 a	0.51 ± 0.06 a	1.26 ± 0.08 a	0.69 ± 0.05 a	0.36 ± 0.04 a	0.57 ± 0.03 a	0.35 ± 0.08 ab
	12.5	4.31 ± 0.24 bd	2.77 ± 0.19 bc	1.33 ± 0.22 b	2.58 ± 0.31 bc	2.38 ± 0.21 b	2.92 ± 0.14 b	0.56 ± 0.07 b	1.21 ± 0.07 b	0.27 ± 0.02 a
	25	8.14 ± 0.68 c	4.25 ± 0.76 b	2.01 ± 0.49 b	3.42 ± 0.43 b	2.80 ± 0.49 be	3.40 ± 0.42 b	0.53 ± 0.04 b	1.46 ± 0.12 b	0.50 ± 0.09 b
EL	0	1.76 ± 0.07 a	1.07 ± 0.9 a	0.28 ± 0.04 a	0.58 ± 0.06 a	0.94 ± 0.05 a	1.10 ± 0.03 c	0.31 ± 0.05 a	0.45 ± 0.01 c	0.22 ± 0.04 a
	12.5	6.93 ± 0.22 c	3.06 ± 0.46 b	1.57 ± 0.06 b	2.13 ± 0.21 c	1.80 ± 0.17 c	2.49 ± 0.08 d	0.31 ± 0.04 a	0.71 ± 0.12 a	0.24 ± 0.05 a
	25	10.23 ± 1.05 c	4.39 ± 0.35 b	2.00 ± 0.35 b	2.36 ± 0.15 c	2.00 ± 0.15b	3.14 ± 0.20 b	0.37 ± 0.05 a	0.92 ± 0.06 a	0.42 ± 0.02 b
JL	0	1.75 ± 0.05 a	0.69 ± 0.07 a	0.28 ± 0.05 a	1.48 ± 0.07 d	0.52 ± 0.08 d	1.35 ± 0.11 e	0.31 ± 0.01 a	1.08 ± 0.04 d	0.03 ± 0.01 c
	12.5	3.77 ± 0.27 b	2.16 ± 0.36 c	3.13 ± 0.22 c	2.83 ± 0.40 bc	3.79 ± 0.45 e	2.58 ± 0.37 bd	0.52 ± 0.03 b	1.26 ± 0.05 b	0.13 ± 0.01 d
	25	4.82 ± 0.32 d	2.39 ± 0.19 c	2.82 ± 0.11 c	3.36 ± 0.68 bc	4.14 ± 0.65 e	2.45 ± 0.18 d	0.49 ± 0.03 b	1.29 ± 0.07 b	0.13 ± 0.01 d

Results are the mean ± SE of 10 trees for each condition and are expressed in mg Cd. kg<sup>-1</sup> DW. For each organ (*i.e.* each column), different letters between two means (± SE) correspond to significant differences ( $P < 0.05$ ).

For underground biomass, Cd concentration in taproot and secondary roots was higher in HL and EL than in JL (Table 3). Indeed, when trees were exposed to 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> dry substrate, Cd concentration was significantly twice more important for HL and EL (8 - 10 mg Cd. kg<sup>-1</sup> DW in secondary roots and 4 mg in taproot) than JL (4 - 5 mg Cd. kg<sup>-1</sup> DW in secondary roots and 2 in taproot). Statistical analysis indicated that there was no difference between both Cd treatments for Cd concentration in taproot of the 3 larch species and in EL secondary roots. However, when Cd concentration in soil increased, the Cd concentration in secondary roots doubled in HL and increased by 28 % in JL.

### 3.4. Comparison of Cd concentration in aerial and underground biomass in larches

Results showed that JL exhibited the highest Cd concentration in aerial biomass with 2.5 - 2.7 mg Cd. kg<sup>-1</sup> DW (Fig. 2A).



**Fig. 2.** Concentration of Cd in two-year-old larches exposed for 9 months to this TE. The concentration was measured in aerial (A) and underground (B) organs of hybrid larch (HL), European larch (EL) and Japanese larch (JL). Control trees and trees treated with 12.5 and 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> dry soil correspond to white, grey and black bars, respectively. The means  $\pm$  SE correspond to 10 trees and different letters between two means correspond to significant differences ( $P < 0.05$ ).

Cd concentration in HL was significantly higher than in EL for the treatment with 12.5 mg Cd. kg<sup>-1</sup> dry soil but for a higher Cd exposure (*i.e.* 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> dry soil) HL and EL had a similar Cd concentration in aboveground biomass with a value of 2 mg Cd. kg<sup>-1</sup> dry soil. For root system, results showed that for each larch species there was no significant difference between both Cd treatments (Fig. 2B). However, JL had a significantly lower Cd concentration

than HL and EL with less than 4 mg Cd. kg<sup>-1</sup> DW against 5.5 - 7 and 8 - 10 mg. kg<sup>-1</sup> DW for HL and EL, respectively.

### 3.5. Efficiency of Cd phytoextraction by larch species

When comparing the 3 larch species, results showed that JL had the highest TF with values of 0.78 and 0.67 when trees were exposed to 12.5 and 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> dry soil, respectively (Table 4).

**Table 4.** Comparison of efficiency between hybrid larch (HL), European larch (EL) and Japanese larch (JL) for Cd phytoextraction after 9 months of exposure.

Larch species	[Cd] <sub>soil</sub> (mg. kg <sup>-1</sup> )	TF	BF	Cd amount in underground organs (µg per plant)	Cd amount in aerial organs (µg per plant)
HL	12.5	0.32	0.14	92.6 ± 11.8 a	42.9 ± 4.7 a
	25	0.28	0.08	127.6 ± 13.6 ab	58.8 ± 7.0 b
EL	12.5	0.18	0.11	113.7 ± 19.1 ab	29.9 ± 2.2 c
	25	0.18	0.07	157.2 ± 29.7 b	37.8 ± 3.9 a
JL	12.5	0.78	0.22	37.2 ± 4.8 c	80.0 ± 9.7 d
	25	0.67	0.10	47.9 ± 5.6 d	73.7 ± 7.5 bd

Results are the mean ± SE of 10 trees for each condition. For Cd amount in aerial and underground organs, different letters between two means (± SE) correspond to significant differences ( $P < 0.05$ ).

The TF for HL and EL was lower with values around 0.3 for HL and lower than 0.2 for EL whatever the initial Cd concentration in soil. The BF of JL was 0.22 when trees were treated with 12.5 mg Cd. kg<sup>-1</sup> dry soil and 0.1 with the condition 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> dry soil. The BF was lower for the other larch species with values of 0.11 and 0.14 with 12.5 mg Cd. kg<sup>-1</sup> dry soil for EL and HL, respectively, and between 0.07 and 0.08 for the treatment with 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> dry soil. When calculating the final Cd amount accumulated in trees of each larch species, the results showed a higher amount in root system than in aerial biomass for HL and EL (2 and 4 times more, respectively) whereas JL stored more Cd in aboveground organs (1.5 to 2 times more). Moreover, the total Cd amount in aerial organs was more important in JL (70 - 80 µg) than in HL (40 - 50 µg) and EL (30 - 40 µg).



#### 4. Discussion

Results showed that Cd did not affect significantly the growth of the 3 larch species in terms of trunk height and total biomass of aboveground and underground organs. In addition, the percentage of biomass of each organ (compared to the total biomass) was not modified. It was reported that the lower Cd concentration affecting leaves or shoots is between 3 and 10 mg Cd. kg<sup>-1</sup> DW (Balsberg Pålsson, 1989). Thus, the lack of effect on larches was not surprising as Cd concentration in needles was lower than 3 mg. kg<sup>-1</sup> DW in the 3 larch species and Cd concentration in the whole aerial organs was around 2 mg. kg<sup>-1</sup> DW in HL and EL and between 2.5 and 3 mg. kg<sup>-1</sup> DW for JL. Cd concentration was higher in underground organs for both Cd treatments but underground biomass was not significantly modified, suggesting that the 3 larch species were not affected by the Cd treatments. JL had a higher aerial biomass than HL and EL and may thus be more interesting for Cd phytoaccumulation as aerial biomass production is one of the factors to take into account for an efficient Cd extraction and accumulation (Yang et al., 2015). Total aerial biomass of JL was around 30 g DW after 3 years (2 years without exposure and one growing season on Cd-contaminated soil in greenhouse). This is in the same range as a Japanese hybrid larch (*L. gmelinii* var. *japonica* × *L. kaempferi*) at the same age which is considered as a very resistant hybrid with dry aerial biomass between 30 and 40 g as a function of N nutrition (Watanabe et al., 2011). In addition, a comparison between two-year-old poplars (*Populus canadensis*) and larches (*Larix olgensis*) grown from May to autumn on soil contaminated with Cd, Cu, and Zn showed that total biomass of larches was not modified compared to the controls whereas poplar biomass was reduced by 26 % (Wang and Jia, 2010). The authors concluded that poplars remained more suitable than larches for TE phytoextraction on this soil but their results suggest that *L. olgensis* would be more tolerant than *P. canadensis* to several TE and may be an interesting species to test on soils with higher TE concentrations than those used by the authors. In addition, the authors studied the Cd accumulation for one growing season. Phytoextraction with trees takes a longer time as trees are grown 3 - 5 years under short rotation coppice systems (Vassilev et al., 2004). It is thus possible that after several years, poplar biomass could be highly reduced and poplars may be less efficient than larches for Cd phytoaccumulation.

When comparing Cd distribution in the 3 larch species, results showed that Cd concentration was higher in underground organs than in aerial organs. This distribution was observed in most plant species including several Cd-hyperaccumulators (Unterbrunner et al.,

2007; Wang et al., 2008; Liu et al., 2009; Wang and Jia, 2010; Wu et al., 2010b). At aerial level, the lowest Cd concentrations were measured in bark and wood of the last growth year (LY bark and LY wood). This result is not surprising as plants usually accumulate more Cd in older organs to preserve young metabolically active tissues (Laureysens et al., 2004; Shi et al., 2008; De Maria and Rivelli, 2013; Parraga-Aguado, 2014). However, Cd concentration in buds of the 3 larch species was one of the highest Cd concentrations we recorded. This result could be surprising as buds contain future shoots for the following year of growth. However, we did not separate the different parts of buds and it is thus possible that Cd concentration was higher in scales than in leaf primordia and / or meristem. Data of literature related to Cd distribution in buds is poor but it was reported that embryos axes (which contain leaf primordia and meristems) can be protected against Cd by seed coat which functions as a barrier and thus limits Cd translocation (Malan et al., 2012; Shi et al., 2014).

For the other aerial organs, results indicated that Cd concentration was higher in PY barks for HL and EL (followed by branches and needles) and in branches for JL (followed by needles and then PY bark) whereas it was low in PY wood for the 3 larch species. The preferential accumulation of Cd in bark compared to wood has already been observed in conifers such as Norway spruce, Douglas fir and Silver fir and in angiosperms such as poplar, willow and birch species (Laureysens et al., 2004; Mertens et al., 2006; Österås and Greger, 2006; Gu et al., 2007; Unterbrunner et al., 2007; Gandois et al., 2010; Dai et al., 2012; Astier et al., 2014). In addition, Cd concentration in needles was not negligible, particularly for JL. The higher Cd concentration in deciduous leaves than in bark or in whole stem was previously reported in willows and poplars that is in agreement with our results related to JL (Mertens et al., 2006; Wahsha et al., 2012; Yang et al., 2015). It may thus be possible that in JL Cd was translocated to needles at the end of the growing season (*i.e.* before needle abscission) to partially remove Cd from the tree. The translocation of TE to senescent leaves in autumn has been shown by Dinelli and Lombini (1996) in willows and poplars and can be considered as a detoxification mechanism as reported by Liu et al. (2013). However, HL and EL had a lower Cd concentration in needles compared to bark and branches. It was reported that conifers such as Silver fir or *Pinus halepensis* had a low Cd concentration in needles compared to the other organs but these trees are evergreen species by contrast to larch (Gandois et al., 2010; Parraga-Aguado et al., 2014). However, the lower Cd concentration in deciduous leaves compared to bark or whole stem was reported for *Populus x canescens* and willow species (Laureysens et

al., 2004; Dai et al., 2012; Yang et al., 2015). Thus the translocation of Cd from trunk to deciduous leaves / needles may be species dependent as soil Cd concentrations indicated by previously mentioned authors were in the same range than our culture substrate (Laureysens et al., 2004; Mertens et al., 2006; Wahsha et al., 2012; Dai et al., 2012; Yang et al., 2015).

We showed that JL exhibited the highest Cd concentration in aerial biomass and the lowest Cd concentration in roots. As a consequence, TF was higher for JL with values between 0.7 and 0.8 against 0.3 for HL and 0.2 for EL. One of the conditions required for hyperaccumulators is a TF higher than 1 (Wahsha et al., 2012). This was not the case for JL but the values of TF we recorded were quite promising. A comparison of many species, hybrids and clones of willows highlighted that the clone accumulating the highest amount of Cd in shoots had a quite low TF around 0.5 whereas other clones with a TF higher than 1 stored lower amounts of Cd (Yang et al., 2015). The authors showed that TF was not the only criteria for phytoaccumulation and that aerial biomass was important to take into account. Indeed, there is a dilution effect in species with a high growth rate: Cd concentration can be moderate in plant organs but a high biomass allows storing a high amount of Cd. In our case, as JL had a higher aerial biomass and a higher TF, Cd amount in shoots was more important in this species than in the two others. This amount corresponded to more than 60 % of total Cd stored in the trees whereas HL and EL had only 30 and 20 % of Cd accumulated in aerial organs, respectively. However, Cd accumulated in aerial biomass of JL (around 80  $\mu\text{g}$  per tree at the end of experiments) remained low compared to other tree species used for Cd phytoextraction. For example, one-year-old hybrid poplars (*Populus deltoides*  $\times$  *P. nigra*) grown for one season on soils containing 4 - 4.5  $\text{mg Cd. kg}^{-1}$  dry soil had a shoot Cd amount per tree between 240 and 300  $\mu\text{g}$  (Wu et al., 2010b). In this study, poplars were 2 years old at the end of experiment (thus younger than larches in our experiments) and their aerial biomass was between 30 and 80 g DW according to soil composition.

Another parameter required for phytoextraction is a high BF. For hyperaccumulators, this BF is higher than 1 that was not the case for our larch species as the highest BF (obtained with JL) was only 0.22. Moreover, BF was lower when trees were exposed to the highest soil Cd concentration of 25  $\text{mg. kg}^{-1}$  dry soil. This can be explained by the fact that Cd concentration in shoots did not increase as fast as Cd concentration in soil: when Cd treatment increased from 12.5 to 25  $\text{mg. kg}^{-1}$  dry soil the shoot Cd concentration increased only by 10 - 25 % for HL and

EL and tended to decreased for JL (even if difference was not significant). This low increase may be due to the low phytoavailability of Cd. Indeed, the exchangeable fraction (*i.e.* Cd extraction by CaCl<sub>2</sub> and Rhizo-A) was around 20 % at the beginning of treatment but represented only 1 - 1.5 % of total Cd at the end of the growing season whatever the initial Cd treatment. The decrease in Cd phytoavailability as a function of time can be partly explained by the Cd absorption by larches. However, this decrease may be due in parallel to an ageing effect described by Zapusek and Lestan (2009) and confirmed by Astier et al. (2014). Indeed, Astier et al. (2014) used the same substrate than in our experiments (and supplemented with Cd) and reported that Cd concentration in CaCl<sub>2</sub> fraction decreased after 1 to 2 months although pots did not contain trees. In addition, it is probable that in our experiment, larch root exudates and / or microorganisms modified soil characteristics and thus Cd mobility during the growth season or at the end of this period (Dong et al., 2007; Shi et al., 2011). Indeed, we observed that soil pH value was 5.7 - 5.8 at the beginning of experiment and around 6.2 - 6.5 after 9 months of exposure to Cd. Moreover, it was reported that phytoextraction by trees is not regular during growing season as TE concentration is higher in trees during the early vegetative growth stage due to a higher uptake of nutrients for growth enhancement (Liu et al., 2013). In our experiment, the decrease of nutrient uptake at the end of the growing season and a putative quantitative and / or qualitative modification of root exudates may thus have influenced soil pH and Cd phytoavailability.

Furthermore, the mobile pool of Cd in soil can be obtained after incubation with EDTA. EDTA is known to solubilize TE bound to organic matter and carbonates (Kashem et al., 2007; Olaniran et al., 2013) but several authors indicated that this method overestimates the real value of labile Cd as EDTA dissolves a part of Cd strongly bound to soil Fe and Mn hydroxides (Bakircioglu et al., 2011; Ivezić et al., 2013). In our study, the percentage of Cd extracted by EDTA suggested that around 30 - 40 % of total Cd amount (or less according to the potential overestimation related to EDTA) would be potentially mobile in soil. This result thus indicated that a large amount of Cd in the substrate was not available for larches that would be a limiting factor for an efficient Cd phytoextraction. Moreover, as previously indicated for CaCl<sub>2</sub>- and Rhizo-A fractions, the Cd decrease observed in EDTA-fraction between the beginning of experiment and 9 months later may be due to an ageing effect and / or soil modifications by root exudates and / or microorganisms. The Cd phytoextraction process would thus require regular amendments to solubilize Cd in soil for an optimal absorption by larches.

## 5. Conclusion

The results showed that JL was more efficient than HL and EL for Cd phytoextraction as JL had the highest aerial biomass and Cd concentration in aerial organs as well as the highest values for TF and BF. However, biomass and Cd amount after 9 months remained too low to consider that JL can be a relevant model without improvement of the process. Indeed, poplar and willow species are already used for Cd phytoextraction and their efficiency is better when amendments and fertilizers are added to promote their growth and Cd bioavailability (Fischerová et al., 2006; Liu et al., 2013; Xu et al., 2015). Further studies have thus to focus on larch growth stimulation and improvement of Cd mobility in soil by testing amendments, mineral supplements and maybe plant-associated bacteria or mycorrhiza even if symbioses with microorganisms are not always efficient for phytoextraction (Liu et al., 2013; Sessitsch et al., 2013; Saladin, 2015).

## Acknowledgments

Amandine Bonet was supported by a PhD grant from the region Limousin (France). The authors thank Christelle Gady (LCSN EA 1069, University of Limoges) for her significant contribution to larch plantations, treatments, watering and harvests.

*N.B. : Les références bibliographiques de cette publication ont été reportées à la fin du manuscrit (avec l'ensemble des autres références bibliographiques).*

## Synthèse des principaux résultats obtenus

Les résultats de ces travaux sur les arbres ne montrent aucun effet significatif sur la croissance chez les mélèzes exposés au Cd par rapport aux mélèzes témoin, et ceci, quelle que soit l'espèce de mélèze concernée.

Concernant la distribution du Cd, le ME et le MH présentent une répartition assez proche au niveau des organes aériens : les organes les plus concentrés en Cd sont par ordre décroissant les écorces des deux premières années de pousse et les bourgeons puis les ramifications et les aiguilles. Chez le MJ, la répartition est un peu différente car les organes les plus concentrés en Cd sont les ramifications, les bourgeons, les aiguilles puis les écorces des deux premières années de pousse.

Par ailleurs, le MJ a une concentration en Cd dans les parties aériennes supérieure aux autres mélèzes avec 2,5 à 2,7 mg Cd. kg<sup>-1</sup> MS contre moins de 2 mg Cd. kg<sup>-1</sup> MS pour le ME et le MH. En parallèle, la concentration en Cd dans les racines est moins importante chez le MJ, ce qui a pour conséquence un facteur de transfert (FT) plus élevé pour cette espèce avec une valeur approchant 0,8 alors que le FT est de l'ordre de 0,3 pour le MH et de moins de 0,2 pour le ME.

Au final, pour des expositions à 12,5 et 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup>, les résultats ont montré que le MJ accumule plus de Cd dans ses parties aériennes (70 à 80 µg) que le MH (40 à 60 µg) et le ME (30 à 40 µg). Cependant, comme le révèlent ces valeurs, les quantités stockées sont faibles.



## **RESULTATS - *Deuxième partie***

### **Identification de composés potentiellement impliqués dans le piégeage du Cd**

Dans cette partie, nous avons cherché à savoir quels étaient les composés pouvant être impliqués dans le piégeage du Cd. Cet ET pouvant être séquestré à la fois au niveau intracellulaire et extracellulaire, nous avons donc étudié des chélateurs possibles dans chacun de ces compartiments.

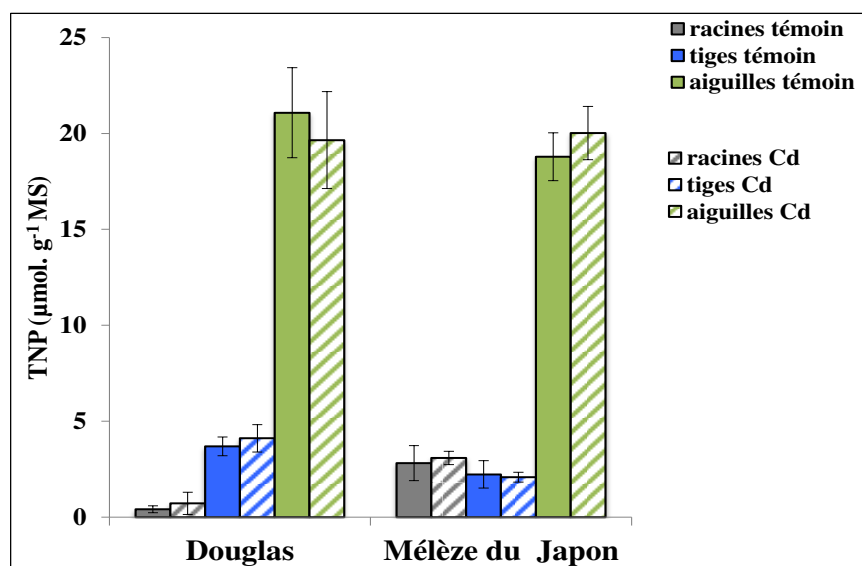
#### **I. Piégeage du Cd au niveau intracellulaire**

##### **1. Effet du Cd sur la production des thiols totaux non protéiques**

Les groupes thiols (SH) sont présents au niveau de la cystéine libre et dans des oligopeptides (glutathion, phytochélatines) ou les protéines. Après précipitation des protéines lors de l'extraction, les groupes thiols non protéiques (TNP) capables de piéger potentiellement le Cd (à savoir les thiols des cystéines libres, de la glutamylcystéine, du glutathion et des phytochélatines) ont été quantifiés. Ce dosage a été effectué dans les différents organes de plantules de Douglas et de MJ. Il n'a malheureusement pas été possible de le faire sur les plantules de ME en raison de quantité de MF trop faible.

Les résultats présentés dans la figure 53 montrent que le Cd n'a pas eu d'effet significatif sur la teneur en TNP. En effet, quel que soit l'organe considéré et l'espèce de conifère, nous n'avons pas observé de différence entre les témoins et les plantules exposées au Cd. Bien que non significative, la seule différence notable est une teneur en TNP plus importante dans les racines du MJ par rapport au Douglas (pour les plantules témoins et les plantules exposées au Cd) et une teneur en TNP plus importante dans les tiges de Douglas par rapport au MJ. La concentration en TNP dans les aiguilles est quant à elle similaire entre les deux espèces de conifère.





**Figure 53.** Effet du Cd sur la teneur en thiols non protéiques totaux (TNP) dans les différents organes des plantules. Les plantules de Douglas et de mélèze du Japon ont été exposées à 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> de sol sec (condition Cd) ou non (témoin) pendant deux mois. Les résultats correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes ± l'erreur standard. L'absence de lettre en minuscule au-dessus des barres d'histogramme indique qu'aucune différence significative n'a été observée.

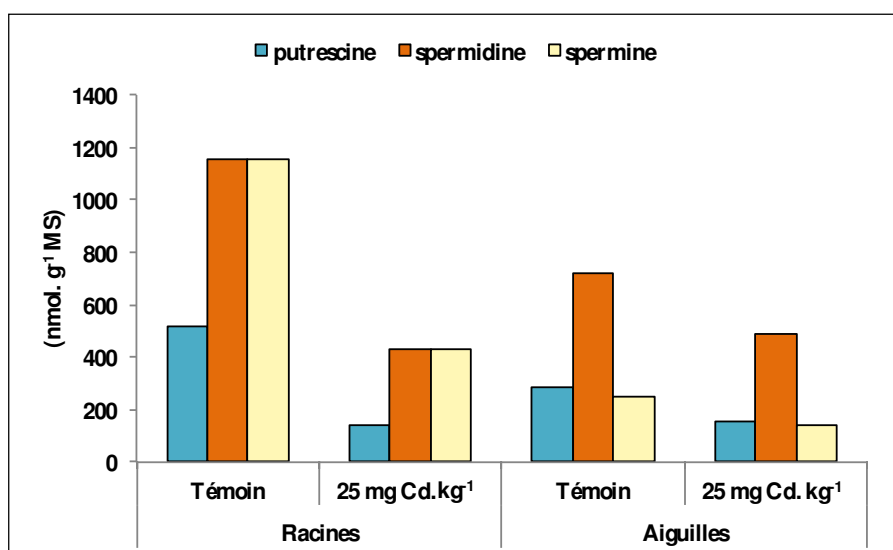
De ce fait, nous pouvons en déduire que les TNP ne seraient pas ou peu impliqués dans la chélation du Cd. D'autres mécanismes de tolérance au Cd sembleraient donc être mis en jeu comme le piégeage par des polyamines.

## 2. Effet du Cd sur la teneur en polyamines

Les polyamines libres les plus répandues chez les végétaux, c'est-à-dire la putrescine (Put), la spermidine (Spd) et la spermine (Spm) ont été quantifiés à partir d'un seul ou de deux lot(s) de plantules. Ce dosage est à ce stade indicatif. De plus, il n'a été effectué que chez le MJ au niveau des aiguilles et des racines. Ce dosage a été réalisé au sein du Groupe de Recherche en Physiologie Végétale de l'Université de Louvain-la-Neuve (Belgique).

Quel que soit le type de polyamine, les résultats indiquent que les concentrations sont généralement plus élevées dans les racines que dans les aiguilles, que ce soit chez les plantules témoins ou chez les plantules exposées au Cd (figure 54). Au niveau racinaire, les résultats obtenus montrent que les teneurs en Spd et Spm sont 2 à 3 fois plus importantes que la teneur en Put à la fois dans les plantules témoins et celles traitées au Cd. Au niveau des aiguilles, les résultats suggèrent une tendance similaire pour la Spd par rapport à la Put (dans les plantules

témoins et celles exposées au Cd) mais ici, la teneur en Spm est du même ordre de grandeur que celle de la Put.



**Figure 54.** Effet du Cd sur la teneur en polyamines (putrescine, spermidine et spermine) dans les aiguilles et les racines de plantules de mélèze du Japon. Les plantules ont été exposées à 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> de sol sec pendant deux mois. Pour les aiguilles, les résultats correspondent à la moyenne de 2 expériences indépendantes tandis que pour les racines, les résultats ne correspondent qu'à une seule expérience.

Le traitement au Cd ne semblerait donc pas modifier les proportions entre les trois polyamines que ce soit dans les racines ou dans les aiguilles. Cependant, ces premiers résultats suggèrent que le Cd provoquerait une diminution de la teneur de chaque polyamine avec une réduction moyenne de 40 % dans les aiguilles et de 65 % dans les racines. Une telle conclusion devra toutefois être confirmée par des dosages supplémentaires.

## II. Adsorption du Cd au niveau pariétal

Comme déjà mentionné, les pectines de la paroi cellulaire peuvent être un lieu de séquestration du Cd. Nous avons donc étudié ces pectines d'un point de vue quantitatif et qualitatif sur les 3 espèces de mélèze. Cette étude a porté sur le bois et les écorces de dernière année, c'est-à-dire l'année au cours de laquelle les mélèzes ont été exposés au Cd. Le but était de voir si ces organes néoformés subissaient des modifications en réponse au traitement. Des travaux antérieurs ont été réalisés au laboratoire sur le Douglas (Astier, 2010) dans les mêmes conditions que pour les mélèzes mais ces travaux n'ont pas porté spécifiquement sur l'année

d'exposition au Cd mais sur l'ensemble du bois et des écorces du tronc. Nous avons tenté de réaliser sur le Douglas la même approche que pour les mélèzes mais nos plantations se sont mal acclimatées. Les résultats présentés ici portent donc uniquement sur les mélèzes.

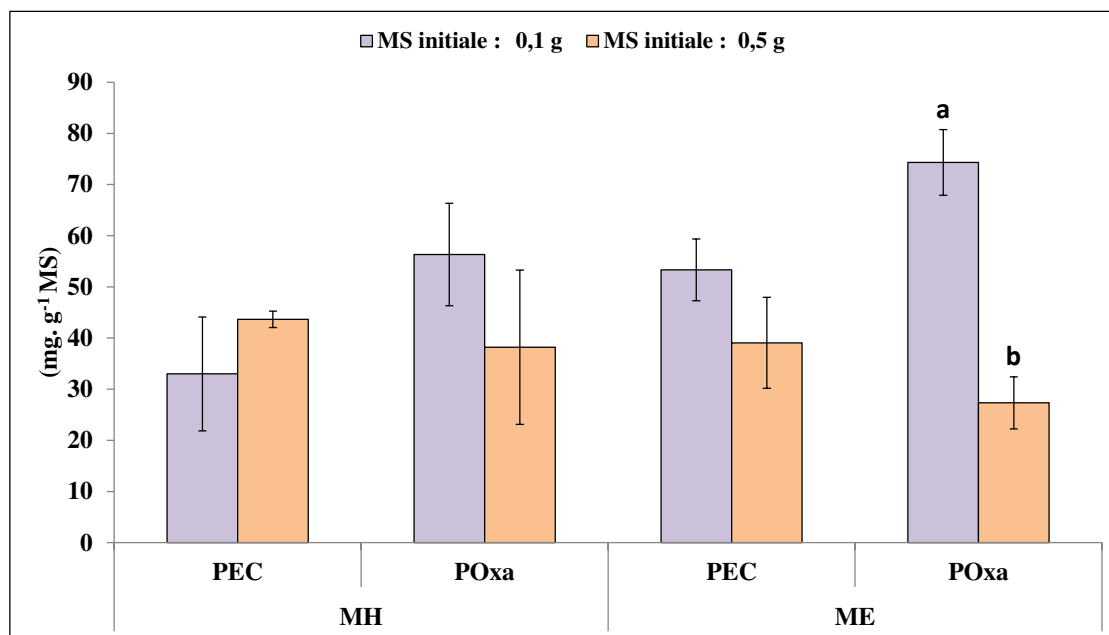
## **1. Optimisation de l'extraction des pectines pour des échantillons disponibles en faible quantité**

Une fois les premiers arbres récoltés puis échantillonnés lors de la campagne 2013, la MS des écorces et du bois des MH et des ME formés lors de la période d'exposition au Cd a été mesurée. Les MS se sont avérées limitantes dans certains cas. En effet, le protocole d'extraction de référence prévoit une MS de départ de 0,5 g par échantillon, c'est-à-dire par arbre. Par ailleurs, un minimum de 50 mg par arbre de cette même masse est également nécessaire pour le dosage du Cd. Pour le MJ, il a été possible de disposer de 3 lots de 0,5 g chacun pour le bois et pour les écorces, ce qui n'était pas le cas pour le ME et le MH, même en rassemblant plusieurs arbres.

Nous avons donc dans un premier temps, utilisé des ME et des MH dont les écorces et le bois avaient été séparés lors de la réception, c'est-à-dire avant acclimatation en serre et exposition au Cd. Les écorces et bois de ces arbres, notés T0, correspondent donc aux deux premières années de croissance à la pépinière. La quantité de MS disponible étant suffisante, nous avons donc comparé l'efficacité d'extraction et la caractérisation des pectines en partant de 0,1 ou de 0,5 g de MS. L'objectif était de vérifier qu'il était expérimentalement possible de n'utiliser que seulement 0,1 g de MS pour caractériser les pectines des bois et d'écorces néoformés en réponse au Cd pour le ME et le MH. Cette comparaison n'a été effectuée que sur les écorces car l'étude antérieure sur les sapins de Douglas (Astier, 2010 ; Astier *et al.*, 2014) a montré des résultats similaires entre le bois et les écorces.

### **1.1. Estimation du rendement en pectines extraites**

Comme présenté dans la partie « matériels et méthodes », le protocole d'extraction des pectines prévoit tout d'abord une extraction à l'eau chaude (fraction PEC) puis une extraction à l'oxalate d'ammonium (fraction POxa).

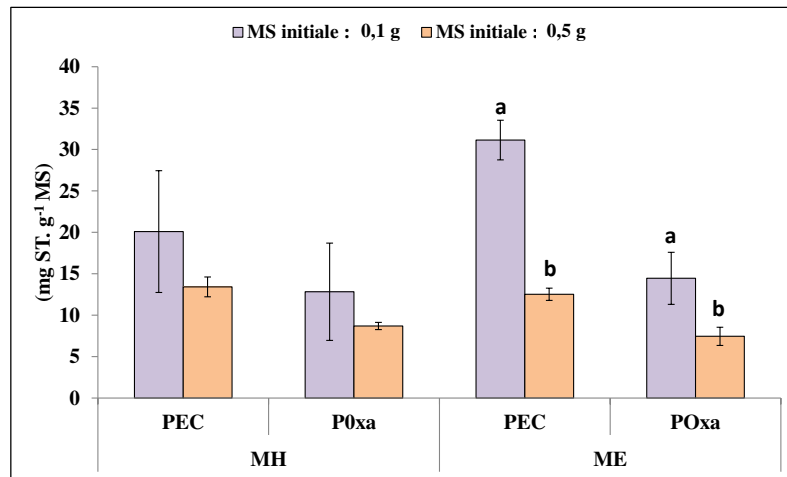


**Figure 55.** Comparaison des rendements d'extraction des pectines des écorces à T0.

Les extractions réalisées sur le mélèze hybride (MH) et le mélèze d'Europe (ME) correspondent à une MS initiale de 0,1 g (en violet) et de 0,5 g (en orange). Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 3 arbres différents. Des lettres différentes indiquent des différences significatives ( $p < 0,05$ ). L'absence de lettre en minuscule au-dessus des barres d'histogramme indique qu'il n'y a aucune différence significative entre une extraction avec 0,1 g et 0,5 g de MS.

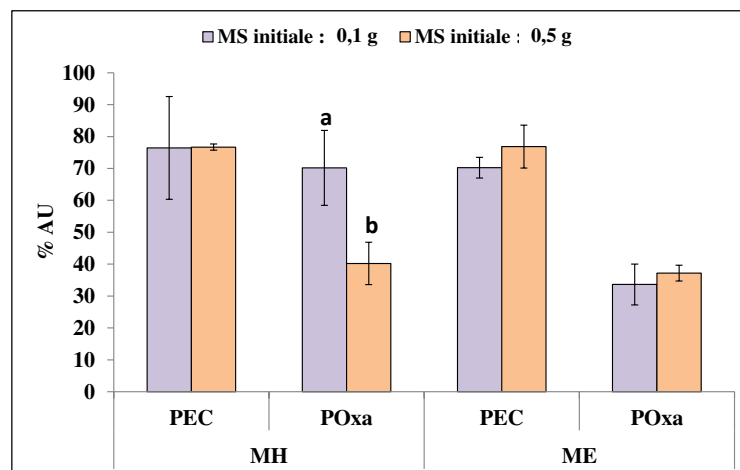
Les résultats présentés dans la figure 55 montrent que les rendements d'extraction des différentes fractions pectiques extraites à partir des écorces T0 sont globalement plus élevés avec 0,1 g de MS initiale sauf dans le cas de la fraction extraite à l'eau chaude (PEC) de MH. Néanmoins, à l'exception de la fraction pectique POxa de ME qui présente des rendements plus importants avec 0,1 g de MS de départ, les différences ne sont pas significatives.

Le rendement d'extraction peut aussi être estimé par un dosage des oses totaux dans les fractions PEC et POxa. Une fois les fractions extraites et pesées, elles ont été dissoutes dans de l'eau déminéralisée puis les sucres totaux (ST) et les acides uroniques ont été quantifiés. Les rendements d'extraction sont exprimés en mg d'oses totaux par g de MS d'écorces (figure 56).



**Figure 56.** Comparaison des teneurs en sucres totaux (ST) des différentes fractions pectiques à T0. Les extractions réalisées sur le mélèze hybride (MH) et le mélèze d'Europe (ME) correspondent à une MS initiale de 0,1 g (en violet) et de 0,5 g (en orange). Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 3 arbres différents. Des lettres différentes indiquent des différences significatives ( $p < 0,05$ ). L'absence de lettre en minuscule au-dessus des barres d'histogramme indique qu'il n'y a aucune différence significative entre une extraction avec 0,1 g et 0,5 g de MS.

La figure 56 montre que les fractions PEC sont plus abondantes que les fractions POxa quels que soient la masse de départ et le conifère considéré. Tout comme la tendance observée pour les rendements massiques d'extraction (figure 55), les résultats de la figure 56 nous permettent également de constater que l'extraction à partir de 0,1 g de MS conduit à des rendements plus importants en termes de teneurs en ST. Si ce résultat est une tendance pour le MH, les différences pour le ME sont quant à elles significatives pour les deux types de fractions pectiques.

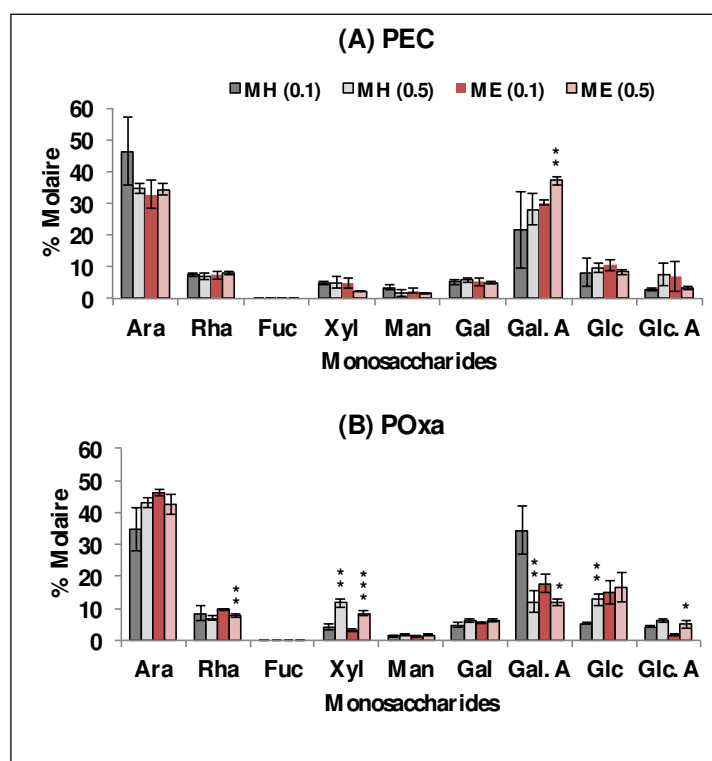


**Figure 57.** Comparaison des pourcentages d'acides uroniques (AU) des différentes fractions pectiques à T0. Les extractions réalisées sur le mélèze hybride (MH) et le mélèze d'Europe (ME) correspondent à une MS initiale de 0,1 g (en violet) et de 0,5 g (en orange). Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 3 arbres différents. Des lettres différentes indiquent des différences significatives ( $p < 0,05$ ). L'absence de lettre en minuscule au-dessus des barres d'histogramme indique qu'il n'y a aucune différence significative entre une extraction avec 0,1 g et 0,5 g de MS.

Les résultats présentés dans la figure 57 montrent qu'avec une valeur d'environ 73 %, les pourcentages d'acides uroniques (AU) des fractions PEC sont similaires quels que soient la masse de départ et l'espèce considérées. La même tendance est observable pour la fraction POxa avec environ 40 % d'AU sauf pour celle du du MH avec la MS initiale de 0,1 où ce pourcentage est presque deux fois plus important. Cette dernière valeur semble cependant surestimée par rapport aux valeurs habituellement mesurées, ce qui nécessiterait quelques échantillons supplémentaires pour confirmer le pourcentage moyen. Nos résultats suggèrent que la valeur de MS initiale (0,1 ou 0,5 g) ne semble pas influencer la valeur du pourcentage d'AU des fractions pectiques.

## 1.2. Analyse qualitative des pectines extraites

La composition monosaccharidique des fractions PEC et POxa a été comparée en fonction de la MS initiale d'écorces utilisée. Les résultats sont présentés sur les figures 58A et 58B.



**Figure 58.** Comparaison de la composition monosaccharidique des fractions pectiques à T0.

Les PEC (A) et les POxa (B) ont été extraites chez le mélèze hybride MH (teintes grises) et le mélèze d'Europe ME (teintes rouge-rose) à partir de 0,1 g et 0,5 g d'écorces. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 3 arbres différents. Les astérisques indiquent des différences significatives entre l'extraction réalisée à partir de 0,1 g et celle réalisée à partir de 0,5 g (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ ).

Ara : arabinose ; Rha : rhamnose ; Fuc : fucose ; Xyl : xylose ; Man : mannose ; Gal : galactose ; Gal. A : acide galacturonique ; Glc : glucose ; Glc. A : acide glucuronique.

Les résultats obtenus confirment la nature pectique des fractions PEC et POxa par la présence des 4 monosaccharides marqueurs des pectines : l'arabinose (Ara), le galactose (Gal), l'acide galacturonique (Gal. A) et le rhamnose (Rha). Le taux élevé de Gal. A de l'ordre de 30 % pour la fraction PEC et de 15 à 20 % pour la fraction POxa suggère la présence d'homogalacturonanes (HG). Le taux de Rha, proche de 10 %, indique que les pectines sont en partie constituées de rhamnogalacturonanes de type I (RG-I) substitués par des chaînes latérales d'arabinanes, de galactanes et / ou d'arabinogalactanes. La présence de ces chaînes est confirmée par le taux important d'Ara, de l'ordre de 35 à 45 % selon la fraction pectique, et le taux de Gal proche de 5 %. Les autres monosaccharides identifiés tels que Xyl, Fuc et Glc. A, sont des monosaccharides minoritaires des pectines parfois détectés à des taux faibles et n'excédant pas 10 %. Ces derniers entrent dans la composition des RG-II ou des xylogalacturonanes. La faible présence de Man (moins de 5 %) pourrait provenir de mannanes de réserves et / ou d'hémicelluloses de la paroi (glucomannanes et galactomannanes) ayant été co-extraits. Par ailleurs, les résultats montrent un taux de Glc non négligeable. Ce monosaccharide pourrait correspondre à des glucanes pariétaux (glucomannanes des hémicelluloses) mais pourrait aussi témoigner d'une contamination par l'amidon, suggérant alors que le traitement au DMSO n'aurait pas été complètement efficace.

Concernant les variations de composition monosaccharidique en fonction de la MS de départ, peu de différences apparaissent entre 0,1 g et 0,5 g pour la fraction PEC. Seul le taux de Gal. A est plus élevé avec 0,5 g mais aucune autre variation significativement différente n'a été détectée pour les autres monosaccharides. Par contre, concernant la fraction POxa, quelques différences notoires ont été observées lorsque la MS passe de 0,1 à 0,5 g :

- une diminution du taux de Xyl et une augmentation de celui de Gal. A pour MH et ME,
- une augmentation du taux de Rha et une diminution du taux de Glc. A pour ME,
- une diminution du taux de Glc pour MH.

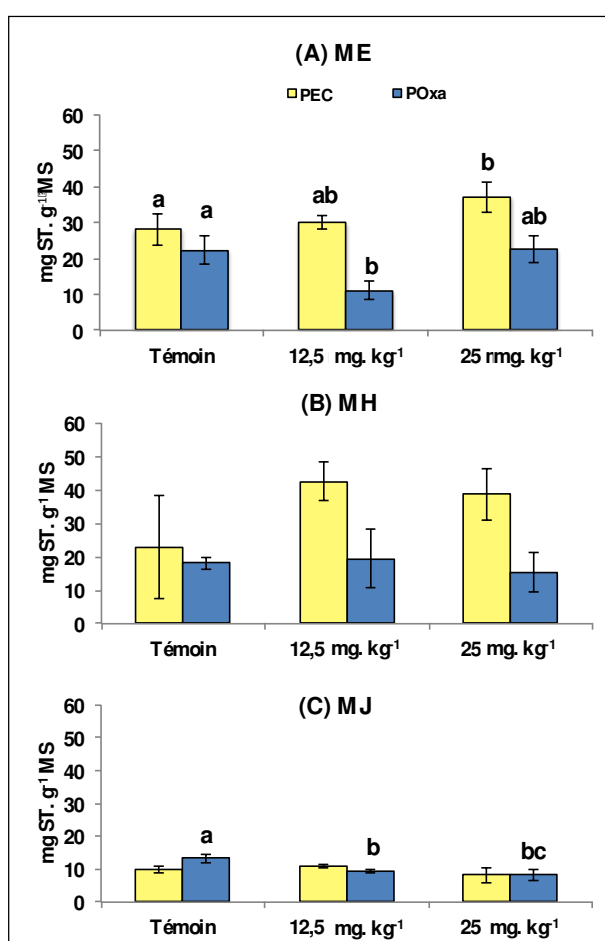
## 2. Effet du Cd sur la composition pectique des écorces et du bois néoformés

Les résultats précédents montrant assez peu de variations entre une extraction de pectines à partir de 0,1 ou de 0,5 g de MS, nous avons donc utilisé des MS initiales de 0,1 g pour les mélèzes ME et MH et de 0,5 g pour MJ pour caractériser les pectines des bois et écorces formés au cours de l'année d'exposition des arbres au Cd.

### 2.1. Effet du Cd sur la teneur en pectines et leur pourcentage d'acides uroniques

#### 2.1.1. Etude des fractions pectiques issues des écorces

Les résultats concernant la teneur en ST des fractions PEC et POxa des écorces montrent des différences significatives entre les espèces (figure 59).



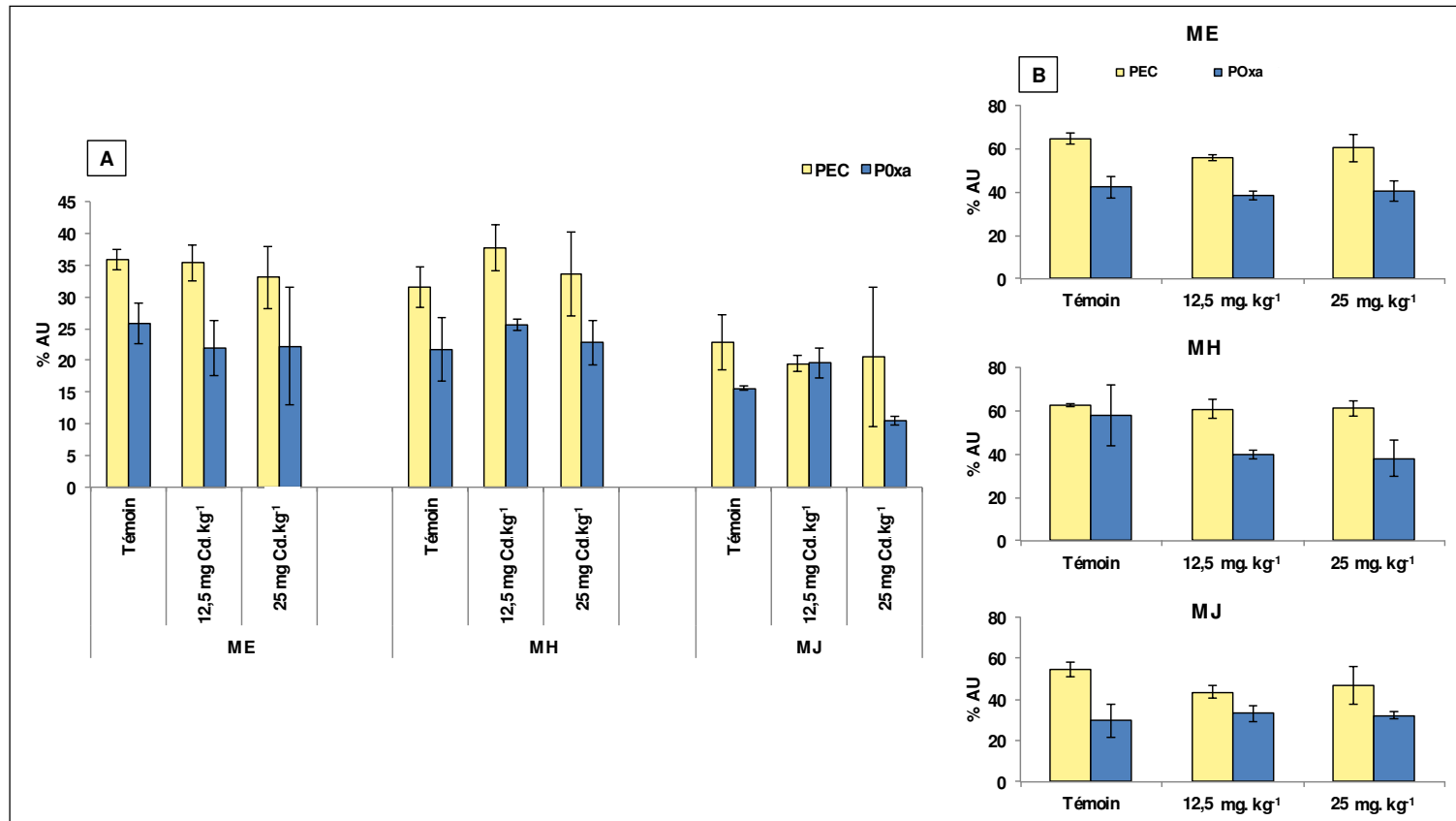
**Figure 59.** Evolution de la teneur en sucres totaux (ST) des fractions pectiques des écorces en réponse à l'exposition au Cd.

Les fractions PEC (en jaune) et POxa (en bleu) ont été extraites à partir des écorces de la dernière année de culture du ME (A), du MH (B) et du MJ (C) après exposition pendant 9 mois à 0 (témoin), 12,5 et 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> sol sec. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 3 arbres différents. Des lettres différentes indiquent des différences significatives ( $p < 0,05$ ). L'absence de lettre indique qu'il n'y a aucune différence significative entre les traitements.



Une augmentation significative de 23 % des pectines PEC a été observée chez le ME avec la plus forte concentration en Cd dans le sol (par rapport au témoin) tandis que la teneur en ST des fractions POxa est restée stable entre le témoin et la forte concentration en Cd avec une diminution transitoire en réponse à la concentration plus faible en Cd. Chez le MH, les résultats ont montré que la teneur en ST dans la fraction PEC et la fraction POxa n'a pas été significativement modifiée suite à l'exposition au Cd. Chez le MJ, la teneur en ST des PEC est restée stable mais pour la fraction POxa, cette teneur a diminué de 37 % entre la condition témoin et la forte concentration en Cd. Le MJ se distingue aussi des deux autres espèces de mélèze par le fait que ses deux fractions pectiques sont 2 à 4 fois moins riches en ST. De plus, nous avons pu constater que les fractions PEC du ME et du MH sont plus riches en ST que les fractions POxa alors qu'elles sont du même ordre de grandeur pour le MJ.

Nous avons également déterminé le pourcentage d'acide uronique (AU) dans les deux fractions pectiques selon deux méthodes : par analyse en CPG (figure 60A) (pourcentage molaire d'AU) et par dosage colorimétrique (figure 60B) (pourcentage massique d'AU). Quelle que soit la méthode employée, le Cd ne semble pas avoir eu d'effet significatif sur le pourcentage d'AU des fractions PEC et POxa pour les 3 espèces de mélèzes. Pour toutes les espèces, les pourcentages d'AU sont globalement plus importants dans les fractions PEC, suggérant une plus grande richesse en homogalacturonanes que dans les fractions POxa. Nous avons également remarqué qu'avec l'analyse par CPG, les pectines du MJ semblent légèrement moins riches en AU que celles des deux autres espèces. Même si le « profil » est conservé en regardant les résultats avec la méthode de dosage colorimétrique, le pourcentage molaire d'AU n'est pas exprimé dans la même unité selon la méthode. Par la suite, ayant étudié la composition monosaccharidique en CPG en pourcentage molaire, cette dernière sera ainsi retenue pour l'interprétation des résultats, qu'il s'agisse d'extraits pectiques des écorces ou de bois néoformés.

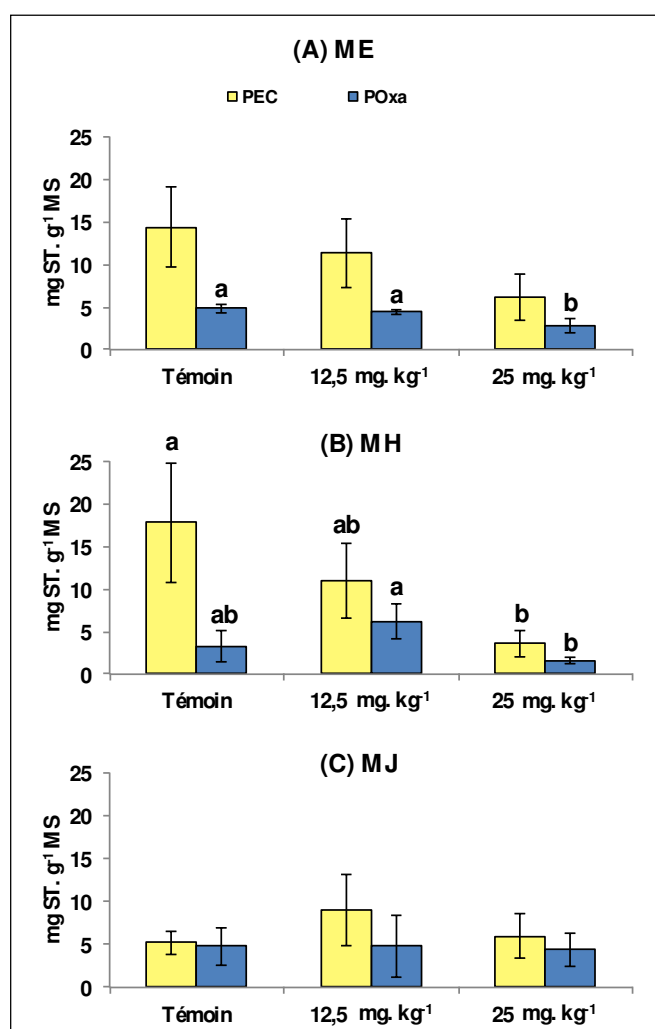


**Figure 60.** Evolution du pourcentage d'acides uroniques (AU) des fractions pectiques des écorces en réponse à l'exposition au Cd.

Les fractions PEC (en jaune) et POxa (en bleu) ont été extraites à partir des écorces de la dernière année de culture du ME, du MH et du MJ après exposition pendant 9 mois à 0 (témoin), 12,5 et 25 mg Cd.kg<sup>-1</sup> sol sec. A : analyse par CPG (pourcentage molaire d'AU) ; B : analyse par dosage colorimétrique (pourcentage massique d'AU). Les résultats sont la moyenne ± l'écart-type de 3 arbres différents. Des lettres différentes indiquent des différences significatives (p < 0,05). L'absence de lettre indique qu'il n'y a aucune différence significative entre les traitements.

### 2.1.2. Etude des fractions pectiques issues du bois

Les teneurs en sucres totaux (ST) des fractions PEC et POxa issues du bois formé lors de la dernière année de culture ont été déterminées de la même façon que pour les écorces (figure 61).



**Figure 61.** Evolution de la teneur en sucres totaux (ST) des fractions pectiques du bois en réponse à l'exposition au Cd.

Les fractions PEC (en jaune) et POxa (en bleu) ont été extraites à partir des écorces de la dernière année de culture du ME (A), du MH (B) et du MJ (C) après exposition pendant 9 mois à 0 (témoin), 12,5 et 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> sol sec. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 3 arbres différents. Des lettres différentes indiquent des différences significatives ( $p < 0,05$ ). L'absence de lettre indique qu'il n'y a aucune différence significative entre les traitements.

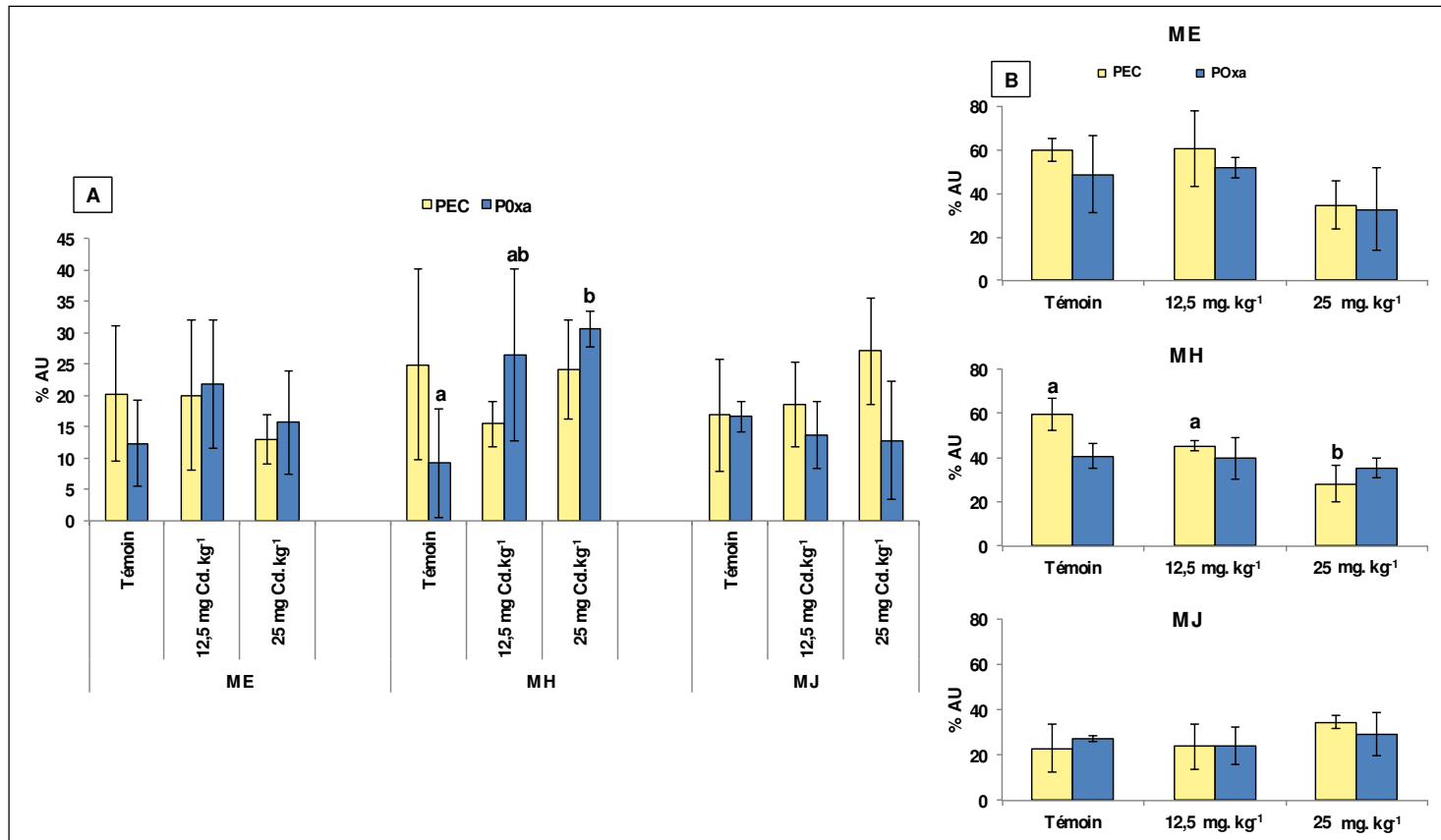
Concernant le ME, la teneur en ST dans la fraction PEC a tendance à diminuer en réponse au Cd (les différences ne sont toutefois pas significatives) et elle diminue de manière significative (de 43 %) dans la fraction POxa entre la condition témoin et la forte concentration en Cd (figure 61A). Chez le MH, la teneur en ST diminue de manière significative dans la

fraction PEC en réponse au Cd (autour de 80 % entre le témoin et la condition 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup>) tandis qu'elle semble rester à peu près stable dans la fraction POxa (figure 61B). En revanche, chez le MJ, aucune différence significative n'a été mise en évidence quelle que soit la fraction pectique (figure 61C).

Globalement, les teneurs en ST des fractions POxa semblent être du même ordre de grandeur (autour de 5 mg. g<sup>-1</sup> MS) chez les 3 espèces. Dans les fractions PEC, ces teneurs sont similaires pour le ME et le MH et supérieures aux teneurs en ST des fractions POxa. Pour le MJ, la teneur initiale en ST dans la fraction POxa est inférieure à celle des deux autres espèces de mélèzes (environ 3 fois plus faible) mais tend à se rapprocher de celles-ci en réponse à l'exposition au Cd non pas parce qu'elle augmente mais parce que la teneur en ST diminue chez le ME et le MH.

Par ailleurs, l'étude du pourcentage en acides uroniques (AU) indique que l'exposition au Cd n'a pas eu d'effet significatif sur cette teneur dans les fractions PEC et POxa du ME et du MJ (figure 62). Concernant le MH, le pourcentage d'AU diminue de manière significative dans la fraction PEC par la méthode de dosage colorimétrique (figure 62B) mais pas par la méthode CPG (figure 62A). A l'inverse, le pourcentage en AU augmente significativement dans la fraction POxa en réponse au Cd pour la méthode par CPG mais pas pour la méthode par dosage colorimétrique. Comme il a été précisé auparavant, afin de faciliter l'interprétation des résultats, ceux obtenus par analyse CPG seront donc retenus pour la discussion mais doivent être interprétés avec précaution dans ce cas car les écart-types sont importants.

Les résultats de la méthode par dosage colorimétrique indiquent que le pourcentage moyen d'AU dans les fractions PEC est équivalent à celui des fractions POxa pour les 3 espèces. Ce pourcentage est du même ordre de grandeur pour le MH et le ME mais il est environ 2 à 3 fois plus faible pour le MJ. Par la méthode CPG, les écart-types trop importants ne permettent pas de faire le même constat. Tout comme pour les écorces, la méthode par dosage colorimétrique peut surestimer les résultats obtenus en raison de la pureté des échantillons analysés, d'autres composés ayant pu être co-extraits et ainsi interférer dans ce dosage. De plus, dans la méthode d'analyse par CPG, il est également possible que le rendement de la méthanolyse ne soit pas de 100 %, faisant ainsi varier les proportions monosaccharidiques de l'analyse. Cette fois, le « profil » ne semble pas être conservé entre les deux méthodes, surtout pour le MH.



**Figure 62.** Evolution du pourcentage d'acides uroniques (AU) des fractions pectiques du bois en réponse à l'exposition au Cd.

Les fractions PEC (en jaune) et POxa (en bleu) ont été extraites à partir du bois de la dernière année de culture du ME, du MH et du MJ après exposition pendant 9 mois à 0 (témoin), 12,5 et 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> sol sec. A : analyse par CPG (pourcentage molaire d'AU) ; B : analyse par dosage colorimétrique (pourcentage massique d'AU). Les résultats sont la moyenne ± l'écart-type de 3 arbres différents. Des lettres différentes indiquent des différences significatives (p < 0,05). L'absence de lettre indique qu'il n'y a aucune différence significative entre les traitements.

En comparant le bois et écorces, les résultats suggèrent que :

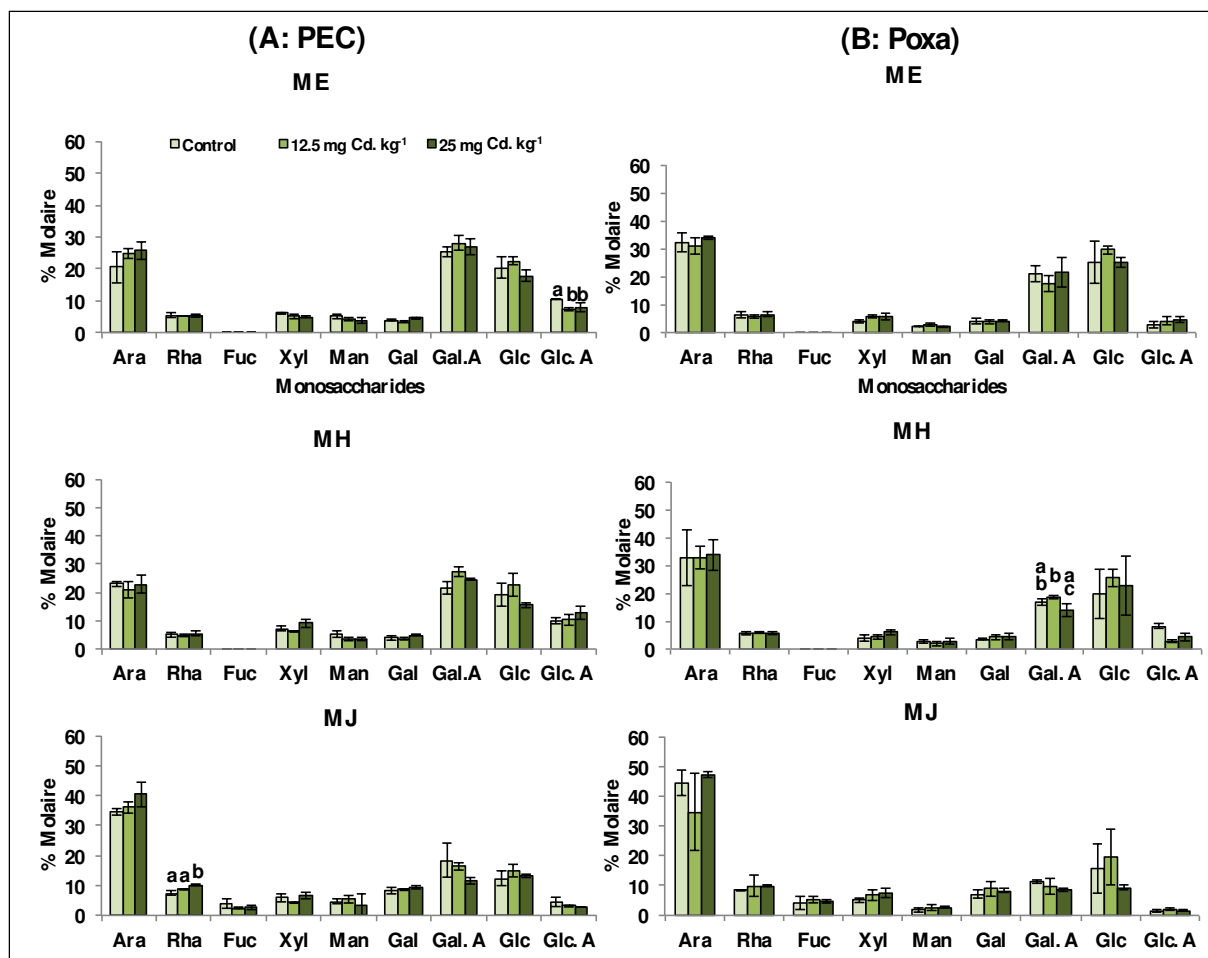
- les écorces présentent des fractions pectiques plus riches en ST que le bois. Si ce paramètre a tendance à augmenter pour les fractions PEC des écorces, une tendance inverse se dégage pour le bois plus particulièrement pour le ME et le MH.
- chez le ME, la tendance à la diminution du taux d'AU en réponse au Cd observée pour la fraction PEC de bois n'est pas observée dans les écorces.
- chez le MH, une augmentation du pourcentage en AU en réponse au Cd est observée dans la fraction POxa du bois mais pas pour les écorces.
- chez le MJ, les écorces apparaissent globalement plus riches en AU que celles du bois.

## **2.2. Effet du Cd sur la composition monosaccharidique des pectines**

### **2.2.1. Etude des fractions pectiques issues des écorces**

La composition monosaccharidique des fractions PEC et POxa des écorces est représentée sur la figure 63.

Comme précédemment, la présence majoritaire des 4 monosaccharides marqueurs des pectines (Ara, Gal, Gal. A et Rha) confirme la nature pectique des fractions PEC et POxa des 3 espèces de mélèze. Selon la fraction et l'espèce, le taux de Gal. A, de l'ordre de 10 à 27 %, traduit la présence d'homogalacturonanes (HG). Ces fractions contiendraient aussi des rhamnogalacturonanes de type I (RG-I) comme le montre la présence d'un taux de Rha de 5 à 10 %, d'un taux important d'Ara de 20 à 45 % et d'un taux de Gal variant de 5 à 10 % selon les espèces de mélèze. Le pourcentage d'Ara et de Gal indique que les RG-I seraient substitués par des chaînes latérales d'arabinanes, de galactanes et / ou d'arabinogalactanes. Les faibles taux de monosaccharides minoritaires des pectines (Xyl, Fuc, Glc. A) sont caractéristiques des RG-II et des xylogalacturonanes. Comme il a été constaté précédemment dans la composition monosaccharidique des écorces T0, la faible présence de Man (moins de 5 %) proviendrait de mannanes de réserves et / ou d'hémicelluloses de la paroi co-extraits et le taux de Glc non négligeable (environ 30 %), suggère une contamination par de l'amidon et donc que le traitement au DMSO n'aurait pas été assez efficace.



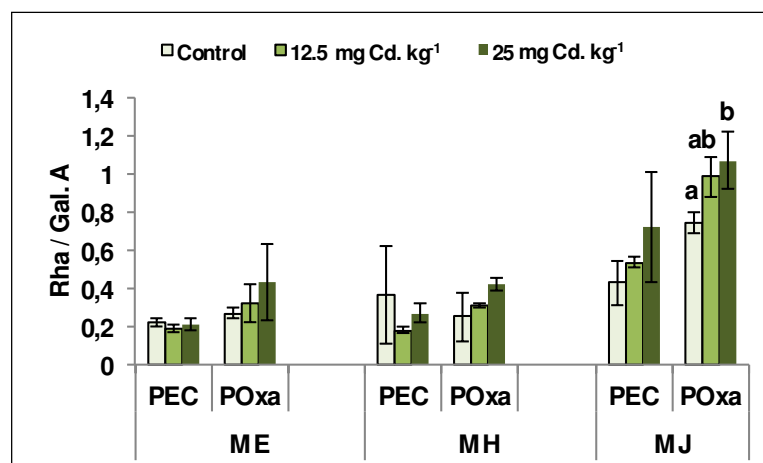
**Figure 63.** Composition monosaccharidique des fractions pectiques des écorces en réponse à l'exposition au Cd. Les fractions PEC (A) et POxa (B) ont été extraites à partir des écorces de la dernière année de culture du ME, du MH et du MJ après exposition pendant 9 mois à 0 (témoin), 12,5 et 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> sol sec. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 3 arbres différents. Des lettres différentes indiquent des différences significatives ( $p < 0,05$ ). L'absence de lettre indique qu'il n'y a aucune différence significative entre les traitements. Ara : arabinose ; Rha : rhamnose ; Fuc : fucose ; Xyl : xylose ; Man : mannose ; Gal : galactose ; Gal. A : acide galacturonique ; Glc : glucose ; Glc. A : acide glucuronique.

Le Cd ne semble pas avoir eu d'effet majeur sur la composition monosaccharidique des pectines issues des écorces. Néanmoins, nous pouvons constater une diminution significative d'environ 25 % des teneurs en Glc. A de la fraction PEC chez le ME alors que le pourcentage d'AU reste stable. Il paraît plausible que cette diminution ne se répercute pas statistiquement sur le pourcentage d'AU vu que le Glc. A est minoritaire par rapport au Gal.A. Cependant, une augmentation significative de 23 % des ST a été observée.

Par ailleurs, chez le MJ, une augmentation significative de 30 % des teneurs en Rha des PEC a été observée entre le témoin et la condition 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> bien que celui-ci ne représente que moins de 10 % du total en monosaccharide de cette fraction. Cette variation du taux de Rha

n'a cependant pas d'incidence sur la teneur en ST qui reste stable quelle que soit la teneur en Cd du sol.

Ces données peuvent être complétées par le calcul du rapport Rha / Gal. A qui constitue un indicateur de la présence des domaines de type rhamnogalacturonane (ratio proche de 1 pour des pectines riches en RG-I) (figure 64). Les résultats obtenus pour les deux fractions pectiques (PEC et POxa) montrent des ratios stables (proches de 0,3) pour des concentrations croissantes de Cd dans le sol et inférieurs à 1 chez le ME et le MH, témoignant d'une plus grande richesse en HG. La fraction PEC du MJ semble également stable quelle que soit la teneur en Cd dans le sol. Une tendance non significative à une augmentation de ce ratio est observée à partir de 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> ce qui va dans le même sens que l'augmentation en Rha pour cette même condition d'exposition au Cd. Pour la fraction POxa du MJ, l'augmentation du Cd dans le sol provoque une augmentation significative du ratio pour la condition 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> par rapport au témoin. Ce ratio est supérieur à 1, ce qui témoigne d'une structure pectique plus ramifiée (RG-I). Étonnamment, aucune variation significative des teneurs en Rha et Gal. A n'a été observée pour cette fraction, les teneurs en chaque monosaccharide semblant rester stables alors qu'une réduction globale d'environ 37 % des ST a été constatée.



**Figure 64.** Evolution du rapport Rha / Gal. A des fractions PEC et POxa des écorces en réponse au Cd. Les résultats sont la moyenne des rapports Rha / Gal. A  $\pm$  l'écart-type de 3 arbres différents. L'absence de lettre indique qu'il n'y a aucune différence significative entre les différents traitements au sein d'une même fraction.

Enfin, nous pouvons observer que les 2 fractions pectiques issues des écorces du MJ sont plus riches en Rha, Ara et Gal par rapport à celles des deux autres espèces, ce qui indique qu'elles contiendraient plus de RG-I et seraient donc plus riches en chaînes d'arabinanes, de

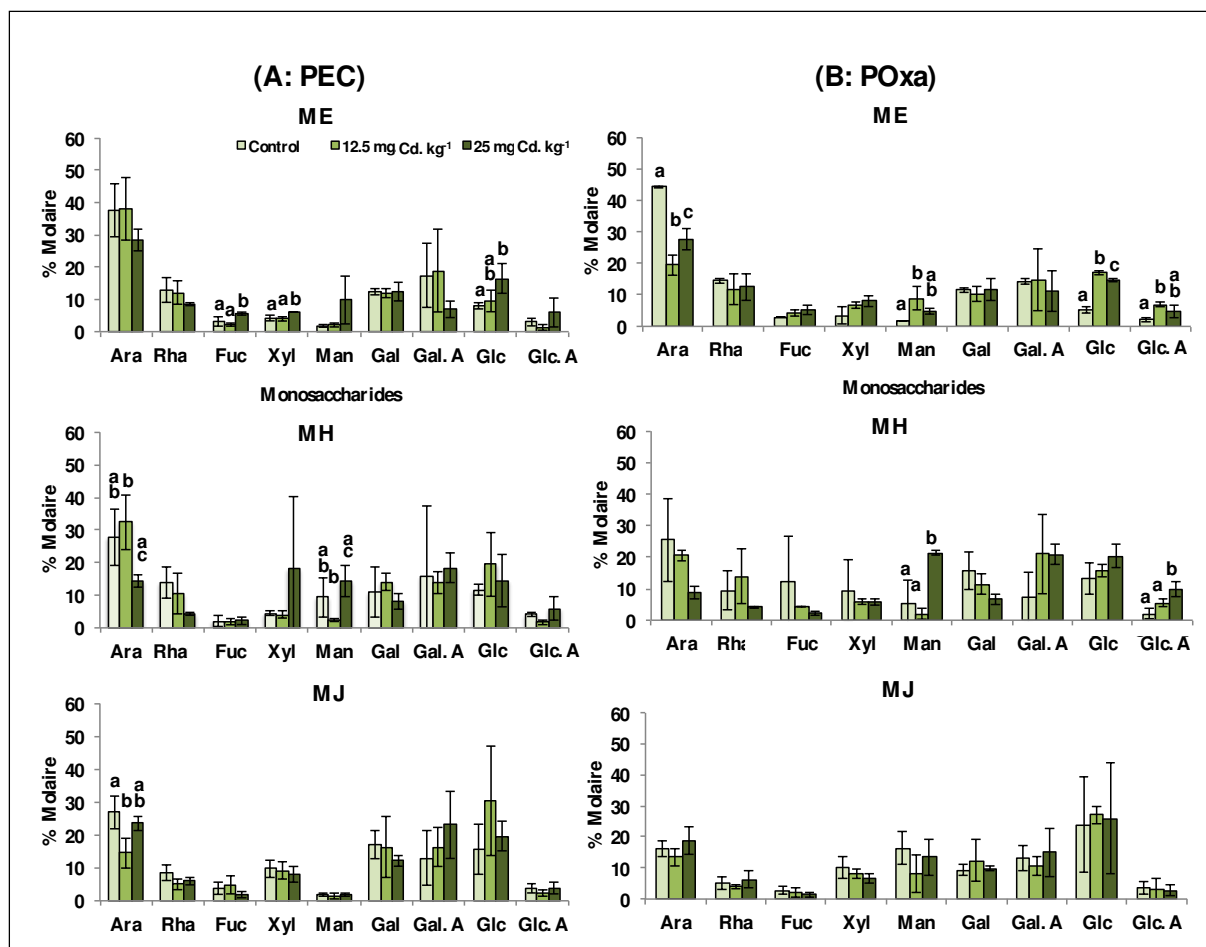


galactanes et d'arabinogalactanes. Les fractions pectiques du ME et du MH sembleraient quant à elles légèrement plus riches en Gal. A bien que ce caractère n'ait pas été relevé précédemment lors du dosage global en AU (dosage colorimétrique des acides uroniques et dosage en CPG). Pour toutes les espèces, nous avons également remarqué que les fractions PEC sont légèrement plus riches en acides uroniques que les POxa.

### **2.2.2. Etude des fractions pectiques issues du bois**

La composition monosaccharidique des fractions PEC et POxa des écorces est représentée sur la figure 65.

Comme pour les écorces, les résultats obtenus sur le bois confirment la nature pectique des fractions PEC et POxa pour les 3 espèces de mélèze par la présence des 4 monosaccharides majeurs marqueurs des pectines (Ara, Gal, Gal. A et Rha). La présence d'homogalacturonanes (HG) est marquée par le taux de Gal. A de l'ordre de 10 à 23 % selon la fraction et l'espèce. Ces fractions contiendraient également des rhamnogalacturonanes de type I (RG-I) substitués par des chaînes latérales d'arabinanes, de galactanes et/ou d'arabinogalactanes comme l'attestent les taux de Rha (5 à 15 %), d'Ara (10 à 45 %) et de Gal (10 à 20 %). Comme précédemment, les faibles taux de Xyl, Fuc et Glc. A sont caractéristiques de la présence de RG-II et de xylogalacturonanes. La présence non négligeable de Man (5 à 20 %) pourrait toujours être la cause d'une co-extraction de mannanes de réserves et de glucomannanes hémicellulosiques et la présence de Glc pourrait provenir d'une inefficacité partielle du traitement au DMSO servant à éliminer l'amidon.



**Figure 65.** Composition monosaccharidique des fractions pectiques du bois en réponse à l'exposition au Cd. Les fractions PEC (A) et POxa (B) ont été extraites à partir du bois de la dernière année de culture du ME, du MH et du MJ après exposition pendant 9 mois à 0 (témoin), 12,5 et 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> sol sec. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 3 arbres différents. Des lettres différentes indiquent des différences significatives ( $p < 0,05$ ). L'absence de lettre indique qu'il n'y a aucune différence significative entre les traitements. Ara : arabinose ; Rha : rhamnose ; Fuc : fucose ; Xyl : xylose ; Man : mannose ; Gal : galactose ; Gal. A : acide galacturonique ; Glc : glucose ; Glc. A : acide glucuronique.

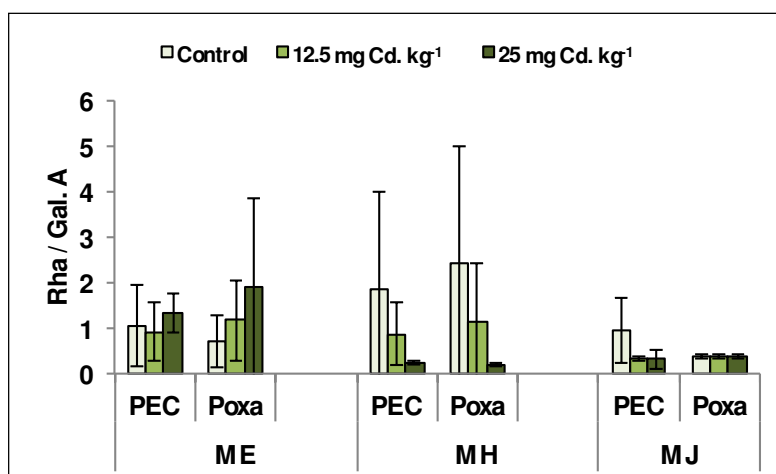
Comme pour les écorces, les variations enregistrées en fonction de la teneur en Cd du sol sont de faible ampleur mais certaines méritent toutefois d'être relevées. Ainsi, une augmentation significative des teneurs en Fuc d'un facteur 1,8 et des teneurs en Xyl d'un facteur 1,3 de la fraction PEC du ME a été observée alors qu'aucune variation des teneurs en ST n'a été mesurée en réponse au Cd. Cependant, ces deux monosaccharides représentant chacun entre 5 et 10 % des monosaccharides totaux, il est tout à fait possible que leur augmentation n'ait pas d'impact significatif sur la teneur totale en ST. Il a aussi été observé chez le ME une diminution significative de 38 % des teneurs en Ara de la fraction POxa, suggérant que les RG-I de cette fraction seraient moins substitués par des chaînes d'arabinanes. Cette diminution de teneur en Ara va dans le même sens que la réduction d'environ 40 % de la teneur en ST de cette fraction,

l'Ara étant un ose majoritaire des pectines et représentant plus de 40 % des monosaccharides constitutifs de celles-ci.

Aucune variation significative de la composition monosaccharidique des fractions PEC du MH n'a été mise en évidence alors qu'il a été précédemment constaté une réduction de 80 % de la teneur en ST. Cependant le Cd ne semble pas avoir eu d'effet sur cette fraction qu'un point de vue qualitatif, les proportions des différents monosaccharides restant stables. Concernant la fraction POxa, l'augmentation significative d'un facteur 5 de Glc. A avec la condition 25 mg de Cd. kg<sup>-1</sup> (par rapport au témoin) a pu se faire ressentir sur le pourcentage d'AU qui a augmenté significativement (méthode CPG), le Glc. A étant pourtant un acide uronique minoritaire par rapport au Gal. A. Néanmoins, les écarts-types sont importants pour de nombreux monosaccharides ce qui expliquerait l'absence de différences significatives.

Chez le MJ, les résultats montrent que le Cd n'a pas d'effet significatif sur la composition en monosaccharides, que ce soit pour la fraction PEC ou la fraction POxa.

Par ailleurs, l'augmentation des teneurs en Cd dans le sol ne semblerait pas non plus modifier significativement le rapport Rha / Gal. A (figure 66). Les écarts-types sont ici trop importants pour permettre d'extraire des informations quant aux proportions en HG et RG-I dans les fractions pectiques.



**Figure 66.** Evolution du rapport Rha / Gal. A des fractions PEC et POxa du bois en réponse au Cd. Les résultats sont la moyenne des rapports Rha / Gal. A  $\pm$  l'écart-type de 3 arbres différents. L'absence de lettre indique qu'il n'y a aucune différence significative entre les différents traitements au sein d'une même fraction.

Les fractions PEC du bois du MJ sont cependant plus riches en Xyl et moins riches en Rha que celles du ME et du MH, ce qui suggère qu'elles seraient moins ramifiées. Les deux fractions pectiques du ME sembleraient quant à elles plus riches en Ara que celles des deux autres espèces et donc sûrement plus riches en Ara au niveau du domaine RG-I. Par ailleurs, les fractions POxa du MJ contiennent moins de Rha et seraient donc moins ramifiées.

### 3. Détermination du DME des fractions pectiques

Les pectines sont caractérisées par la présence d'acide galacturonique dont les fonctions acides carboxylique peuvent être méthylestérifiées (-COOCH<sub>3</sub>). Cette substitution fait diminuer leur caractère acide et donc leur capacité à s'associer à des cations métalliques comme au niveau de structures en « boîte à oeufs » des homogalacturonanes. Il nous a donc semblé judicieux de déterminer le degré de méthylestérification (DME) des pectines extraites du bois et des écorces des mélèzes cultivés sur des sols en teneurs variables en Cd.

#### 3.1. Résultats obtenus par la méthode de dosage colorimétrique du méthanol

Les DME ont été déterminés dans un premier temps par le dosage du méthanol libéré par saponification et sont présentés dans le tableau 22 pour les pectines des écorces et dans le tableau 23 pour celles du bois.

**Tableau 22.** Degré de méthylestérification (DME) des pectines extraites des écorces des trois espèces de mélèze.

Conditions d'exposition au Cd	Échantillon	Ecorces					
		PEC			POxa		
		ME	MH	MJ	ME	MH	MJ
Témoin	1	0,5	23,6	22,6	2,7	1,3	38,1
	2	0,4	1,8	89,6	1,1	6,8	38,1
	3	1,4		35,1	0,5	0,6	32,4
12,5 mg Cd. kg <sup>-1</sup>	1	9,5	1,1	88,9	20,5	29,1	31,1
	2	44,9	2,3	41,1	33,0	43,4	32,0
	3	30,1	6,1	18,5	47,5	38,8	74,5
25 mg Cd. kg <sup>-1</sup>	1	1,4	1,8	66,6	1,0	1,0	40,7
	2	1,7	0,9	45,2	1,8	1,7	43,6
	3	33,3	1,2	61,8	0,8	3,5	64,1

L'évaluation du DME des pectines PEC et POxa a été effectuée sur 3 arbres (1, 2 et 3) pour chaque espèce de mélèze (ME, MH et MJ) pour le bois de la dernière année de croissance en serre. L'absence de valeur dans les cases grisées découle d'une quantité trop limitante d'échantillon ou d'une perte d'échantillon au cours de l'expérimentation.

Un DME élevé est souvent corrélé à une faible proportion de structure de type « boîte à œufs » au sein des pectines qui sont ainsi plus facilement extraites par l'eau chaude. Un DME faible indique au contraire une plus grande richesse en motifs d'homogalacturonanes (HG) liés grâce au calcium dans les structures type « boîte à œufs » nécessitant l'emploi de chélateur de calcium (oxalate d'ammonium) pour être extraits.

**Tableau 23.** Degré de méthylestérification (DME) des pectines extraites du bois des trois espèces de mélèze.

		Bois					
		PEC			POxa		
Conditions d'exposition au Cd	Échantillon	ME	MH	MJ	ME	MH	MJ
Témoin	1	10,2	25,7	16,4	2,4	6,9	17,5
	2	3,2	56,2	7,5	12,0	10,0	15,6
	3	3,6	5,8	8,1	0,3	11,9	34,4
12,5 mg Cd. kg <sup>-1</sup>	1	3,7	2,9	3,8	0,7		28,3
	2	0,5	4,2	20,1	0,1	0,1	27,7
	3	4,8	7,8	21,3	6,7	3,6	14,2
25 mg Cd. kg <sup>-1</sup>	1	3,9	18,5	14,5		11,5	34,5
	2	22,7		7,7	0,2	5,7	16,6
	3	6,9	14,8	11,9	16,5	2,9	6,2

L'évaluation du DME des pectines PEC et POxa a été effectuée sur 3 arbres (1, 2 et 3) pour chaque espèce de mélèze (ME, MH et MJ) pour le bois de la dernière année de croissance en serre. L'absence de valeur dans les cases grisées découle d'une quantité trop limitante d'échantillon ou d'une perte d'échantillon au cours de l'expérimentation.

Les valeurs de DME obtenues sont difficilement interprétables (tableau 23). Pour une espèce et une condition données, les 3 valeurs sont en effet souvent très différentes et certaines sembleraient même aberrantes en étant très faibles, voire même proches de zéro. Nous nous attendions à observer dans la fraction PEC des DME globalement plus élevés que dans la fraction POxa, ce qui n'est pas toujours le cas ici.

L'obtention de tels résultats pourrait provenir de problèmes rencontrés lors de l'expérimentation. En effet, nous avons pu constater que nous obtenions bien à chaque nouveau dosage une droite étalon de méthanol mais d'intensité différente pouvant aller du simple au double. Nous avons pensé dans un premier temps que le méthanol utilisé pour la gamme n'était pas de bonne qualité et avons fait plusieurs essais de gammes avec différents lots de méthanol. L'utilisation de méthanol anhydre prélevé sous atmosphère inerte s'est avérée la plus

concluante et reproductible, bien que d'un manipulateur à l'autre et d'une journée à l'autre, des faibles variations d'intensités aient pu être observées. Il est alors possible que le méthanol utilisé pour élaborer la gamme s'évapore rapidement lors de l'ouverture des tubes pour l'ajout des réactifs. Il est également possible que cela provienne d'un problème de pureté des échantillons analysés. En effet, d'autres composés ont pu être co-extraits tels que des tanins ou une faible proportion d'hémicelluloses extractibles à l'eau chaude, interférant ainsi lors du dosage colorimétrique.

N'ayant plus assez d'échantillons pour les pectines issues du bois et des écorces du MH et du ME (l'extraction s'effectuant initialement sur 0,1 g de MS), nous n'avons pas pu refaire ce protocole. Ne pouvant rien conclure avec de tels résultats, nous avons alors fait appel à une autre méthode de détermination du DME utilisant la spectroscopie infrarouge (IR) pour les échantillons du MJ restants (l'extraction des fractions pectiques se faisant initialement sur 0,5 g de MS).

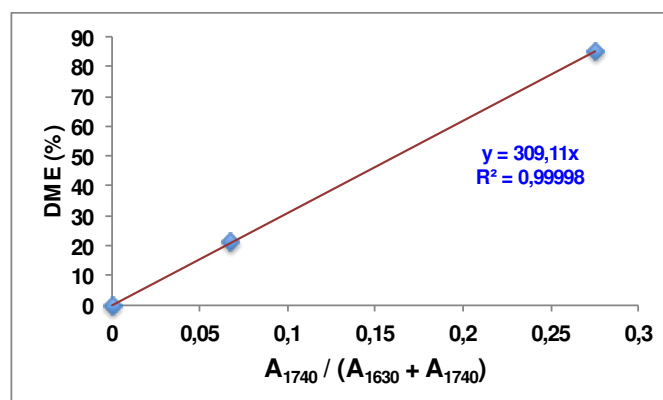
### **3.2. Résultats obtenus par la méthode infrarouge**

La spectroscopie infrarouge (IR) est connue pour être une méthode qualitative mais elle peut être utilisée pour des approches quantitatives comme la détermination du DME des pectines. Pour rappel (cf. paragraphe VI. 2.4 du chapitre « matériels et méthodes »), l'IR a été utilisée pour localiser les bandes de vibration correspondant au signal issu des carbonyles (C=O) des fonctions acide carboxylique, ester et carboxylate. Leurs signaux ont été observés pour des gammes de nombres d'onde suivantes : 1750-1735  $\text{cm}^{-1}$  pour la fonction ester aliphatique ; 1725-1700  $\text{cm}^{-1}$  pour la fonction acide carboxylique et 1550-1630  $\text{cm}^{-1}$  pour la fonction carboxylate.

Pour mémoire, 3 échantillons standards avec un DME connu ont été utilisés comme références : de l'acide galacturonique commercial avec un DME de 0 %, des pectines d'agrumes commerciales avec un DME de 85 % et un mélange de ces deux échantillons pour aboutir à un DME de 21,25 %. La détermination du DME des échantillons pectiques de bois et d'écorces du MJ s'effectue grâce à la droite obtenue à partir des échantillons standards à l'équation suivante :

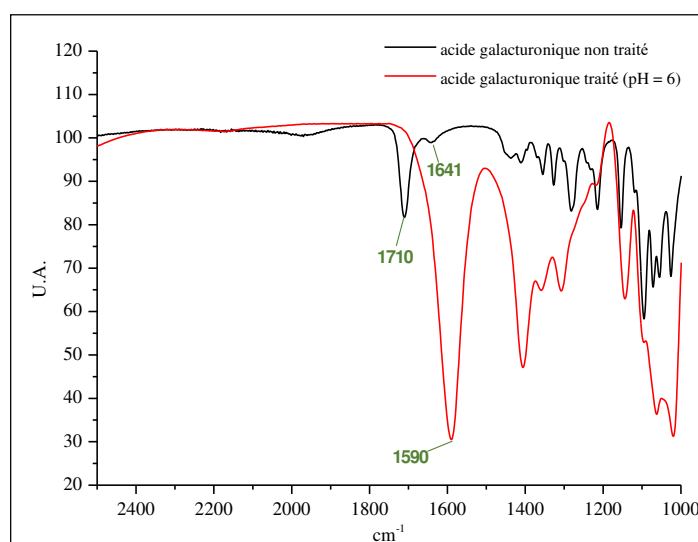
$$\text{DME} = \alpha [\text{A1740} / (\text{A1740} + \text{A1630})] \text{ (figure 67).}$$

- Avec : -  $A_{1740}$  : aire du pic à  $1740\text{ cm}^{-1}$ .  
 -  $A_{1630}$  : aire du pic à  $1630\text{ cm}^{-1}$ .  
 -  $\alpha$  : coefficient directeur de la droite d'étalonnage : 309,11



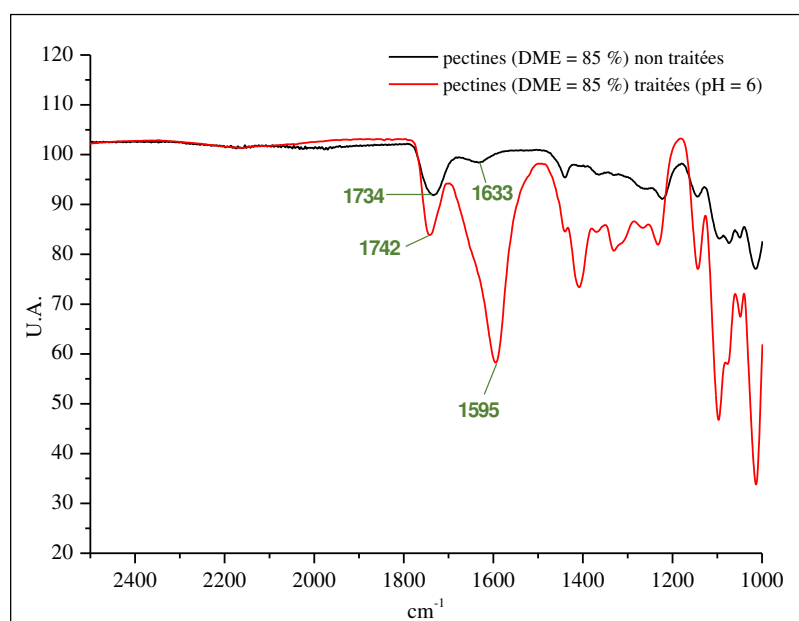
**Figure 67.** Courbe d'étalonnage permettant d'estimer le DME des échantillons à analyser. En abscisse se trouve le rapport de l'aire du pic à  $1740\text{ cm}^{-1}$  sur la somme des surfaces des pics à  $1740\text{ cm}^{-1}$  et  $1630\text{ cm}^{-1}$ , et en ordonnée se trouve le DME (%).

Nous avons analysé par spectroscopie IR en mode ATR (réflexion totale atténuée) des échantillons de la gamme de DME égal à 0 % et 85 % traités ou non à pH 6 (figure 68 et 69, respectivement).



**Figure 68.** Spectres IR en mode ATR des échantillons d'acide galacturonique (DME = 0) traités (trait rouge) ou non (trait noir) à pH 6. L'analyse s'effectue sur une gamme de nombres d'ondes comprises entre 500 et  $4000\text{ cm}^{-1}$ . La figure présente uniquement les bandes d'intérêt (situées entre 1000 et  $2500\text{ cm}^{-1}$ ).

Concernant le spectre IR correspondant à l'acide galacturonique (DME = 0) traités et non traités à pH 6 (figure 68), le spectre de l'échantillon non traité (trait noir) présente une bande à  $1710\text{ cm}^{-1}$  qui correspond aux carbonyles (C=O) des fonctions acide carboxylique (COOH :  $1725\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ ) ainsi que la présence d'une bande de faible intensité à  $1641\text{ cm}^{-1}$  correspondant à la présence de quelques fonctions carboxylate (COO<sup>-</sup> :  $1550\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ ). Après traitement à pH 6 (trait rouge), la disparition du pic à  $1710\text{ cm}^{-1}$  couplée à une augmentation du signal à  $1590\text{ cm}^{-1}$  montre bien l'ionisation totale des fonctions acide carboxylique en carboxylate (COO<sup>-</sup> :  $1550\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ ).



**Figure 69.** Spectres IR en mode ATR de pectines d'agrumes (DME = 85 %) traitées (trait rouge) ou non (trait noir) à pH 6.

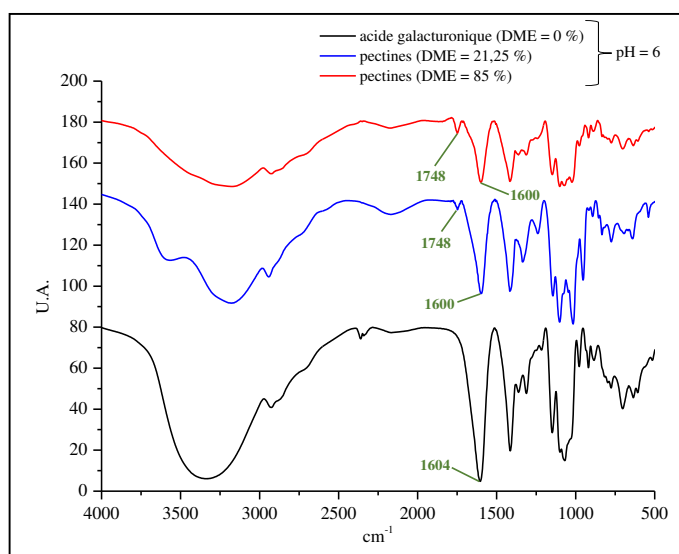
L'analyse s'effectue sur une gamme de nombres d'ondes comprises entre 500 et  $4000\text{ cm}^{-1}$ . La figure présente uniquement les bandes d'intérêt (situées entre  $1000\text{ et }2500\text{ cm}^{-1}$ ).

Concernant le spectre IR correspondant aux pectines d'agrumes (DME = 85 %) traitées et non traitées à pH 6 (figure 69), nous observons pour le non traité (trait noir) la présence d'une large bande de faible intensité à  $1734\text{ cm}^{-1}$ . Cependant, ce signal représente non pas une mais deux fonctions qui vibrent à des nombres d'ondes très proches : les carbonyles (C=O) des fonctions acide carboxylique méthylestérifiés (COOCH<sub>3</sub>) (esters aliphatiques :  $1750\text{-}1735\text{ cm}^{-1}$ ) et les acides galacturoniques (COOH :  $1725\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ ). L'échantillon standard pectique étant fortement méthylestérifié, nous pouvons supposer que ce signal est majoritairement dû aux fonctions ester. La bande de faible intensité à  $1633\text{ cm}^{-1}$  peut être attribuée à la présence de



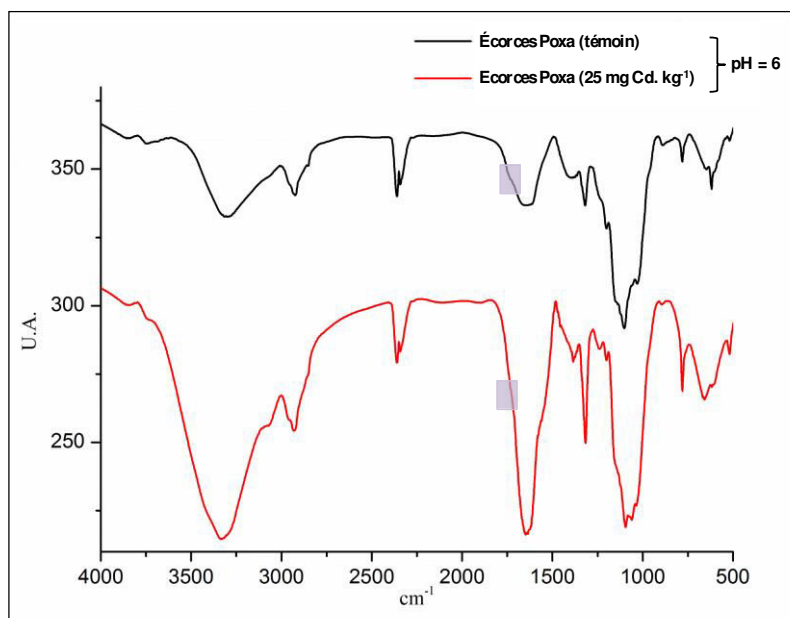
quelques fonctions carboxylate ( $\text{COO}^-$  :  $1550\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ ). Après traitement à pH 6 (trait rouge), les acides carboxyliques passent sous la forme carboxylate et le signal caractéristique du groupement  $\text{COOH}$  diminue donc fortement. Par conséquent, le pic observé, moins large et plus intense, à  $1742\text{ cm}^{-1}$  est uniquement attribuable aux groupes acide carboxylique méthylestérifiés ( $\text{COOCH}_3$ ) (esters aliphatiques :  $1750\text{-}1735\text{ cm}^{-1}$ ). Comme attendu, une augmentation d'intensité du pic à  $1595\text{ cm}^{-1}$  (caractéristique des carboxylates) est observable, démontrant l'ionisation totale des acides carboxyliques.

Ensuite, nous avons analysé en spectroscopie IR à transformée de Fourier les échantillons sous forme de pastilles constituées de 180 mg de KBr et 2 mg d'échantillon traités à pH 6. Les spectres IR obtenus ont été étudiés sur une gamme de nombres d'ondes comprise entre  $500$  et  $4000\text{ cm}^{-1}$  (figure 70). Pour le standard de DME égal à 0, nous pouvons observer les mêmes résultats que ceux obtenus en spectroscopie IR en mode ATR, c'est-à-dire l'ionisation totale des acides carboxyliques avec l'absence de bande caractéristique des acides carboxyliques (des acides galacturoniques) ( $\text{COOH}$  :  $1725\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ ) et la présence d'un pic intense à  $1604\text{ cm}^{-1}$  correspondant aux carboxylates ( $\text{COO}^-$  :  $1550\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ ). Plus le DME augmente, plus les fonctions méthylestérifiées apparaissent à  $1748\text{ cm}^{-1}$  tandis que la bande caractéristique du groupement carboxylate à  $1600\text{ cm}^{-1}$  diminue. C'est à partir de ces 3 spectres étalons que nous avons déterminé l'aire des pics à  $1740$  et  $1630\text{ cm}^{-1}$  permettant d'établir la droite d'étalonnage.

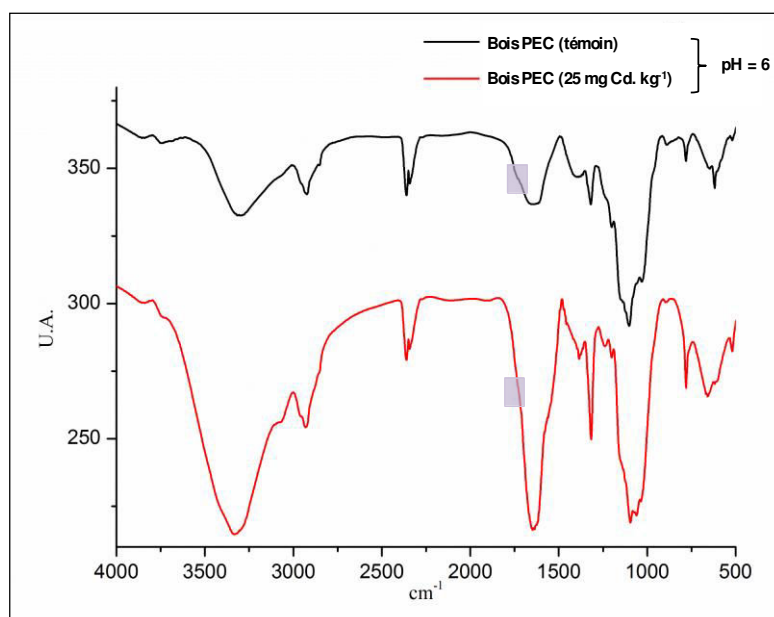


**Figure 70.** Spectres IR à transformée de Fourier des 3 échantillons étalons de DME égal à 0 (trait noir), 21,25 (trait bleu) et 85 % (trait rouge) après traitement à pH 6. L'analyse s'effectue sur une gamme de nombres d'ondes comprises entre  $500$  et  $4000\text{ cm}^{-1}$ .

Par la suite, les échantillons de PEC et POxa (des écorces et du bois de MJ) traités à pH 6 ont été analysés de la même façon que les étalons. Les spectres IR obtenus ont été étudiés sur une gamme de nombres d'ondes comprise entre 500 et 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Qu'il s'agisse de pectines PEC ou POxa extraites à partir des écorces (figure 71) ou du bois (figure 72), nous n'avons malheureusement pas pu obtenir de résultats interprétables.



**Figure 71.** Spectres IR à transformée de Fourier de 2 échantillons de pectines POxa extraites d'écorces non exposées au Cd (trait noir), et exposées à 25  $\text{mg Cd. kg}^{-1}$  (trait bleu) et 85 % (trait rouge) après traitement à pH 6. L'analyse s'effectue sur une gamme de nombres d'ondes comprises entre 500 et 4000  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figure 72.** Spectres IR à transformée de Fourier de 2 échantillons de pectines extraites du bois non exposées au Cd (trait noir), et exposées à 25  $\text{mg Cd. kg}^{-1}$  (trait bleu) et 85 % (trait rouge) après traitement à pH 6. L'analyse s'effectue sur une gamme de nombres d'ondes comprises entre 500 et 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

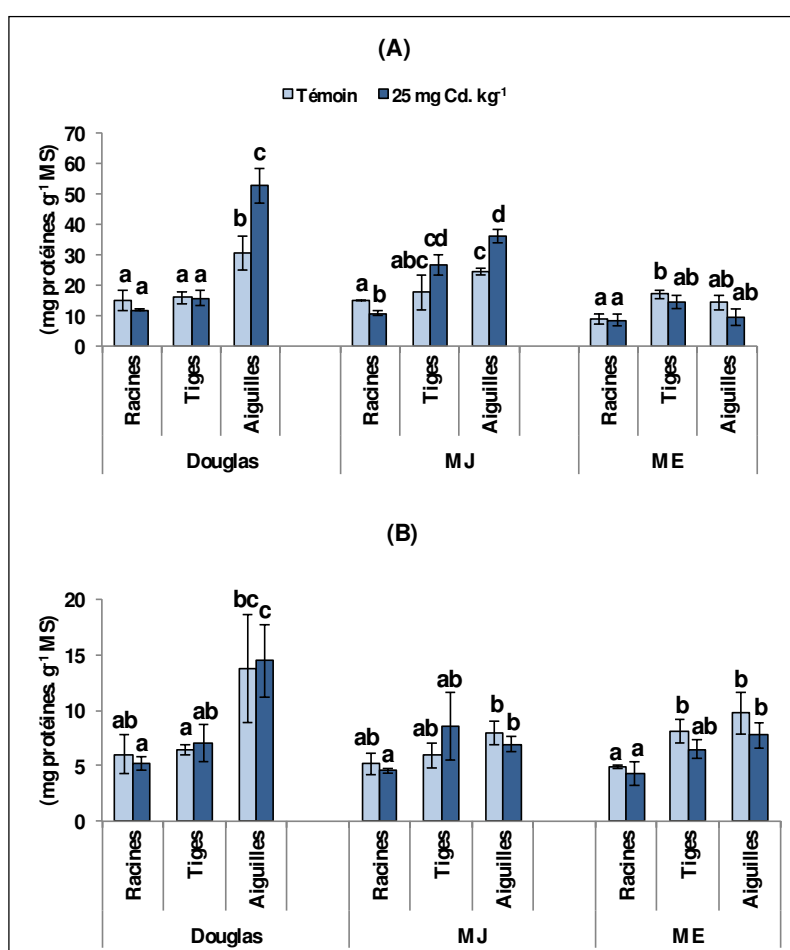
Comme attendu, la bande des carboxylates apparaît, néanmoins celle-ci a une telle intensité qu'elle masque la bande des esters qui n'apparaît plus que comme un épaulement (carré gris) et non pas un signal parfaitement découplé. Cette différence entre standards et échantillons pourrait provenir de leur environnement chimique différent. Celui-ci influence énormément la valeur du signal d'une même fonction. Par exemple, le carbonyle d'un ester apparaît entre 1725 et 1700  $\text{cm}^{-1}$  si celui-ci est lié à un motif alkyle et entre 1700 et 1680  $\text{cm}^{-1}$  s'il est lié à un motif aryle. Les pectines standards sont majoritairement constituées d'un squelette homogalacturonane (HG) dans lequel les carbonyles des acides galacturoniques méthylestérifiés ont un environnement chimique semblable. De ce fait, il est observé deux signaux bien distincts ester / carboxylate. En revanche, les échantillons ont une structure plus complexe (HG, RG-I et II) et un environnement chimique plus hétérogène. C'est pourquoi, il serait possible que les carbonyles des méthylesters et des carboxylates apparaissent à des valeurs très proches empêchant d'obtenir deux signaux bien distincts lors du traitement des spectres par le logiciel. Cela étant, il est probable que d'autres composés (tels que des tanins ou une faible proportion d'hémicelluloses extractibles à l'eau chaude pouvant interférer lors du dosage colorimétrique) aient été aussi co-extraits, rendant plus complexe l'analyse des spectres. Par ailleurs, les travaux dont nous nous sommes inspirés ont été réalisés sur des pectines issues de fruits, plus précisément de pêche (Chatjigakis *et al.*, 1998) et de papaye (Manrique et Lajolo, 2002). La structure de ces pectines de fruit est plus homogène et proche des standards utilisés contrairement aux pectines issues du bois et des écorces du MJ. Le DME n'a donc pas pu être déterminé avec cette méthode.

#### **4. Effet du Cd sur l'activité PME**

Les tissus du modèle « arbre » sont davantage lignifiés que ceux du modèle plantule ce qui rend difficile l'extraction des protéines, notamment au niveau du tronc et des racines. La mesure de l'activité PME a donc été menée préférentiellement sur les plantules en comparant le Douglas, le MJ et le ME.

Dans un premier temps, la teneur en protéines totales a été déterminée dans les aiguilles, les tiges et les racines, d'une part pour la fraction cytosolique et membranaire et d'autre part pour la fraction pariétale (figure 73).

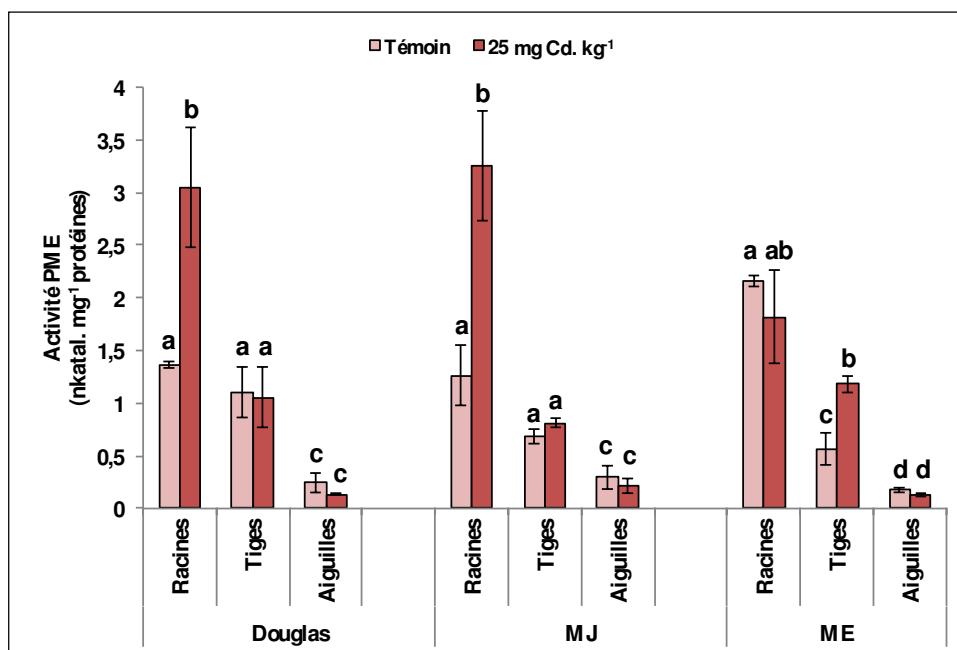
Chez le Douglas, quelles que soient la condition d'exposition et la catégorie de protéines, une teneur beaucoup plus importante des protéines dans les aiguilles a été observée comparativement à celle des tiges et des racines qui sont du même ordre de grandeur (figure 73A et 73B). Concernant les teneurs en protéines chez le MJ et le ME, les résultats ont montré un ordre de grandeur similaire entre les aiguilles et les tiges et plus élevée que dans les racines, quels que soient le traitement ou le type de protéines. Globalement, l'exposition au Cd n'a pas semblé avoir un impact net sur la teneur totale des protéines à l'exception de la teneur en protéines cytosoliques et membranaires qui a augmenté dans les aiguilles de Douglas et de MJ (de 73 % et 47 %, respectivement) par rapport aux plantules témoins.



**Figure 73.** Teneurs en protéines totales dans les différents organes des plantules.

Les protéines cytosoliques et membranaires (A) et les protéines pariétales (B) ont été quantifiées dans les aiguilles, les tiges et les racines du Douglas, du MJ et du ME après une exposition ou non au Cd pendant deux mois. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'erreur standard de 3 expériences indépendantes. L'analyse statistique a été effectuée par espèce et est basée sur la comparaison de tous les organes en condition témoin et en condition d'exposition au Cd (25 mg.kg<sup>-1</sup> sol). Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les traitements ( $p < 0,05$ ).

Le dosage direct du DME ne s'étant précédemment pas avéré concluant, l'évaluation de l'activité PME constitue une approche indirecte de l'effet du Cd sur le métabolisme des pectines et leur structure. Ainsi, les extraits contenant les protéines pariétales ont été utilisés pour réaliser le dosage de l'activité PME (figure 74). Concernant les conditions témoins, les résultats ont montré que pour les 3 espèces de conifère, l'activité PME était plus importante dans les racines puis dans les tiges et enfin dans les aiguilles.



**Figure 74.** Activité spécifique de la PME dans les différents organes des plantules.

L'activité PME a été mesurée dans les aiguilles, les tiges et les racines du Douglas, du MJ et du ME après une exposition ou non au Cd pendant deux mois. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  l'erreur standard de 3 expériences indépendantes. L'analyse statistique a été effectuée par espèce et est basée sur la comparaison de tous les organes en condition témoin et en condition d'exposition au Cd (25 mg.kg<sup>-1</sup> sol). Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les traitements ( $p < 0,05$ ).

L'exposition au Cd n'a pas modifié significativement l'activité PME dans les aiguilles, quelle que soit l'espèce testée. Au niveau des tiges, l'activité PME n'a pas été modifiée chez le Douglas et le MJ en réponse au Cd mais a été doublée chez le ME. Enfin, au niveau des racines, l'exposition au Cd a augmenté significativement l'activité PME chez le Douglas et le MJ avec une stimulation d'un facteur 2,2 et 2,6, respectivement. Le Cd a donc eu des effets différents sur l'activité PME des conifères étudiés : il a augmenté l'activité dans les tiges chez les ME et l'activité dans les racines chez le Douglas et le MJ.

## **DISCUSSION - *Première partie***

### **Effet du Cd sur la croissance des conifères et la distribution de l'ET**

#### **I. Le Cd affecte peu la croissance et le développement des plantules et des arbres**

Dans les conditions expérimentales obtenues, nos résultats ont montré que le Cd n'a pas d'impact réel sur la croissance des conifères, que ce soit pour le modèle « plantule » ou le modèle « arbre ». Ainsi les espèces de gymnospermes utilisées dans cette étude peuvent tolérer un sol modérément pollué à des stades de croissance différents. Nous pouvons supposer que la durée de culture (9 mois pour les arbres et 2 mois pour les plantules) est vraisemblablement insuffisante aux teneurs en Cd utilisées (0,1 mM Cd ou 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> de sol) pour induire des modifications morphologiques visibles. En effet, il a été rapporté que la plus faible concentration en Cd susceptible d'affecter les organes aériens se situerait entre 3 et 10 mg. kg<sup>-1</sup> MS (Balsberg Pålsson, 1989). Ainsi, l'absence d'effet du Cd sur la croissance des mélèzes (modèle arbre) n'est pas surprenante, la concentration en Cd dans les aiguilles ainsi que la moyenne pour la totalité des PA étant inférieure à 3 mg. kg<sup>-1</sup> MS dans les 3 espèces étudiées. Chez les plantules, ces concentrations étaient pourtant plus importantes dans les PA (51 et 34 mg Cd. kg<sup>-1</sup> MS pour le Douglas et le MJ, respectivement) mais ces concentrations n'ont pas affecté outre mesure la quantité de biomasse aérienne, peut-être parce que le temps d'exposition de 2 mois n'était pas suffisant pour générer de réelles réductions de biomasse.

Des diminutions de biomasse sont plus souvent détectées dans des modèles plus artificiels comme les hydroponiques ou *in vitro* comme nous avons pu le voir précédemment avec le MH pour des durées de culture plus courtes (2 et 4 semaines), des teneurs en Cd plus élevées (250 et 500 µM Cd) ainsi que du Cd présent sous une forme plus phytodisponible (Schützendübel *et al.*, 2001 ; Dong *et al.*, 2005 ; Skrebsky *et al.*, 2008). Au delà de la durée de culture, c'est essentiellement la phytodisponibilité de l'ET qui importe quant à ses conséquences néfastes sur la plante. En effet, les ET se répartissent entre la phase solide et la phase liquide des sols et généralement, la quantité existant dans la solution du sol (quantité

phytodisponible) ne représente qu'un infime pourcentage de sa totalité. Les ET sont essentiellement retenus dans la phase solide du sol au niveau de laquelle ils se répartissent dans les différentes fractions organiques et minérales (Perrono, 1999). On les retrouve sous forme échangeable dans les argiles et la matière organique sous forme de complexes ou associés à des molécules organiques (oxalate, malate...), inclus dans des phases cristallines, adsorbés sur des particules d'oxydes ou d'hydroxydes de Fe, d'Al et de Mn ou encore retenus dans les débris d'organismes vivants qui les contenaient. Ceci explique alors que les substrats hydroponiques et gélosés (*in vitro*) dans lesquels le Cd est dissout présentent une plus forte phytodisponibilité par rapport à un sol solide. Ainsi, il est envisageable qu'une durée d'exposition et une concentration en Cd plus importantes induiraient des modifications morphologiques visibles. Nous verrons d'ailleurs un peu plus loin que la phytodisponibilité du Cd dans les sols de culture en serre a tendance à diminuer dans le temps.

En ce qui concerne les plantules, quelques différences discrètes mais significatives ont été observées mais les différences entre les plantules témoins et les plantules exposées au Cd sont restées très faibles. Il est possible toutefois que le Cd puisse réduire la croissance des plantules avec un temps d'exposition plus long que celui testé dans cette étude. La légère augmentation (de 14 %) de la longueur de racine principale observée chez les plantules de ME en réponse au Cd et l'augmentation de la masse racinaire chez les plantules des 3 espèces (ME, Douglas et MJ) pourraient être rapprochées à un début de réponse morphogénique induite par le stress (RMIS). La RMIS est interprétée comme étant une stratégie d'acclimatation où la croissance des plantes est le plus souvent redirigée afin de diminuer l'exposition au stress (Potters *et al.*, 2007). La RMIS n'est pas spécifique du traitement au Cd car elle a déjà été mise en évidence chez de nombreuses espèces en réponse à différents stress abiotiques comme l'exposition à d'autres ET, une déficience du sol en phosphate ou en sulfate, un engorgement du sol responsable de l'hypoxie ou un stress oxydant (exposition au paraquat, au peroxyde d'hydrogène) (Pasternak *et al.*, 2005a et b ; Potters *et al.*, 2007 et 2009). Les phénotypes liés à une RMIS en réponse à une exposition aux ET peuvent être de plusieurs types :

- une inhibition de l'élongation de la racine principale et la formation accrue de racines latérales (Potters *et al.*, 2007). Par exemple chez *Arabidopsis thaliana*, le Cu et le Cd inhibent l'élongation de la racine principale mais augmente le nombre de racines latérales (Pasternak *et al.*, 2005b ; Moussavou Moudouma, 2010). Ce phénotype est le plus couramment

observé. En plus du phénotype racinaire, certains auteurs ont également montré des effets au niveau des parties aériennes avec une diminution de la surface foliaire, une augmentation de leur épaisseur, une augmentation du nombre de tiges latérales et une diminution de l'élongation de la tige principale (Hasnain et Sabri, 1997 ; Pasternak *et al.*, 2005b).

- un épaississement des racines marqué par une augmentation de leur diamètre. Ce phénomène a été par exemple montré chez *Lupinus luteus* exposé au Pb (Rucinska *et al.*, 1999).

Ces phénotypes dépendent souvent de l'intensité du stress (concentration en ET et durée d'exposition). Par exemple, une étude menée sur *Miscanthus sinensis* exposée (en culture hydroponique) à différentes concentrations en Cd a montré deux effets : la forte concentration en Cd (0,75 mg. L<sup>-1</sup>) a induit un épaississement des racines et une inhibition de l'élongation racinaire tandis que les plus faibles concentrations (0,25 et 0,5 mg. L<sup>-1</sup>) ont induit une augmentation de l'élongation racinaire (Arduini *et al.*, 2004).

Dans notre étude sur les plantules de conifère, la concentration en Cd du substrat (25 mg Cd. kg<sup>-1</sup>) semble avoir généré deux phénotypes différents selon les espèces : un allongement de la racine principale et une augmentation de biomasse racinaire chez le ME et seulement une augmentation de biomasse racinaire chez le Douglas et le MJ. Concernant l'augmentation de biomasse racinaire, nous n'avons pas fait d'observation plus poussée pour savoir si elle était due à une augmentation du nombre de racines latérales ou à un épaississement des racines mais ce type de donnée pourrait permettre de préciser davantage la réponse du système racinaire à l'exposition au Cd.



## II. Comparaison de l'efficacité de phytoextraction du Cd

### 1. Comparaison entre les différentes espèces de plantules

Il est admis que les plantes ayant des facteurs de bioconcentration (FBC) et de transfert (FT) supérieurs à 1, un système racinaire dense et profond ainsi qu'une biomasse importante, sont les plus performantes pour la phytoextraction (Yoon *et al.*, 2006 ; Bert *et al.*, 2012). Selon Yang *et al.* (2015) la biomasse aérienne est tout aussi importante que les FT et FBC, de part l'effet de dilution des espèces ayant un taux de croissance élevé. En effet, même si le Cd est modérément concentré dans la biomasse, une biomasse importante permet de stocker au final une grande quantité de Cd. Les résultats obtenus pour le Douglas et le MJ sont assez encourageants car leur FBC est supérieur à 1 et leur FT ainsi que la concentration en Cd dans les PA sont acceptables (même s'ils ne remplissent pas les caractéristiques des espèces hyperaccumulatrices) (tableau 24). En comparant les deux espèces, nos résultats montrent une meilleure efficacité du Douglas par rapport au MJ. En effet, le Douglas possède un FBC et un FT 1,5 à 1,7 fois plus importants et produit davantage de biomasse aérienne ce qui explique sa meilleure capacité de stockage du Cd (366 µg dans les parties aériennes contre 128 µg pour le MJ). Si toutes ces caractéristiques se confirment sur des stades de développement de l'arbre plus avancés, ceci ferait du Douglas le meilleur candidat pour la phytoextraction du Cd.

**Tableau 24.** Comparaison des paramètres évalués en phytoextraction entre les plantules de Douglas et de MJ.

Espèce	Douglas	MJ
Temps d'exposition à 25 mg Cd. kg <sup>-1</sup> sol	2 mois	
Biomasse racinaire par plantule (g)	0,0021	0,0021
Biomasse aérienne par plantule (g)	<b>0,016</b>	0,011
Teneur en Cd dans les PA (mg Cd. kg <sup>-1</sup> MS)	<b>51</b>	34
Teneur en Cd dans les PS (mg Cd. kg <sup>-1</sup> MS)	56,33	59,48
FT	<b>0,91</b>	0,57
FBC	<b>2</b>	1,36
Quantité de Cd dans les PA par plantule (µg)	<b>366</b>	197
Quantité de Cd dans les PS par plantule (µg)	128	153
Classement d'efficacité de phytoextraction du Cd	<b>++++</b>	<b>+++</b>

Les plantules ont été exposées à 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> sol pendant 2 mois.

Afin d'avoir une étude complète permettant de comparer différentes espèces à des stades de développement différents, il aurait été intéressant d'étudier les plantules de MH mais les faibles taux de germination n'ont pas permis de réaliser cette étude. De même, après avoir étudié l'effet du Cd sur la croissance des plantules de ME, il aurait aussi été judicieux d'étudier la répartition du Cd dans ces dernières mais la biomasse disponible était insuffisante pour effectuer les dosages sur un nombre suffisant de réplicats (au moins 3).

## 2. Comparaison entre les différentes espèces d'arbres

Nous avons comparé nos résultats obtenus sur les mélèzes avec ceux obtenus antérieurement au laboratoire sur des Douglas âgés d'un an de plus et exposés aux mêmes concentrations en Cd (Astier, 2010 ; Astier *et al.*, 2014).

Les résultats résumés dans le tableau 25 ont montré que le MJ présente une biomasse aérienne, un FT et un FBC supérieurs à ceux des MH et ME. La concentration en Cd au niveau aérien pour le MJ est supérieure aux deux autres espèces (jusqu'à 2,7 mg Cd. kg<sup>-1</sup> MS contre 2 mg Cd. kg<sup>-1</sup> MS pour ME et MH). Au final, le MJ peut stocker plus de 60 % du Cd total absorbé dans ses organes aériens (soit environ 80 µg par arbre à la fin de l'expérience) contre 30 % (soit 50 µg par arbre) et 20 % (40 µg par arbre) pour le MH et le ME, respectivement. La « vigueur hybride » ne ressort donc pas dans cette étude en réponse au Cd car le MH possède des capacités d'extraction du Cd intermédiaires à celle de ses parents. Ainsi, parmi les 3 espèces de mélèzes étudiées, le MJ apparaît comme le meilleur candidat pour la phytoextraction du Cd. Il est important de noter que la récolte des mélèzes s'est effectuée au début du jaunissement des aiguilles et qu'une faible quantité d'entre elles a pu tomber, sous-estimant très légèrement les résultats obtenus pour la biomasse aérienne. Cependant, la plus faible biomasse racinaire du MJ semblerait moins avantageuse pour une dépollution plus en profondeur par rapport aux deux autres espèces.

En comparant nos résultats avec ceux obtenus précédemment au laboratoire (Astier, 2010 ; Astier *et al.*, 2014), nous pouvons remarquer que le Douglas serait plus intéressant que les mélèzes pour accumuler le Cd. En effet, le Douglas présente par rapport au MJ un FBC supérieur (estimé à 0,16), une concentration en Cd 1,5 fois plus importante dans les PA (environ 4 mg Cd. kg<sup>-1</sup> MS) et deux fois plus de Cd stocké dans les PA (160 µg de Cd par arbre en

moyenne). Cependant, cette dernière observation doit être pondérée car la plus forte biomasse des parties aériennes (PA) observée pour le Douglas (environ 40 g par arbre) par rapport au MJ est probablement due au fait qu'au début de l'expérience les Douglas étaient âgés d'un an de plus que les mélèzes.

**Tableau 25.** Comparaison des paramètres évalués en phytoextraction entre les différentes espèces d'arbres en serre.

Âge des arbres au début de l'exposition au Cd	3 ans	2 ans		
Espèce	Douglas	MJ	MH	ME
Biomasse racinaire (g)	18	10	20	15
Biomasse aérienne (g)	40	30	25	20
Teneur en Cd dans des PA (mg Cd. kg <sup>-1</sup> MS)	4	2,7	2	2
Teneur en Cd dans les PS (mg Cd. kg <sup>-1</sup> MS)	25	4	6	9
FT	0,16	0,7	0,3	0,2
FBC	0,16	0,1	0,08	0,07
Quantité de Cd dans les PA par arbre (µg)	160	80	50	40
Quantité de Cd dans les PS par arbre (µg)	450	40	120	135
Classement d'efficacité de phytoextraction du Cd	++++	+++	++	+

Les conifères (Douglas, MJ, MH et ME) ont été exposés à 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> sol pendant 9 mois. Les 3 espèces de mélèzes étaient âgées de 2 ans au début de l'exposition au Cd tandis que les Douglas étaient initialement âgés de 3 ans. Les résultats présentés pour le Douglas sont issus des travaux d'Astier (2010) et Astier *et al.* (2014).

Nous pouvons constater que l'efficacité de phytoextraction du Douglas observée au stade plantule semble se confirmer ici pour les arbres à un stade de développement plus avancé, faisant de cette espèce le meilleur candidat pour la phytoextraction du Cd. Nous pouvons supposer que le Douglas possède un système de transporteurs de Cd plus « efficace » que celui du MJ favorisant son efficacité d'absorption. Une étude transcriptomique s'avèrerait intéressante pour vérifier cette hypothèse. Cependant, la quantité de Cd accumulée dans les parties aériennes du Douglas (160 µg par arbre à la fin de l'expérience) et du MJ (environ 80 µg par arbre) est très faible par rapport à d'autres espèces d'arbres utilisées pour la phytoextraction du Cd comme par exemple le peuplier. En effet, un peuplier hybride (*Populus deltoides* x *Populus nigra*) âgé d'un an et poussant pendant une saison sur un sol 5 fois moins contaminé (4,5 mg Cd. kg<sup>-1</sup>) que dans nos conditions peut accumuler dans ses PA presque 300 µg de Cd (Wu *et al.*, 2010b). De même, une étude a montré que le saule Marsault (*Salix caprea*) poussant sur un sol contaminé en Zn et en Cd concentre jusqu'à 116 mg Cd. kg<sup>-1</sup> MS dans ses feuilles (Unterbrunner *et al.*, 2007).

Même si le Douglas et le MJ sont plus intéressants que les deux autres espèces de mélèze (ME et MH), les teneurs présentes dans leur biomasse aérienne sont bien inférieures à la valeur minimale de 0,1 mg Cd. g<sup>-1</sup> de MS pour les considérer comme des espèces hyperaccumulatrices de Cd. De plus, la concentration en Cd reste plus importante dans les racines que dans les PA même si ce phénomène est couramment observé chez de nombreuses espèces dont certaines sont considérées comme hyperaccumulatrices de Cd (Wang *et al.*, 2008 ; Liu *et al.*, 2009 ; Wu *et al.*, 2010b). Il serait nécessaire de vérifier l'intérêt d'une phytoextraction aidée du Cd pour améliorer les résultats. Par exemple, l'utilisation d'amendements, d'engrais ou de mycorhizes sont susceptibles d'améliorer l'efficacité de l'extraction en promouvant la croissance des arbres et la biodisponibilité du Cd (Fischerová *et al.*, 2006 ; Sessitsch *et al.*, 2013). Il serait également nécessaire de comparer des arbres de Douglas et de MJ du même âge au début de l'étude afin de voir si le Douglas confirme sa place de meilleur candidat.

Des différences significatives de distribution du Cd dans les différents organes aériens ont été constatées entre les ME et les MH d'une part et les MJ d'autre part. En effet, les ME et MH avaient des concentrations plus élevées en Cd dans les écorces des 2 premières années de pousse puis les rameaux et les aiguilles alors que pour les MJ, l'ordre décroissant était : rameaux > aiguilles > écorces. Les travaux d'Astier (2010) sur le Douglas ont montré une concentration décroissante de Cd dans les organes suivants : écorces > bois > aiguilles > rameaux. La distribution semble donc dépendre davantage de l'espèce que de la concentration en Cd car toutes ces espèces ont été cultivées dans des conditions similaires. Une étude effectuée chez trois espèces d'arbres (*Salix caprea*, *Populus tremula* et *Betula pendula*) ayant poussé sur un site contaminé en Zn et Cd a montré que ces deux ET étaient majoritairement concentrés dans les feuilles, puis les écorces et enfin dans le bois (Unterbrunner *et al.*, 2007). Ces travaux confirment un des points que nous avons pu mettre en évidence à savoir que chez les arbres, les écorces présentent souvent une concentration en Cd plus importante que dans le bois.

Par ailleurs, nous avons pu constater chez les mélèzes que les écorces et le bois de dernière année de pousse présentaient les plus faibles concentrations en Cd (moins de 0,5 mg Cd. kg<sup>-1</sup>). Ce résultat laisse supposer que les mélèzes épargneraient davantage les jeunes organes afin de préserver leurs processus métaboliques. Ils concentreraient ainsi davantage les molécules potentiellement toxiques (c'est-à-dire ici le Cd) dans les organes âgés qui sont plus résistants car plus riches en métabolites pouvant piéger les polluants (Laureysens *et al.*, 2004 ;

Shi *et al.*, 2008 ; De Maria et Rivelli, 2013 ; Parraga-Aguado, 2014). Bien que la concentration en Cd dans les bourgeons soit l'une des plus importantes enregistrées chez ses 3 espèces, il n'est pas exclu qu'une distribution plus fine puisse être mise en évidence. En effet, il est fort probable que les écailles aient une concentration plus forte en Cd que les tissus méristématiques et les primordia foliaires. Ceci a déjà été mis en évidence non pas dans des bourgeons mais dans des graines (qui contiennent également des zones de méristèmes et de primordia foliaires) : plusieurs auteurs ont indiqué que l'enveloppe des graines pouvait fonctionner comme une barrière physique et donc limiter le transfert du Cd vers les tissus en forte activité de division cellulaire (Malan *et al.*, 2012 ; Shi *et al.*, 2014).

### **3. Comparaison des capacités d'extraction du Cd entre les différents modèles**

La comparaison des modèles d'étude est intéressante car elle permet de savoir s'il est possible d'extrapoler des résultats obtenus sur plantules sur un temps court d'exposition à un modèle plus âgé proche de ce qui pourrait être planté sur un site contaminé. Une concordance des deux modèles permettrait en effet de pouvoir effectuer des « pré-tests » sur plantules, lesquels font gagner du temps d'un point de vue expérimental. Le bilan comparatif peut se faire sur le Douglas et le MJ en reprenant pour les arbres de Douglas, les résultats d'Astier (2010) (tableau 26).

**Tableau 26.** Comparaison des paramètres évalués en phytoextraction entre le modèle plantule et le modèle arbre d'une même espèce pour le Douglas et le MJ.

Espèce	Douglas		MJ	
Modèle	Arbre*	Plantule	Arbre	Plantule
Âge du végétal au début de l'exposition au Cd	3 ans	3 semaines	2 ans	3 semaines
Temps d'exposition à 25 mg Cd. kg <sup>-1</sup> sol	9 mois	2 mois	9 mois	2 mois
MS racinaire par individu (g)	18	0,0021	10	0,0021
MS aérienne par individu (g)	40	0,016	30	0,011
Teneur Cd dans les PA par individu (mg Cd. kg <sup>-1</sup> MS)	4	51	2,7	34
Teneur en Cd dans les PS par individu (mg Cd. kg <sup>-1</sup> MS)	25	56,33	4	59,48
FT	0,16	0,91	0,7	0,57
FBC	0,16	2	0,1	1,36
Quantité de Cd dans les PA par individu (µg)	160	366	80	197
Quantité de Cd dans les PS par individu (µg)	450	128	40	153
Classement d'efficacité de phytoextraction du Cd	++	++	+	+

Les deux modèles ont été exposés à 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> sol mais sur une période d'exposition de 2 mois pour les plantules et de 9 mois pour les arbres. Les résultats présentés concernant le modèle arbre pour le Douglas sont issus des travaux d'Astier (2010) et Astier *et al.* (2014).

Nos résultats suggèrent que le Douglas serait plus efficace que le MJ en terme de quantité de Cd accumulée dans les parties aériennes, que ce soit sur le modèle plantule ou le modèle arbre. Une divergence apparaît entre le modèle arbre et le modèle plantule lorsqu'on compare les quantités de Cd accumulées dans les PA et les PS. En effet, pour le modèle plantule, la plus grande quantité de Cd stockée est trouvée au niveau des PA alors que pour les arbres, ce sont les racines qui stockent au final la plus grande quantité de Cd. De plus, l'évaluation des FT et BCF varie entre les deux modèles, et de manière plus importante pour le Douglas. Par exemple, chez le Douglas, le FT passe de 0,91 pour les plantules (ce qui est une valeur très encourageante pour la phytoextraction) à une valeur de 0,16 pour arbres et le FBC passe de 2 pour les plantules à 0,16 pour les arbres. La diminution est moins nette pour le FT du MJ mais est fortement marquée pour le FBC.

Le substrat étant le même pour les plantules et les arbres (ainsi que la concentration de 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> sol), la différence de réponse provient donc de l'âge des conifères et du temps d'exposition. Bien que le modèle arbre permette une phytoextraction du Cd plus en profondeur, il semble beaucoup moins intéressant que le modèle plantule qui accumule et concentre plus de Cd sur une plus courte période d'exposition et ceci malgré une biomasse aérienne beaucoup plus faible. La phytoextraction par des arbres n'est pas régulière au cours de la saison de croissance du fait d'une absorption plus importante des substances nutritives (et donc des ET de façon simultanée) au cours de la phase de croissance végétative afin de favoriser le développement de l'arbre (Liu *et al.*, 2013). Ainsi, la diminution de l'absorption des nutriments et des ET à la fin de la saison de croissance associée à une possible modification quantitative et / ou qualitative des exsudats (racinaires et / ou par des microorganismes) pourraient avoir influé sur les capacités d'extraction du Cd. Une étude complémentaire des exsudats racinaires présents dans le sol au cours du temps aurait été pertinente sur le modèle arbre afin de vérifier cette hypothèse.

Cette étude comparative montre qu'il est délicat de transposer les résultats obtenus en deux mois sur plantules à ceux obtenus en neuf mois d'exposition sur les arbres. Néanmoins, dans les deux modèles, le Douglas s'avère le plus efficace. Le fait de travailler en amont sur un modèle plantule pourrait ainsi permettre d'effectuer une première sélection d'espèce d'intérêt pour des applications ultérieures sur site.

## DISCUSSION - *Deuxième partie*

### Réponses physiologiques à l'exposition au Cd : stratégies mises en place pour tolérer le stress métallique

#### I. Stratégies mises en place au niveau intracellulaire

La capacité de tolérance des conifères ayant été montrée sur le modèle plantule, la question des stratégies mises en place pour supporter des doses de Cd potentiellement toxiques se pose. Des processus de chélation à des métabolites intracellulaires ayant été précédemment décrits, leur quantification a donc été mise en œuvre. Nos résultats ont montré que les composés riches en thiols totaux non protéiques (TNP) ne semblent pas être impliqués en réponse à une contamination par le Cd chez les plantules de Douglas et de MJ. Une variation des proportions entre glutathion et phytochélatines serait possible mais l'augmentation d'un des deux types de molécules au détriment de l'autre ne constituerait pas une stratégie efficace de défense. En effet, les phytochélatines (PCs) sont connues pour être les molécules du cytoplasme fixant le plus souvent le Cd et avec une efficacité un peu moins importante Ag, Pb, Hg, Zn et Cu lorsqu'ils sont en forte concentration dans la cellule (Grill *et al.*, 1989). Il a également été montré que l'exposition au Cd stimule la biosynthèse de GSH chez *N. caerulea* et l'exposition au Pb et au Zn stimule celle de *Sedum alfredii*, une hyperaccumulatrice de Cd (Sun *et al.*, 2005 ; van de Mortel *et al.*, 2006). Le GSH joue un rôle prépondérant dans la détoxification des ET tels que Cd, Ni, Pb et Zn, non seulement de par sa fonction anti-oxydante mais aussi de par sa capacité à fixer ces ET au niveau du groupement thiol de la cystéine (Sun *et al.*, 2005 et 2007 ; Freeman *et al.*, 2004 ; Verbruggen *et al.*, 2009).

Nous avons pu constater dans le second chapitre de l'introduction bibliographique que les polyamines libres pouvaient piéger les radicaux libres et également chélater des ET *via* leurs groupements amine (Lovaas, 1997 ; Groppa *et al.*, 2001 et 2003 ; Balestrasse *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2007). Selon les conditions du stress métallique imposées et les espèces végétales testées, plusieurs travaux ont mis en évidence une augmentation ou une diminution des polyamines endogènes (Weinstein *et al.*, 1986 ; Geuns *et al.*, 1997 ; Lin et Kao, 1999 ; Groppa *et al.*, 2001, 2003, 2007a et 2007b ; Sharma et Dietz, 2006 ; Choudhary *et al.*, 2010). Nous avons pu



constater dans notre étude préliminaire chez le MJ que les polyamines libres étaient plus abondantes dans les racines que dans les aiguilles, ce qui a été également observé chez *Atriplex atacamensis* suite à une exposition à l'As (Vromman *et al.*, 2011). Par ailleurs, chez le MJ, une tendance à une diminution de la teneur en polyamines en réponse au Cd a également été observée dans les aiguilles et les racines. Selon nos recherches, cette tendance à la diminution simultanée de ces trois polyamines n'a jamais été décrite. De plus, l'une de ces polyamines, la putrescine (Put), joue un rôle important en tant que précurseur de la biosynthèse des autres polyamines (Shi et Chan, 2014) et d'une manière générale, sa teneur est supérieure à celles des autres polyamines dans les plantes (Cohen, 1998). Ceci n'est pas le cas dans notre étude où la spermidine (Spd) semble la plus abondante dans les aiguilles et les racines avec ensuite la spermine (Spm) puis la Put dans les racines et la tendance inverse dans les aiguilles. La concentration en Put est pourtant connue pour augmenter sous diverses conditions de stress, alors que la Spd et la Spm restent souvent stables ou font l'objet de variations mineures (Liu *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2013). Cependant, nos résultats doivent être complétés pour confirmer la tendance observée.

Cependant, les variations enregistrées peuvent être différentes en fonction de la plante ou de la nature du stress métallique. Par exemple, Groppa *et al.* (2001 et 2003) ont montré qu'une exposition à 0,5 mM de Cd ou de Cu entraînait une réduction du contenu en Put et Spd dans les feuilles de tournesol sans affecter celui en Spm, tandis que dans les feuilles de blé, de telles expositions ont mis en évidence une forte augmentation en Put et une diminution en Spm sans modifier le contenu en Spd. De plus, le taux de polyamines endogènes peut dépendre non seulement de l'ET et de sa concentration d'exposition mais aussi de l'organe et de l'espèce végétale étudiés ainsi que du stade de développement de la plante (Balestrasse *et al.*, 2003 et 2005 ; Sharma et Dietz, 2006 ; Dhir *et al.*, 2012). Il est probable que la diminution de ces teneurs en polyamines libres provienne d'une réduction de leur biosynthèse, notamment *via* l'inhibition par le Cd de l'arginine décarboxylase (ADC) ou de l'ornithine décarboxylase (ODC), des enzymes impliquées dans la production de la Put. En effet, il a été observé dans des disques foliaires de tournesol exposés au Cu ou au Cd, que ces deux ET entraînaient une diminution de la production de Put, de Spd et de l'activité ADC tandis que l'activité ODC était légèrement affectée par le Cd et non par le Cu (Groppa *et al.*, 2001). Les auteurs ont suggéré que la voie de régulation par l'ADC semblait être favorisée par rapport celle de l'ODC pour la biosynthèse

de la Put et que la diminution de la production de Put était probablement dûe à l'inhibition de l'activité ADC.

Enfin, de façon plus globale, nous avons voulu voir si la biosynthèse des protéines cytosoliques et membranaires totales pouvaient être altérée lorsque les plantules sont exposées au Cd. Cette exposition n'a pas semblé avoir d'impact net sur les teneurs en protéines cytosoliques et membranaires du ME tandis qu'elle a été stimulée dans les aiguilles de Douglas et de MJ avec une augmentation respective de 73 % et 47 %. Une augmentation de la teneur en protéines totales a déjà été montrée chez le sorgho en réponse au Cd (Muratova *et al.*, 2015). Parmi les protéines dont la synthèse peut être accrue en réponse au Cd, il est possible d'identifier par exemple des enzymes anti-oxydantes (superoxyde dismutase, catalase, ascorbate peroxydase, glutathion peroxydase...), des protéines de choc thermique, des protéases, des protéines liées à la pathogénicité (protéines PR) ou encore des glutathion-S-transférases (Tran et Popova, 2013).

## **II. Stratégies mises en place au niveau extracellulaire**

Les processus intracellulaires de chélation ou de détoxication peuvent s'accompagner de processus extracellulaires visant également à piéger le Cd pour en limiter les effets toxiques.

### **1. Régulation de l'activité PME**

Nos résultats ont montré chez les plantules que le Cd n'a pas modifié la teneur en protéines pariétales quel que soit l'organe considéré. Parmi les protéines pariétales, l'activité de la PME a cependant été caractérisée car elle joue un rôle important dans l'acidité des domaines de type HG des pectines et donc sur le processus de séquestration des ET (Bordenave, 1996). Nos résultats ont montré une forte stimulation de l'activité PME en réponse au Cd dans les racines de Douglas (x 2,2) et de MJ (x 2,6) et dans la tige des ME (x 2). En augmentant l'activité PME dans les racines ou les tiges, les plantules pourraient ainsi favoriser l'adsorption du Cd au niveau pariétal, ce compartiment extracellulaire étant un lieu de stockage préférentiel d'ET pour différentes espèces végétales (Parrota *et al.*, 2015).

Cette augmentation de l'activité PME pourrait être dûe à une stimulation de l'expression des gènes codant pour des PME et / ou à une stimulation directe de l'activité enzymatique :

- Dans le premier cas, il a été montré que de nombreux ET induisent une augmentation de l'expression de la PME comme par exemple le Zn chez *T. caeruleus* (Hassinen *et al.*, 2007). Le saule *Salix caprea* cultivé sur un milieu enrichi en Zn et Cd montre également une augmentation de l'expression du gène *ScPME1* qui code pour une PME localisée au niveau foliaire (Konlechner *et al.*, 2013). Cependant, une régulation opposée a aussi été décrite chez d'autres espèces. Ainsi, une étude menée au laboratoire sur des suspensions cellulaires de tomate cultivées *in vitro* a montré une réduction d'activité PME associée à une diminution de l'expression du gène *LePME1* en réponse au Zn et Cd (Muschitz *et al.*, 2015). De même, une diminution de l'expression du gène *LuPME1* codant pour une PME a été observée chez des plantules de lin ayant été exposées au Cd (Paynel *et al.*, 2009). Récemment, El-Moneim *et al.* (2014) ont observé une expression réduite du gène *ScPME* dans un cultivar de seigle (*Secale cereale* L.) tolérant à l'Al mais une légère augmentation de l'expression de ce gène dans le cultivar sensible. L'ensemble de ces résultats suggère une régulation de la transcription de gènes codant pour des PME en réponse aux ET. L'hypothèse d'une action directe du Cd sur l'activité de la PME pourrait aussi être envisagée.
- Dans le second cas, il a été mis en évidence que l'activité des PME serait renforcée par les cations (Nari *et al.*, 1991). Les cations trivalents seraient plus efficaces que les cations bivalents, qui seraient eux-mêmes plus efficaces que les monovalents (Schmohl *et al.*, 2000 ; Micheli, 2001). Goldberg *et al.* (1992) ont montré que les cations  $\text{Ca}^{2+}$  entraînaient une stimulation d'activité de la PME d'un facteur 4 et les cations  $\text{Mg}^{2+}$  d'un facteur 24, tandis que les cations monovalents se sont avérés moins efficaces. Ce n'est cependant pas toujours le cas car l'effet des cations sur les PME peut dépendre de l'espèce végétale. Par exemple, l'activité PME de l'Acérola est réduite en présence de  $\text{Mg}^{2+}$  mais stimulée en présence de  $\text{Na}^+$ , de  $\text{K}^+$  ou de  $\text{Ca}^{2+}$  (de Assis *et al.*, 2002). Il est possible que les cations  $\text{Cd}^{2+}$  aient un effet semblable à celui des cations  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$  sur l'activité de la PME. En effet, par analogie, l'adsorption des cations  $\text{Cd}^{2+}$  aurait tendance à libérer l'enzyme initialement liée aux carboxylates libres des HG, rendant ainsi disponible son site actif qui hydrolyse les carboxyles méthyestérifiés entourés de fonctions acide carboxylique non méthylées. L'augmentation de l'activité PME en présence de cations  $\text{Cd}^{2+}$  entraînerait l'augmentation de sa constante de dissociation avec le produit de la réaction, c'est-à-dire avec l'acide galacturonique, lui permettant à nouveau d'aller agir sur un autre résidu méthyestérifié entouré de résidus carboxyle non

méthylés (Moustacas *et al.*, 1991). Cependant, l'ajout de concentrations croissantes d'Al (10 à 200 mM) dans une préparation commerciale de PME *in vitro* a montré que l'activité enzymatique n'était pas affectée, indiquant ainsi qu'un effet direct de l'Al (et peut-être d'autres ET) sur l'enzyme était peu probable (Schmohl *et al.*, 2000).

## **2. Adsorption du Cd par les pectines**

L'étude portant sur la composition de la paroi cellulaire du bois et des écorces nouvellement formés au cours de l'exposition des arbres au Cd s'est heurtée au problème de la faible quantité de biomasse disponible pour mettre en place ces analyses. Cependant, une comparaison d'extraction à partir de 0,5 ou 0,1 g de MS a montré que la diminution des quantités de biomasse initiales à 0,1 g n'a pas eu de conséquence significative sur les résultats tant sur le plan quantitatif (rendement en pectines extraites) que qualitatif (composition monosaccharidique). Les travaux se sont poursuivis par une étude de l'effet du Cd sur la composition pectique des écorces et du bois de mélèze néoformés. Les résultats ont montré que les effets du Cd étaient discrets chez les 3 espèces de mélèzes, probablement parce que nous avons constaté que le Cd était très faiblement accumulé dans les écorces et le bois (moins de 0,5 mg Cd. kg<sup>-1</sup>) formés au cours de la période d'exposition au Cd.

### **2.1. Effet du Cd sur les écorces néoformées**

Les changements qualitatifs et quantitatifs observés dans les fractions pectiques extraites des écorces sont résumés dans le tableau 27. Pour toutes les espèces, quelle que soit la teneur en Cd du sol, les pourcentages d'AU sont stables et plus importants dans les fractions PEC que POxa, témoignant d'une plus grande richesse en HG dans ces fractions. Quelques différences ont été constatées entre les espèces, ME et MH d'une part et MJ d'autre part. En effet, les pectines du MJ sont légèrement moins riches en AU que celles des deux autres espèces. De plus, les fractions PEC et POxa du MJ ont une teneur en ST du même ordre de grandeur et plus faible (2 à 4 fois) que chez le ME et le MH tandis que pour le ME et le MH, les fractions PEC sont plus riches en ST que les fractions POxa. Enfin, les deux fractions pectiques du MJ apparaissent plus ramifiées et plus riches en RG-I que celles des deux autres espèces qui au contraire sont moins ramifiées et plus riches en HG.

Excepté pour le MH où le Cd n'a eu aucun effet marqué sur la composition qualitative et quantitative des pectines, nos résultats mettent en évidence pour le ME et le MJ des évolutions discrètes :

- ME : l'élévation de la teneur en Cd des sols semble induire une diminution de l'acide glucuronique (Glc. A) néanmoins trop faible pour être détectée dans le pourcentage globale d'AU qui reste stable. L'augmentation significative de la teneur en ST pourrait laisser supposer une stratégie d'accroissement des capacités d'adsorption du Cd des fractions PEC globalement plus riches en AU que les POxa et la présence de structures pectiques moins ramifiées et donc plus riches en domaines HG, sites potentiels de rétention des cations métalliques.
- MJ : une augmentation significative des teneurs en rhamnose des PEC à partir de 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup> a été observée bien que la teneur en ST soit restée stable. Une tendance toutefois non significative à une augmentation du ratio Rha / Gal. A est observée à partir de 25 mg Cd. kg<sup>-1</sup>. Nous pouvons supposer qu'une stratégie d'exclusion apparaît ici avec un début de mise en place d'une barrière physique par la présence de davantage de structures ramifiées (RG-I). Ceci limiterait en effet l'adsorption du Cd au niveau des résidus Gal. A non méthylestérifiés. Quant à la fraction POxa, elle diminue quantitativement avec la présence de Cd mais le ratio Rha / Gal. A augmente, témoignant d'une structure pectique plus ramifiée (RG-I). Ce qui peut s'expliquer par l'augmentation du taux de Rha et la diminution du taux de Gal. A bien que ces variations individuelles observées n'aient pas été validées par le test statistique. Ainsi, des variations qualitatives et quantitatives des pectines d'écorces sont observées chez le MJ, bien que cette catégorie de polymères soient moins représentée (ou moins bien extractible) que chez les deux autres espèces. La diminution de la fraction POxa supposée plus riche en Gal. A non méthylestérifiés et l'augmentation de structures ramifiées constituent un mécanisme visant à l'exclusion du Cd de la paroi. De cette façon, la « densification » de la barrière physique constituée par des RG-I gêne l'accès du Cd aux sites non méthylestérifiés des HG qui tendent également à diminuer.

**Tableau 27.** Tableau récapitulatif des changements quantitatifs et qualitatifs observés sur les PEC et les POxa issues des écorces des 3 espèces de mélèzes suite à une exposition au Cd.

Espèces	Fraction pectique	Changements quantitatifs		Changements qualitatifs		Caractéristiques	
		Sucres totaux (ST)	Pourcentage d'acides uroniques (AU)	Composition monosaccharidique	Rha / Gal.A		
ME	PEC	↗ de 23 %	stable	- ↘ de Glc. A	stable et inférieur à 1 (proche de 0,3)	Pectines PEC et POxa faiblement ramifiées témoignant d'une plus grande richesse en HG.	
	POxa	stable	stable	stable	stable et inférieur à 1 (proche de 0,3)		
MH	PEC	Stable	stable	stable	stable et inférieur à 1 (proche de 0,3)		
	POxa	stable	stable	stable	stable et inférieur à 1 (proche de 0,3)		
MJ	PEC	stable	stable	- ↗ du rhamnose avec 25 mg Cd. kg <sup>-1</sup>	Significativement stable (proche de 0,7) (mais tendance à ↗)		- PEC ramifiées riches en RG-I.
	POxa	↘ de 37 %	stable	Stable	↗ avec 25 mg Cd. kg <sup>-1</sup> (de 0,7 à 1,1)		- POxa de plus en plus ramifiées et de plus en plus riches en RG-I.

## 2.2. Effet du Cd sur le bois néoformé

Comme pour les écorces, les variations enregistrées en fonction de la teneur en Cd du sol sont limitées et sont résumées dans le tableau 28. L'augmentation des teneurs en Cd dans le sol n'influe pas significativement sur le rapport Rha / Gal. A mais les écart-types sont trop importants pour permettre d'extrapoler des informations quant à leur proportion en HG et RG-I. Globalement, les teneurs en ST des POxa sont similaires chez les 3 espèces. Chez le MH, les teneurs en ST des fractions PEC sont du même ordre de grandeur que celles du ME et les fractions PEC sont pour ces deux espèces supérieures à celles des POxa (alors qu'elles sont quasiment égales chez le MJ). Chez le MJ, la teneur en ST des fractions PEC est deux fois moins importante par rapport aux deux autres espèces.

Au niveau du bois néoformé, le Cd n'a eu aucun effet significatif sur les pectines du MJ. En revanche, quelques variations ont été mises en évidence en réponse au Cd pour les deux autres espèces :

- ME : globalement, les fractions PEC sont restées stables ainsi que leur taux d'AU mais la composition monosaccharidique a évolué. La teneur en Ara de la fraction POxa a diminué (confirmé par une réduction de 43 % de la teneur en ST). Cependant, la diminution de la fraction POxa supposée plus riche en fonctions acide carboxylique et donc plus apte à adsorber le Cd, suggérerait un mécanisme visant plutôt à l'exclusion du Cd.
- MH : la fraction a été réduite quantitativement mais sans modification de la composition monosaccharidique. Il est possible que cet ET perturbe les enzymes de type glycosyl-transférases impliquées dans la biosynthèse des pectines. Une diminution de la synthèse de cette fraction diminue alors le potentiel d'adsorption du Cd, bien que la fraction PEC ne soit pas censée être la plus apte à cela par rapport à la fraction POxa. Le pourcentage d'AU a augmenté dans les fractions POxa, peut-être en partie dû à l'augmentation de Glc. A (même s'il est minoritaire par rapport à Gal.A). L'augmentation de Glc. A dans ces fractions favoriserait les capacités d'adsorption du Cd. Les fractions POxa sont réputées être moins méthylestérifiées et donc plus aptes à fixer davantage d'ET. Cependant, ceci ne reste qu'une hypothèse car le DME de cette fraction n'a pas pu être calculé et il aurait été nécessaire pour avoir une idée plus précise sur les capacités d'adsorption.

**Tableau 28.** Tableau récapitulatif des changements quantitatifs et qualitatifs observés sur les PEC et les POxa issues du bois de 3 espèces de mélèzes suite à une exposition au Cd.

Espèces	Fraction pectique	Changements quantitatifs		Changements qualitatifs		Caractéristiques
		Sucres totaux (ST)	Pourcentage d'acides uroniques (AU)	Composition monosaccharidique	Rha / Gal.A	
ME	PEC	Stable	Stable	- ↗ du fucose avec 25 mg Cd. kg <sup>-1</sup> - ↗ du xylose avec 25 mg Cd. kg <sup>-1</sup>	Stable (écarts-types trop important pour conclure)	
	POxa	↘ (- 43 %)	Stable	- ↘ de l'arabinose		
MH	PEC	↘ (- 80 %)	Stable	Stable		
	POxa	Stable	↗	- ↗ GlcA d'un facteur 5		
MJ	PEC	stable	stable	Stable		
	POxa	stable	stable	Stable		



Que ce soit dans les écorces ou dans le bois, nous avons pu constater la présence non négligeable de glucose. Ce monosaccharide peut avoir deux origines :

- Il peut provenir de glucanes pariétaux tels que la cellulose mais cette hypothèse est peu vraisemblable compte tenu des techniques d'extraction et d'analyses mises en oeuvre (la cellulose n'étant pas hydrolysée au cours de la méthanolyse), ou à la présence d'autres glucanes pariétaux comme des glucomannanes hémicellulosiques.
- Il peut provenir d'une contamination à l'amidon dûe à une efficacité partielle du protocole avec le DMSO, ce qui serait plus plausible. Un traitement à l'amylase pourrait être envisagé afin de s'en débarrasser car ce dernier n'est pas un sucre constitutif des pectines. Sa présence notable vient perturber l'interprétation des résultats en sous-estimant ainsi les pourcentages molaires des monosaccharides constitutifs des pectines.

Malgré la mise en œuvre de deux stratégies de dosage, nous ne sommes pas parvenus à déterminer le DME des fractions pectiques par la méthode de dosage du méthanol et par la méthode en IR. Étant limité par le temps mais aussi par la quantité d'échantillon disponible, nous n'avons pu essayer d'autres techniques pour y parvenir telles que par exemple la méthode d'immunomarquage en choisissant des anticorps dirigés spécifiquement contre des domaines plus ou moins méthylestérifiés des pectines de paroi (Muschitz *et al.*, 2015).

Les données obtenues précédemment chez le Douglas ont montré une augmentation de la fraction PO<sub>x</sub> plus marquée dans les écorces que dans le bois, associée à une diminution du DME (Astier *et al.*, 2014). Ainsi, le Douglas développerait plutôt une stratégie d'accroissement des capacités d'adsorption. Dans le cas du blé, une augmentation de la quantité en pectines et composés phénoliques a également été observée afin d'augmenter les capacités d'adsorption (Hossain *et al.*, 2006). A l'opposé, certaines espèces soumises à un stress métallique favorisent plutôt la production de pectines hautement méthylestérifiées, ce qui a pour conséquence de limiter le piégeage des ET. Cette réponse peut être considérée comme une stratégie d'exclusion des ET, visant à atténuer leur phytotoxicité. Par exemple, chez une population métallophyte de *Silena paradoxa*, les résultats ont montré une augmentation du DME des pectines lorsque les plantes étaient soumises à une pollution en Cu ainsi qu'une concentration pariétale en Cu inférieure à la population sensible de *S. paradoxa* (Colzi *et al.*, 2012). Ainsi, l'autre aspect à ne pas négliger est l'aspect qualitatif, plus particulièrement au niveau des pectines. En effet,

l'efficacité de piégeage des ET par ces polysaccharides peut être fonction non seulement de leur quantité mais aussi de leur DME.

Au niveau de la paroi cellulaire, nous avons pu constater la mise en place de la combinaison de diverses stratégies (exclusion / adsorption) permettant aux plantes modèles de se défendre du stress métallique. Cependant, l'accès à la valeur de DME des extraits pectiques et des réplicats supplémentaires d'échantillons pour chaque paramètre étudié auraient pu davantage préciser et renforcer les hypothèses émises. Enfin, et dans l'objectif de compléter notre étude sur les conséquences d'un stress métallique sur la structure et la composition des parois cellulaires, il serait utile d'analyser la variabilité qualitative et quantitative des autres composés pariétaux tels que notamment les hémicelluloses et les lignines. Une attention particulière du suivi de l'expression et de l'activité relative des glycosyl-transférases impliquées dans la synthèse des composés pectiques serait également intéressante. De plus, afin d'avoir une approche plus complète de ce qu'il se passe dans la paroi lors d'un stress métallique, il aurait été intéressant de voir dans quelle mesure les autres composés pariétaux comme les hémicelluloses et les lignines sont affectés, mais également judicieux d'étudier les enzymes (du type glycosyl-transférases) impliquées dans la biosynthèse des pectines.

Le modèle plantule apparaît comme le plus intéressant pour étudier plus rapidement les mécanismes physiologiques mis en place par les conifères pour se défendre face à un stress métallique. De plus, le Douglas ayant montré les résultats les plus intéressants en terme de concentration et d'accumulation du Cd, le modèle plantule de cette espèce a été sélectionné par la suite pour une approche combinant à la fois une étude des réponses physiologiques et des capacités de phytoextraction sur des sols contaminés par plusieurs ET.



## **- CHAPITRE 3 -**

**Réponses de plantules de Douglas  
cultivées sur des sols contaminés  
provenant d'anciens sites miniers**



## Chapitre 3

### **Réponses de plantules de Douglas cultivées sur des sols contaminés provenant d'anciens sites miniers**

Ce troisième chapitre est rédigé sous la forme d'une publication scientifique publiée dans *International Journal of Phytoremediation*. Celle-ci s'intitule « Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) plantlets responses to As, Pb and Sb-contaminated soils from former mines ». Les auteurs sont Amandine Bonet, Grégoire Pascaud, Céline Faugeron, Marilyne Soubrand, Emmanuel Joussein, Vincent Gloaguen et Gaëlle Saladin. Cette publication a été acceptée le 17 Juin 2015 et elle est actuellement sous presse (DOI 10.1080/15226514.2015.1086297) (annexe 6).

Dans cette étude, afin de se rapprocher de conditions du terrain et d'étudier la transférabilité du procédé, nous avons choisi d'étudier la tolérance des conifères à d'autres ET que le Cd car la plupart des sites pollués le sont généralement par plusieurs ET. Nous avons donc travaillé sur des sols multipollués (riches en As, Sb et Pb) récoltés sur d'anciens sites miniers. Ces sites sont localisés en Limousin (La Petite Faye en Creuse) et en Auvergne (Pontgibaud dans le Puy-de-Dôme), deux régions où les conifères occupent une partie non négligeable du couvert forestier.

Nous avons choisi le modèle plantule en serre car il permet une mise en évidence rapide de processus adaptatifs. Les graines ont été semées directement sur les sols récoltés et tamisés. Nous avons sélectionné le Douglas pour cette étude car les travaux réalisés auparavant avec le modèle plantule en réponse au Cd ont montré que c'est cette espèce qui présentait le meilleur taux de germination et la meilleure croissance et donc potentiellement la meilleure capacité de stockage d'ET. Nous avons tout d'abord étudié l'effet de ces ET sur la croissance des plantules et leur métabolisme azoté et carboné, puis nous nous sommes intéressés à leur réponse face au stress oxydant. Enfin, nous avons quantifié les ET dans les racines et les parties aériennes (tiges et aiguilles) afin d'évaluer la capacité d'accumulation du Douglas.





## Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) plantlets responses to As, Pb, and Sb-contaminated soils from former mines

Amandine Bonet, Grégoire Pascaud, Céline Faugeron, Marilyne Soubrand, Emmanuel Joussein, Vincent Gloaguen & Gaëlle Saladin

To cite this article: Amandine Bonet, Grégoire Pascaud, Céline Faugeron, Marilyne Soubrand, Emmanuel Joussein, Vincent Gloaguen & Gaëlle Saladin (2015): Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) plantlets responses to As, Pb, and Sb-contaminated soils from former mines, *International Journal of Phytoremediation*, DOI: [10.1080/15226514.2015.1086297](https://doi.org/10.1080/15226514.2015.1086297)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/15226514.2015.1086297>

### ABSTRACT

Phytoremediation of metalloids by conifers is not widely studied although they may be relevant for several contaminated sites, especially those located in cold areas and sometimes under dry climates. Here, seeds of Douglas fir were sown in greenhouse on three soils collected in two French former mines: a gold mine (soils L1 and L2) and a lead and silver mine (soil P). These soils are highly contaminated by Pb, As, and Sb at different concentrations. Plants were harvested after ten weeks. Growth parameters, primary metabolite content, and shoot and root ionomes were determined. Douglas firs grown on the soils L1 and P had a lower biomass than controls and a higher oxidation status whereas those grown on the soil L2 exhibited a more developed root system and only slight modifications of carbon and nitrogen nutrition. Based on trace element (TE) concentrations in shoots and roots and their translocation factor (TF), Douglas fir could be a relevant candidate for As phytoextraction ( $0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  dry weight in shoots and a TF of 1.1) and may be used to phytostabilize Pb and Sb ( $8.8 \text{ g}$  and  $127 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  in roots for Pb and Sb, respectively, and TF lower than 0.1).



## INTRODUCTION

The most common technique to clean soils contaminated with TE is soil excavation with subsequent soil treatment outside the site and waste management. However, this process is expensive, harmful for microfauna, and causes a long-term disturbance of ecosystems (Dermont *et al.* 2008). Phytoremediation of TE in contaminated soils may be more ecological. It is divided into several methods with different purposes depending on selected plant species: i) phytoextraction (or phytoaccumulation) is based on TE uptake from contaminated substrate (soil or water) and translocation to aboveground organs, these organs being then harvested, ii) phytostabilization corresponds to the capacity of plants to reduce TE mobility and availability in soil in order to limit leaching, iii) phytovolatilization is the uptake of TE from soil followed by a conversion into volatile form but this method is controversial because it displaces the pollution from soil to atmosphere (Ali, Khan, and Sajad 2013). Among these methods, phytoextraction can valorize harvested biomass and thus reduce the cost. Indeed aboveground organs can be used in the energy sector, biofermentation and biocatalysis process and ashes can be recycled (minerals for additional fertilization and TE for various sectors) (Pan and Eberhard 2011; Nzihou and Stanmore 2013; Willscher *et al.* 2013; Escande *et al.* 2014).

There are actually 550-600 plant species able to store in their aerial parts much more TE than the average plants without lethal effects (van der Ent *et al.* 2012). The minimum TE levels in the aerial parts for these hyperaccumulators is set at 10 g. kg<sup>-1</sup> dry weight (DW) for Fe, Mn and Zn, 1 g for Al, As, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb and Se, 0.1 g for Cd and 0.001 g for Hg (Baker and Brooks 1989; Feng *et al.* 2013). Trees could be more interesting candidates than herbaceous species for TE phytoextraction since they have a more developed root system and a higher aerial biomass. Moreover, new plantings are not required each year (trees such as poplars and willows can be managed as short rotation coppice), reducing the cost of this process (Pulford and Watson 2003). However, the number of hyperaccumulators among woody species is between 130 and 140 (approximately 20% of hyperaccumulators), found mainly in tropics, and 75% are only Ni-hyperaccumulators (Saladin, 2015). Consequently, there is a limited choice for the extraction of other TE in the conditions of temperate or cold climates.

Several tree species are able to store as much or more TE (mainly Cd and Zn) than herbaceous hyperaccumulators, especially fast-growing trees such as poplars or willows (Fisherova *et al.* 2006; Di Lonardo *et al.* 2011; Zacchini *et al.* 2011; He *et al.* 2013). Poplars

and willows can adapt to many soils but are more sensitive than conifers to low temperatures and freeze-thaw embolism (Carnicer *et al.* 2013). Until now, conifers are not widely studied for TE phytoextraction but they may be good models for pollutions localized in cold areas (Orlandi *et al.* 2002; Kiikkilä, 2003). Moreover, dry soils may be another constraint for TE phytoextraction and several conifer species may be tolerant to drought. For example, pine species are more tolerant than aspen to water deficit and conifers in the Iberian Peninsula are more resistant than angiosperms to cavitation caused by drought (Hamanishi and Campbell 2011; Carnicer *et al.* 2013). The higher tolerance of conifers to water deficit is not so easy to establish because of intraspecific genetic variation: for example, Douglas firs (*Pseudotsuga menziesii*) and loblolly pines (*Pinus taeda*) exhibit various levels of drought-tolerance according to their geographical origin (Hamanishi and Campbell 2011).

This work aimed at determining the tolerance level of Douglas fir to various TE (As, Pb and Sb) and its capacity to store them in plant parts. Douglas fir is native to North America but this species is widely used in France, particularly for reforestation because it has a fast growth rate compared to most other conifers and for its interesting properties as structural lumber. This study was performed with plantlets grown for ten weeks in greenhouse on soils sampled at two former mines from the center of France and exhibiting different levels of As, Pb and Sb.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Soil sampling, plant material and culture conditions**

The site of Pontgibaud (P) is a former Pb and Ag mine located in the French Massif Central region. The site of La Petite Faye (L) is a former Au mine located 60 km North-East of Limoges (Limousin region nearby French Massif Central). For both sites, soils were directly developed from highly contaminated tailings. Previous work with around 30 soil samples showed that TE concentration was quite homogeneous on the P site (Pascaud *et al.* 2014). According to Wanat *et al.* (2014) who tested 35 soil samples on the L site, two zones (L1 and L2) were separated due to different TE concentrations. Soil samples (the first 15-20 cm) were collected in 2014 and air dried in the laboratory before being sieved to 2 mm and stored at ambient temperature in polyethylene containers. The soil pH was measured in water respecting a soil:solution ratio of 1:5. The cation exchange capacity (CEC) was determined by the 0.05 N cobalt hexamine method at the soil pH. The Organic Matter (OM) content was determined by

the loss ignition method. CaCl<sub>2</sub>-extractable (potentially available fraction) of As, Pb and Sb has been assessed by 0.01 M CaCl<sub>2</sub> with a solid/liquid ratio of 1/10 (Novozamsky, Lexmond, and Houba 1993).

Seeds of Douglas fir were purchased from “Semences Du Puy SARL” (Le Puy-en-Velay, France) and were stored for 2 months at 4°C in plastic bags containing sterile moist sand for stratification. They were then sown in greenhouse in pots (15 cm height, 18 cm diameter) containing contaminated soil. Each soil was previously watered up to its water holding capacity. A control culture substrate (75% compost and 25% sand) without TE was prepared to compare plant growth and development under contaminated and non-contaminated substrates. TE concentrations in control culture substrate are below or close to background level in French soils with 19, 22 and 1.7 mg. kg<sup>-1</sup> for As, Pb and Sb, respectively (Wanat *et al.* 2013). TE background concentrations were reported in the Table 1. For each condition (C, L1, L2 and P), 3 independent experiments were performed with 3 pots for each experiment, bringing the total to 9 pots per condition. After seed sowing, pots were watered twice a week with demineralized water (soils were not fertilized) for 10 weeks, taking care not to cause TE leaching. Photoperiod in greenhouse corresponded to “natural” sunlight (no artificial light was used) from March to June and was between 12 and 14 h light. Temperature varied from March to June from 15 to 25°C with an automatic opening of windows when temperature was higher in greenhouse. Plants were harvested (10 weeks after sowing) and roots were gently rinsed with water (to remove substrate) before to be placed for 1 h in 20 mM EDTA at ambient temperature to remove TE adsorbed on root surface. They were then rinsed with demineralized water before measurements (stem height and main root length) and separation of plant organs (roots, stem and needles). Samples were weighted and separated into two “categories”: one was stored at -20°C (after freezing in liquid N) until biochemical analyses and the other was dried in an oven at 80°C for 2 days to obtain DW and samples for TE quantification.

### **Biochemical analyses**

Needles were ground at 4°C with 80 % (v/v) acetone and 0.5 % (w/v) MgCO<sub>3</sub> to measure the content of photosynthetic pigments (Saladin, Magné, and Clément 2003a). For the other biochemical parameters, quantifications were performed in both roots and needles. Total soluble carbohydrates were extracted in a 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) and quantified with an anthrone-containing reagent and glucose as standard (Saladin, Magné, and Clément 2003b).

Starch remained in the pellet after soluble carbohydrate extraction was resuspended in a solution containing 8 N dimethyl sulfoxide and 37 % HCl (4:1 v/v) and was then quantified with an iodine-HCl reagent (Saladin, Magné, and Clément 2003a).

For total soluble protein assay, samples were ground at 4°C with 0.1 M Tris-Base buffer (pH 8) containing 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 5 mM EDTA (Moussavou Moudouma *et al.* 2013). Supernatants were concentrated using Amicon Ultra-15 centrifugal filters (Millipore Corporation, USA) and used for total protein content assay according to manufacturer's instructions (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, Munich, Germany).

For quantification of total free amino acid, total free proline, total non-protein thiols (NPT) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS, a product of lipid peroxidation used to estimate the level of oxidation), the extraction was performed with a solution of 10 % (w/v) trichloroacetic acid containing 6.3 mM diethylenetriaminepentaacetic acid. Total amino acid and proline were quantified with reagents containing ninhydrine according to Saladin, Magné, and Clément (2003b) with leucine and proline as standards for amino acid and proline content assays, respectively. NPT were assayed with a reagent containing 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) according to Gorinova *et al.* (2007) with cysteine as a standard. TBARS were quantified with a reagent containing 2-thiobarbituric acid according to Saladin, Magné, and Clément (2003b).

### **TE quantification**

Total soil As, Pb and Sb were determined by X-ray fluorescence analyses (XRF) using a XMET 5100 device commercialized by OXFORD Instruments. Acquisitions were generated from pressed pellets at times varying from 60 to 180 s, for major and trace elements, respectively (Pascaud *et al.* 2014). For Douglas firs, dry samples (50 mg) were mixed with 2 mL nitric acid (68 %) and incubated for 9 h at ambient temperature and then for 48 h at 80°C in an oven. A volume of 2 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) was added and samples remained for 9 h at ambient temperature. The final volume was adjusted to 5 mL with demineralized water and samples were then filtrated on PTFE syringe filters (pore diameter 0.45 µM, Millipore Corporation, USA). The concentration of As, Pb and Sb was determined by graphite furnace atomic absorption spectrometry using a Varian SpectrAA 880 Z with a Zeeman background correction system.

We estimated translocation and bioconcentration factors for each TE. Translocation factor (TF) corresponds to the ratio between shoot (needles and stem) and root concentrations whereas the bioaccumulation factor (BF) corresponds to the ratio between shoot and soil concentrations.

### **Statistical analysis**

Results were the mean of 3 independent experiments. For plant growth parameters, 30 plants per independent experiment and per condition (control and TE-exposed plants) were used. Statistical analysis consisted of one-way ANOVA test performed with the PAST software (version 2.17) to compare each set of plants with respect to the measured parameter. When significant difference was found ( $P < 0.05$ ), Tukey's test was carried out.

## RESULTS

### TE concentration in soils and effect on plant growth and development

Soils of both sites (L and P) were highly contaminated as compared to background TE concentrations in French soils (Table 1).

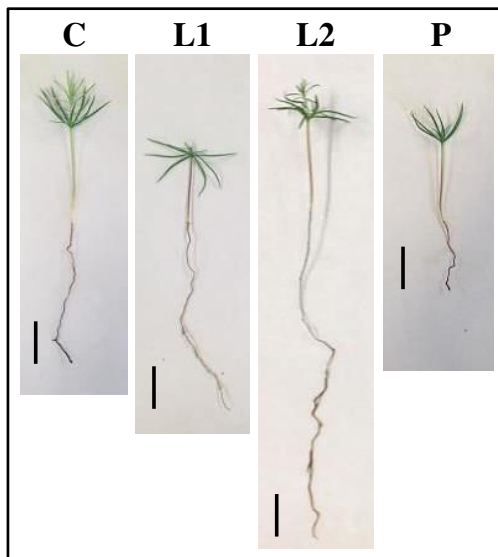
**Table 1.** Physicochemical characteristics of both composite soils in the selected zones L1, L2 and P. The background values correspond to TE ubiquitous concentrations in French soils, *i.e.* TE concentrations in soils distant from sources of pollution (environmental background). These values in France are reported by the National Institute for Industrial Environment and Risks (INERIS 2003, 2007, 2010).

	Units	Background value in France	L1	L2	P
<b>As</b> total	mg. kg <sup>-1</sup>	< 40	89253	1846	1153
<b>Pb</b> total	mg. kg <sup>-1</sup>	< 110	15156	341	14431
<b>Sb</b> total	mg. kg <sup>-1</sup>	< 1	886	40	118
<b>As-CaCl<sub>2</sub></b> extractable	mg. kg <sup>-1</sup>		6.2	14.8	< DL
<b>Pb-CaCl<sub>2</sub></b> extractable	mg. kg <sup>-1</sup>		3.3	< DL	588
<b>Sb-CaCl<sub>2</sub></b> extractable	mg. kg <sup>-1</sup>		0.8	0.2	0.04
<b>pH</b> water			3.8	5.4	4.2
<b>OM</b>	g. kg <sup>-1</sup>		77	97	43
<b>CEC</b>	cmol. kg <sup>-1</sup>		2.6	17.9	4.2
<b>Texture</b>			Silt loam	Silty clay loam	Sandy loam

OM: Organic Matter; CEC: Cation Exchange Capacity; DL: detection limit. The limits of detection for total soil As, Pb and Sb are 3, 5 and 34 mg. kg<sup>-1</sup>, respectively. The limits of detection for As-, Pb-, and Sb-CaCl<sub>2</sub> extractable are 2, 2 and 0.2 µg. kg<sup>-1</sup>, respectively.

Total soil As, Pb and Sb concentrations were higher for L1 than L2 and P. L2 had the lowest Pb and Sb concentrations but As concentration was higher than in P. According to TE concentrations (even if it is difficult to really sum As, Pb and Sb concentrations), soils may be classified as follows: L1 (highest As, Pb and Sb concentrations) > P > L2 (lower Pb and Sb concentrations compared with P). As-, Pb- and Sb- extractions with CaCl<sub>2</sub> showed that the P soil exhibited a high level of Pb phytoavailability (588 mg. kg<sup>-1</sup>) and a very low level of As and Sb phytoavailability (Table 1). The L1 and P soils had a pH around 4 and a low CEC of 2.6 and 4.2 cmol. kg<sup>-1</sup>, respectively, and the P soil exhibited a low organic matter content (43 g. kg<sup>-1</sup>).

The three soils did not modify the percentage of seed germination compared to the control soil (around 70%) but had different impacts on Douglas fir growth (Figure 1 and Table 2). P soil strongly altered needle, stem and root biomass by 70, 40 and 25 %, respectively. Moreover, plantlets were smaller with a stem height of 3.6 cm (6.1 for control plantlets) and a reduction of the main root close to 60 %.



**Figure 1.** Effect of TE on Douglas fir phenotype. Seeds were sown on control soil (C) containing compost and sand (3v:1v) or on TE-contaminated soils L1, L2 and P. Plantlets were harvested ten weeks later for phenotype analysis. Bar scales correspond to 2 cm.

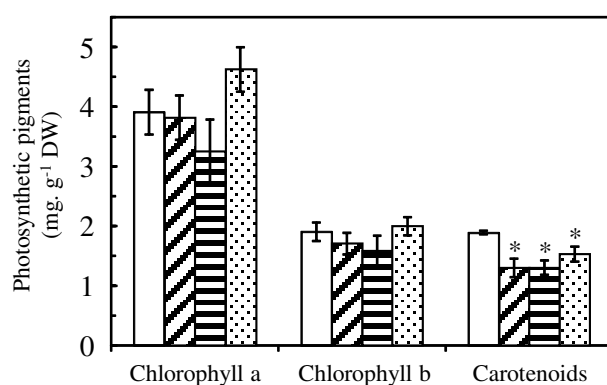
When grown on L1 soil, plantlets showed a decrease of aerial organ growth with a needle and stem biomass reduced by 62 and 48 %, respectively. Moreover, stem height was 47 % lower than control. However, root biomass was not significantly modified and the main root was even longer with an increase by 15 % compared to control. A quite similar observation was recorded for plantlets on L2 soil: aerial biomass and stem height were lower than control (but higher than plantlets on L1 soil) and the main root was longer than control with an increase by 75 %. Moreover, for plantlets on L2 soil, root biomass was 50 % higher than control.

**Table 2.** Effect of TE on Douglas fir growth. Seeds were transferred on soils from L1, L2 and P and plantlets were harvested ten weeks later. Control corresponds to a culture substrate containing compost and sand (3v:1v).

	Stem height (cm)	Main root length (cm)	DW (mg)		
			Needles	Stem	Roots
<b>Control</b>	6.1 ± 0.6 a	6.8 ± 0.7 a	12.8 ± 1.6 a	4.7 ± 0.4 a	2.0 ± 0.3 a
<b>L1</b>	3.3 ± 0.4 b	7.8 ± 1.1 b	4.8 ± 0.5 b	2.4 ± 0.1 b	2.1 ± 0.3 a
<b>L2</b>	4.6 ± 0.7 c	11.9 ± 1.7 c	9.4 ± 0.4 c	3.7 ± 0.3 a	2.9 ± 0.1 b
<b>P</b>	3.6 ± 0.5 b	2.8 ± 0.4 d	3.8 ± 0.5 b	2.8 ± 0.1 b	1.5 ± 0.1 c

Results are the mean ± SE of 3 independent experiments with 30 plants per independent experiment and per condition. For each growth parameter (*i.e.* each column), different letters between two means (± SE) correspond to significant differences ( $P < 0.05$ ).

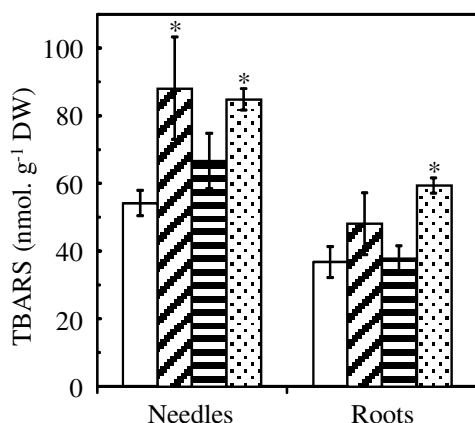
For photosynthetic pigments, chlorophyll a and b contents were not significantly modified compared to control, whatever the TE-contaminated soil (Figure 2).



**Figure 2.** Content of photosynthetic pigments in needles of Douglas firs after ten weeks on control soil (white bars) or TE-contaminated soils from L1 (hatched lines), L2 (horizontal lines) or P (dots). Results are the mean of 3 independent experiments. Asterisks correspond to a significant difference compared to control ( $P < 0.05$ ).

However, carotenoid content decreased by 20-30 % in needles of plantlets grown on L or P soils. The oxidation level of plant parts, represented by TBARS accumulation, increased for the P trees in both roots and needles whereas it increased only in needles for the L1 trees and was not modified for the L2 trees, whatever the organ (Figure 3).

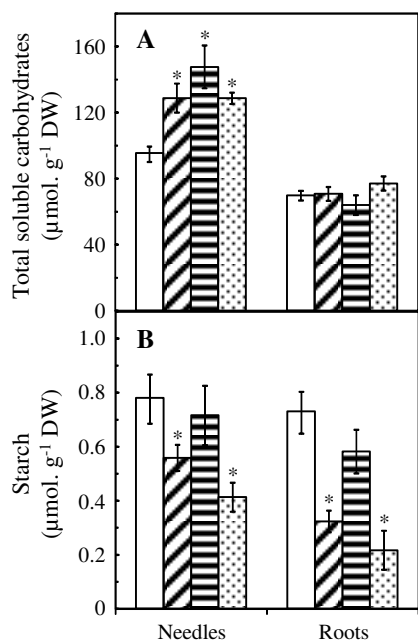




**Figure 3.** TBARS content in needles and roots of Douglas fir after ten weeks on control soil (white bars) or TE-contaminated soils from L1 (hatched lines), L2 (horizontal lines) or P (dots). Results are the mean of 3 independent experiments. Asterisks correspond to a significant difference compared to control ( $P < 0.05$ ).

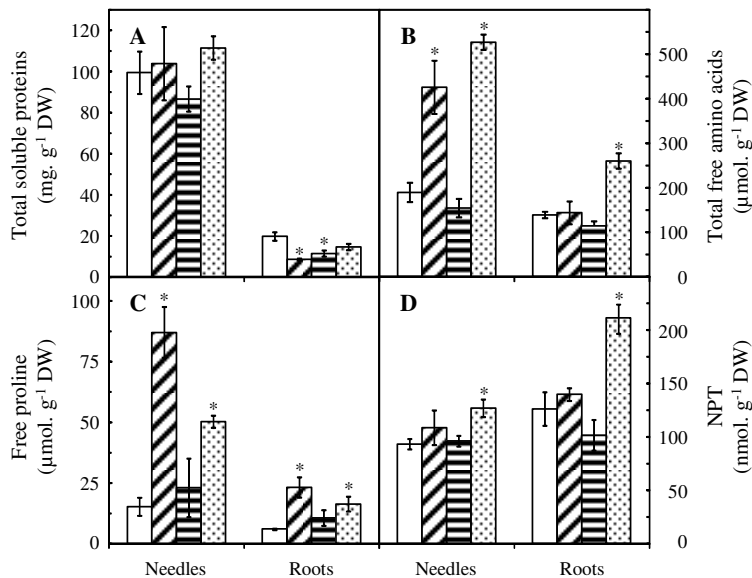
### Effect of TE on carbon and nitrogen nutrition

Total soluble carbohydrate content was not significantly modified in roots of plantlets exposed to TE whereas an increase of 35-55 % was observed in needles compared to the control (Figure 4A). In parallel, a significant decrease of starch concentration was recorded in both roots and needles for plantlets grown on L1 and P soils but not for plantlets grown on L2 soil (Figure 4B). This decrease was higher for the P trees with a decrease by 50 and 70 % in needles and roots, respectively, whereas the percentage of reduction was 30 and 55 for the L1 trees.



**Figure 4.** Total soluble carbohydrate (A) and starch (B) contents in needles and roots of Douglas fir after ten weeks on control soil (white bars) or TE-contaminated soils from L1 (hatched lines), L2 (horizontal lines) or P (dots). Results are the mean of 3 independent experiments. Asterisks correspond to a significant difference compared to control ( $P < 0.05$ ).

When compared to control, the L2 trees did not exhibit strong modification of nitrogen nutrition. The only variation was a decrease in root total protein concentration (Figure 5A) whereas differences were not significant compared to control for total amino acid and free proline contents in both needles and roots (Figures 5B and 5C).



**Figure 5.** Contents of total soluble proteins (A), total free amino acids (B), free proline (C) and NPT (D) in needles and roots of Douglas firs after ten weeks on control soil (white bars) or TE-contaminated soils from L1 (hatched lines), L2 (horizontal lines) or P (dots). Results are the mean of 3 independent experiments. Asterisks correspond to a significant difference compared to control ( $P < 0.05$ ).

For the L1 trees, total amino acids accumulated in needles by a factor 2.2 and free proline concentration increased in both needles and roots by a factor 5.7 and 4, respectively. Concerning total soluble protein content, no modification was observed in needles for the L1 trees whereas the content in roots decreased by 55 %. For the P trees, total protein concentration was not significantly modified whereas total free amino acids (including proline) accumulated in both needles and roots. The NPT assay showed that only the P trees accumulated more NPT than control (in needles and roots) whereas the concentration remained close to control for the L1 and L2 trees (Figure 5D).

**Table 3.** Accumulation and distribution of As, Pb and Sb in Douglas firs. Seeds were sown on soils from L1, L2 and P and plantlets were harvested ten weeks later. TE concentration in organs was expressed in mg. kg<sup>-1</sup> DW and total amount in organs was expressed in µg (for As and Pb) or ng (for Sb) per plantlet. The percentage of TE in shoots was calculated as a function of TE total amounts in shoots and roots.

	As			Pb			Sb		
	L1	L2	P	L1	L2	P	L1	L2	P
Shoot concentration	1527 ± 77	833 ± 12	391 ± 41	135 ± 20	5 ± 0.2	150 ± 40	6.97 ± 1.02	1.03 ± 0.52	0.60 ± 0.05
Root concentration	7897 ± 263	768 ± 46	484 ± 10	1476 ± 156	9 ± 1	8849 ± 208	127.5 ± 8.4	4.9 ± 0.7	7.8 ± 0.7
TF	0.20	1.10	0.79	0.10	0.64	0.01	0.05	0.18	0.11
BF	0.03	0.44	0.33	0.03	0.02	0.09	0.04	0.04	0.01
Shoot total amount	10.99 ± 0.52	10.94 ± 0.17	2.54 ± 0.25	0.97 ± 0.11	0.21 ± 0.10	1.02 ± 0.029	50 ± 7	0.21 ± 0.10	1.02 ± 0.029
Root total amount	16.81 ± 0.79	2.27 ± 0.17	0.70 ± 0.03	3.01 ± 0.22	0.03 ± 0.003	12.81 ± 0.04	270 ± 16	14 ± 2	11 ± 1
Percentage in shoots	40	83	76	24	82	6	16	47	26

Results are the mean ± SE of 3 independent experiments. The limits of TE detection are 2, 2 and 0.2 µg. kg<sup>-1</sup> for As, Pb and Sb, respectively.

## **TE accumulation in plants**

As was accumulated by Douglas fir plantlets (Table 3). Plantlets grown on L1 soil accumulated more As in both shoots (compared with L2 and P) and roots with a shoot As concentration higher than 1 g. kg<sup>-1</sup> DW (threshold for hyperaccumulators). The As concentration was lower for plantlets on L2 soil but close to the threshold with a shoot content of 0.83 g. kg<sup>-1</sup> DW. Moreover, TF was more interesting for the condition L2 with a factor higher than 1 (index corresponding to hyperaccumulators) whereas it was only 0.2 for the L1 treatment. When calculating the percentage of As accumulated in shoots, we recorded 83 % for L2 and only 40 % for L1. Plantlets grown on P soil exhibited a lower shoot concentration (0.39 g. kg<sup>-1</sup> DW) although TF and percentage of As stored in shoots were quite interesting (0.79 and 76, respectively). Concerning Pb and Sb accumulation, shoot concentrations and TF were low whatever the soil (L or P).

## **DISCUSSION**

### **Is Douglas fir able to grow correctly on the L and P contaminated soils?**

Here P soil reduced the growth of Douglas fir plantlets since they were smaller than controls (stem height and root length were roughly reduced by a factor 2) and had a lower biomass of needles and roots. Chlorophyll and total soluble protein contents remained close to control and plantlets accumulated more free amino acids (including proline) and NPT. These results may be considered as defense responses since proline and NPT can play a role against oxidation caused by TE and can be involved in TE scavenging depending on TE and tree species (Szabados and Savouré 2010; Zacchini *et al.* 2011; Ivanov, Savochkin, and Kuznetsov 2012). Moreover, the accumulation of soluble carbohydrates in needles may be due to starch hydrolysis. These carbohydrates may be involved in membrane protection to limit oxidation and thus to maintain photosynthetic activity (Van den Ende and Valluru 2009). However, carbohydrate mobilization for defenses reduced the quantity of carbon compounds required for an optimal growth. Furthermore, plantlets exhibited in parallel a significant increase of TBARS content and a decrease of carotenoid concentration, suggesting that defense responses were not sufficient to counteract the oxidative stress caused by excessive TE exposure in P soil.

Douglas firs grown on L1 exhibited a reduction of aerial organ growth (stem height and needle biomass) but root elongation increased (roughly 15 % compared to control). This

elongation was more obvious on plantlets grown on L2 soil since root length was 75 % higher than control (and root biomass increased by 50 %). The development of root system (elongation of the main root or development of more lateral roots) as a response to TE excess was reported as a stress-induced morphogenesis response (SIMR) (Potters *et al.* 2007, 2009). SIMR is interpreted as an acclimation to mild chronic stress to find better growth conditions, *i.e.* a soil containing less toxic elements (TE or salts for example) or in contrast a soil with higher nutrient content. SIMR is regulated by several pathways involving at least a gradient of reactive oxygen species and a redistribution of growth factors (such as auxin and ethylene) that modify growth orientation. However, Hopff, Wienkoop, and Lüthje (2013) showed on maize roots exposed to various Fe concentrations that SIMR was reduced when Fe concentration was too high. SIMR was more efficient for plantlets grown on L2 than L1 soil, probably because of the lower TE concentrations in L2 soil (and the lower Pb phytoavailability) and the subsequent lower TE concentration in roots. As a result, TBARS level and starch content were not significantly modified in L2 trees whereas oxidation level increased and starch reserves decreased in L1 trees. This indicates that L1 trees may not be able to counteract stress for additional months or weeks. Thus, among the three tested soils, Douglas fir plantlets had a correct growth rate (as compared to the control) only on L2 soil.

### **Is Douglas fir efficient to accumulate As recorded in L and P?**

L2 soil is highly contaminated by As since its concentration was approximately 45 times the background value in France. Nevertheless, plant growth was not strongly modified after 10 weeks on this soil (Table 2). Shoot As concentration was close to the minimal level for hyperaccumulating species (*i.e.* 1 g. kg<sup>-1</sup> DW) and TF (higher than 1) indicated a high rate of translocation from roots to shoots. When calculating the total amount of As accumulated per plantlet, 83 % of As was stored in shoots, which is interesting for phytoextraction. Currently, no conifer species is considered as a hyperaccumulator, as TE are mostly stored in their root system (Fuentes *et al.* 2007a, 2007b; Ivanov, Savochkin, and Kuznetsov 2011; Moussavou Moudouma *et al.* 2013). A study using 3 year-old Douglas firs exposed to Cd for 9 months confirmed this tendency (Astier, Gloaguen, and Faugeron 2014). However, Bergqvist and Greger (2012) compared As distribution of several plant species (including conifers) and showed that *Picea abies* accumulated more As in shoots by contrast to *Pinus sylvestris* which accumulated more As in roots. Pratas *et al.* (2005) compared *Pinus pinaster* and two *Quercus* species growing on former mines contaminated with several TE including As. They showed

that pine needles accumulated more As than oak with concentrations of 10 and 30 mg. kg<sup>-1</sup> DW in young and old needles, respectively. These values were under the threshold for hyperaccumulators but total soil As concentration was not very high (76 mg. kg<sup>-1</sup> DW). Another study showed that *Pinus pinaster* needles could accumulate up to 140-150 mg As. kg<sup>-1</sup> DW but needles exhibited visible injuries (maybe partly due to a Mn deficiency) (Mench *et al.* 2006). Since TE phytoremediation may depend on the TE, its concentration in soil (and its phytoavailability) as well as the conifer species, Douglas firs may be a promising tool for As phytoextraction. However, we have to keep in mind that experiments were performed with plantlets and that high shoot concentration and TF we registered may decrease with aged trees.

For plantlets grown on L1 soil, shoot As concentration was twice higher than that for the L2 plantlets but As accumulated more in roots with a TF of 0.2. The low pH and CEC of L1 soil facilitate TE mobility and probably root uptake. It is possible that the growth rate reduction of aerial biomass for L1 trees slows down the translocation rate from roots to shoots. In the P trees, As TF remained close to the TF calculated for the L2 trees but As shoot concentration was 50 % lower than in the L2 trees. It can be explained not only by the lower As concentration in P soil compared to L2 soil but also by the higher Pb availability and Pb concentration in roots which may decrease As uptake in the P trees. Thus, As phytoextraction by Douglas fir may be efficient if As concentration in soils is under a threshold which has to be determined (As content in L1 soil is 50 times higher than the concentration in L2 soil) and if the soil concentration and phytoavailability of other TE is not too much important (Pb and Sb concentrations in P soil are 40 and 3 times higher than in L2 soil, respectively).

### **Are Douglas fir plantlets efficient to accumulate Pb and Sb present in L and P?**

Total soil Pb is high in L1 and P soils but shoot Pb concentrations were relatively low (130-150 mg. kg<sup>-1</sup> DW) compared to Pb hyperaccumulators (the minimal concentration for Pb hyperaccumulators is 1 g. kg<sup>-1</sup> DW in shoots). Similar low Pb concentrations in shoots were found in other non-hyperaccumulating species growing on highly Pb-contaminated sites (Rotkittikhun *et al.* 2006). We showed that Pb was stored preferentially in roots, resulting in a TF of 0.1 and 0.01 for plantlets grown on L1 and P soils, respectively. This confirmed previous findings on preferential Pb accumulation in roots even for Pb hyperaccumulating trees such as *Sesbania drummondii* or *Populus x canescens* (Sahi *et al.* 2002; Dai *et al.* 2012). TF was higher for plantlets grown on L2 soil (0.64) but shoot and root Pb concentrations were negligible,

corresponding to less than 10 mg. kg<sup>-1</sup> DW. Similar low concentrations were found in roots and leaves of several crops (maize, barley, white cabbage, common bean...) growing on slightly Pb-contaminated soils, confirming the lack of efficiency of the L2 plantlets for Pb phytoextraction (Sękara *et al.* 2005). According to our results, Douglas fir would not be interesting for Pb phytoextraction on soils highly or moderately Pb-contaminated but may be relevant for phytostabilization.

Concerning Sb, shoot and roots concentrations found in plantlets were too low to consider Douglas fir as an interesting model for Sb phytoextraction. Indeed, shoot Sb concentrations were between 0.6 and 7 mg. kg<sup>-1</sup> DW whereas the lowest Sb concentration for Sb hyperaccumulators is 1 g. kg<sup>-1</sup> DW. Similar results were reported for *Pinus pinaster* grown on a soil with a Sb concentration of 663 mg. kg<sup>-1</sup> DW, thus between the L1 and P soils: Sb concentrations were only 1.4 and 1.8 mg. kg<sup>-1</sup> DW in young and old needles, respectively (Pratas *et al.* 2005). Feng *et al.* (2013) reported only around 10 Sb herbaceous hyperaccumulators but no woody species. For conifers, Sb concentration peaked at 10-15 mg. kg<sup>-1</sup> DW in shoots of *Pinus* species and 120-130 mg. kg<sup>-1</sup> DW for *Juniperus* species (Levresse *et al.* 2012). Based on our data, Douglas fir would not be a relevant candidate for Sb phytoaccumulation.

It is likely that 2-3 year-old trees could be more resistant than plantlets to the high total soil As, Pb and Sb present in the L and P soils. In previous findings, 3 year-old Douglas firs and 2 year-old larch species (*L. x eurolepis* and *L. decidua*) exposed for 9 months to 25 mg Cd. g<sup>-1</sup> DW did not exhibit significant changes in growth and development (Astier, Gloaguen, and Faugeron 2014; Bonet *et al.* 2014). Thus, it would be interesting to test the efficiency of As, Pb and Sb phytoextraction with 2-3 year-old Douglas firs and to improve the process by testing various fertilizations to stimulate tree growth and / or soil conditioners to increase soil TE solubility and subsequent absorption by roots (Do Nascimento, Amarasiriwardena, and Xing 2006). Mycorrhization could be another alternative to increase TE uptake and accumulation by Douglas fir but studies related to several other conifer species did not always show positive results for TE phytoextraction as reported by Saladin (2015).

## CONCLUSION

Two topsoils, L1 collected at a former Au mine and P sampled at a former Pb / Ag mine were toxic for Douglas fir plantlets since their growth was reduced and oxidation level increased in both shoots and roots. In contrast, the stress was moderate for plantlets grown on L2 soil sampled at the Au mine. For Douglas fir grown on this L2 soil, shoot biomass was slightly reduced, the oxidation level was close to control and carbon and nitrogen metabolisms were not strongly modified. Moreover, the L2 plants had a higher root DW yield than the control plants with a longer main root. For TE accumulation, Douglas fir plants could be relevant for As phytoextraction, particularly for the L2 soil, with a TF higher than 1. However, we have to keep in mind that poplars or willows have a higher growth rate and that As phytoextraction by conifers such as Douglas fir could take a longer time. The higher efficiency of As phytoextraction on L2 soil compared to L1 and P soils may be explained by the soil texture (silty / clay / loam with a higher OM content), the higher CEC and probably the lower Pb mobility. Pb and Sb phytoextraction by Douglas firs was low, indicating that this conifer species may be use for phytostabilization of these TE. Additional work will be carried out to improve Douglas fir growth and As, Pb and Sb phytoextraction by testing various amendments.

*N.B. : Les références bibliographiques de cette publication ont été reportées à la fin du manuscrit (avec l'ensemble des autres références bibliographiques).*





## Interprétation et discussion des principaux résultats obtenus

Les premiers résultats de cette étude ont montré que les 3 sols étudiés (L1 et L2 issus du site de La Petite Faye ; P : issu du site de Pontgibaud) sont fortement contaminés en As, Pb et Sb par rapport aux valeurs ubiquitaires retrouvées dans les sols français. Le classement de ces sols selon leurs niveaux de concentrations en ces ET est le suivant : L1 (plus concentré en As, Pb et Sb) > P (moins riche en As par rapport à L2) > L2 (moins concentré en Pb et Sb par rapport à P). L'extraction au CaCl<sub>2</sub> a montré une forte phytodisponibilité du Pb dans le sol P tandis que celle-ci est négligeable pour l'As et le Sb. Les sols L1 et P ont un pH voisin de 4 (limite de pH supporté par le Douglas d'après Zas, 2003) et une faible CEC tandis que le sol de P présente une teneur en matière organique faible par rapport aux deux autres sols. Malgré les caractéristiques de ces 3 sols, le pourcentage de germination (70 %) des graines de Douglas n'a pas été affecté. Néanmoins, nous avons constaté divers impacts sur le développement des plantules qui poussent sur ces derniers.

Les plantules ayant poussé sur le sol L1 présentaient une réduction de la croissance des organes aériens mais un allongement des racines (d'environ 15 %). Cet allongement a également été constaté chez les plantules ayant poussé sur le sol L2 avec une augmentation plus marquée (de 75 %) et accompagnée d'une biomasse racinaire plus importante (augmentation de 50 %). Ce développement du système racinaire peut être interprété comme une réponse morphogénique induite par le stress (RMIS) décrite par Potters *et al.* (2007 et 2009). Généralement l'augmentation de surface racinaire liée à la RMIS se traduit par un arrêt de croissance de la racine principale au profit du développement de racines secondaires. Ce phénomène est expliqué par la délocalisation de l'auxine qui induit une dédifférenciation du péricycle ce qui stimule la division et l'élongation cellulaire au niveau des méristèmes latéraux (Potters *et al.*, 2007; Zolla *et al.*, 2010). Cependant, il a pu être montré dans quelques cas que la croissance de la racine principale n'était pas stoppée et que celle-ci s'allongeait davantage que celle de plantes témoins non soumises à un stress (Hopff *et al.*, 2013). C'est ce type d'élongation que nous avons pu observer pour les plantules ayant poussé sur les sols L. Nos résultats ont montré que cette RMIS était moins marquée chez les plantules ayant poussé sur le sol L1 que sur le sol L2. Il est possible que sur le sol L1, les plantules aient subi un niveau de stress trop important pour augmenter suffisamment leur système racinaire. En effet, bien que le Douglas supporte des sols acides, le sol L1 présente tout de même un pH relativement acide de

l'ordre de 4. De plus, le sol L1 présente une très faible capacité d'échange cationique (CEC). Les paramètres de croissance des plantules ayant poussé sur le sol L1 ont cependant été moins affectés que pour les plantes ayant poussé sur le sol P. Il est possible que la forte concentration en proline observée pour les plantules cultivées sur le sol L1 ait joué un rôle dans la capacité de ces plantules à supporter au moins pendant 2 mois et demi les conditions de culture.

Les plantules de Douglas qui ont poussé sur le sol P ont développé plusieurs stratégies de défense contre les ET :

- 1) l'accumulation de proline peut-être bénéfique à deux niveaux : à la fois pour développer une action anti-oxydante mais aussi pour former des complexes chélateurs d'ET.
- 2) l'accumulation de thiols non protéiques (TNP) peut-être également considérée comme un moyen de défense mais le dosage des TNP étant global, il ne nous permet pas de savoir si c'est la teneur en glutathion (chélateur d'ET mais surtout anti-oxydant) ou celle en phytochélatines (chélateurs d'ET) qui est davantage stimulée ou les deux à la fois.
- 3) l'accumulation de glucides solubles dans les aiguilles (très probablement liée à l'hydrolyse de l'amidon dans les aiguilles et les racines) peut permettre aux cellules de mieux protéger leur membrane plasmique contre l'oxydation et donc permettre de maintenir l'activité photosynthétique (Van den Ende et Valluru, 2009). Cependant, la mobilisation des glucides solubles s'est probablement faite au détriment de la croissance, laquelle a été fortement réduite par rapport aux témoins (de 70, 40 et 25 % pour les aiguilles, tige et racines, respectivement).

Malgré la mise en place de ces réponses, les résultats ont montré une hausse significative de la peroxydation des lipides, montrant ainsi que ces composés de défense ne sont pas suffisamment efficaces pour lutter contre l'action des ET sur le sol P. Ce sol s'avère très toxique pour les plantules de Douglas, probablement à cause de la forte phytodisponibilité du Pb et de la faible teneur en matière organique.

Pour les plantes cultivées sur le milieu L2, la plupart des paramètres mesurés sont restés proches des valeurs des témoins, indiquant que le Douglas peut supporter ce type de sol pendant plusieurs semaines. Les résultats ont montré pour cette condition, que les plantules accumulaient l'As dans leurs parties aériennes avec une concentration proche du minimum requis pour les espèces hyperaccumulatrices d'As (1 g. kg<sup>-1</sup> MS). En effet, une teneur de 0,83

g. kg<sup>-1</sup> MS a été mesurée et les plantules possédaient un facteur de translocation (FT) supérieur à 1 (valeur minimale des espèces hyperaccumulatrices). De plus, 83 % de l'As total absorbé a été stocké dans les parties aériennes. Ainsi, le Douglas pourrait être un candidat potentiel pour la phytoextraction de l'As avec un sol possédant des caractéristiques proches de L2, c'est-à-dire un sol de type limon / argile riche en matière organique, avec une CEC élevée, un pH aux alentours de 5,5 et une faible phytodisponibilité en Pb et Sb.

Par ailleurs, nous avons montré que le Pb était stocké préférentiellement dans les racines conduisant alors à des FT extrêmement faibles pour les plantules cultivées sur les sols L1 et P. Bien que le FT soit plus élevé pour les plantules cultivées sur sol L2 (0,64), les concentrations en Pb dans les parties aériennes et souterraines étaient négligeables (moins de 10 mg. kg<sup>-1</sup> MS). Même si les sols L1 et P sont les moins bien tolérés par les plantules, nous avons pu voir que le sol L1 avait un effet moins toxique sur les plantules que le sol P. Ainsi, le Douglas ne présenterait pas d'intérêt réel pour la phytoextraction du Pb sur les sols modérément ou fortement contaminés mais pourrait être pertinent pour la phytostabilisation du Pb du sol L1. Concernant le Sb, les très faibles concentrations mesurées dans les parties aériennes (entre 0,6 et 7 µg. kg<sup>-1</sup> MS) ainsi que les faibles FT ne permettent pas d'envisager le Douglas comme un modèle valable en phytoextraction de Sb.

En résumé, le Douglas semble être un candidat à mieux caractériser par la suite pour une possible phytoextraction de l'As sur le sol L2 ou sur un sol présentant des propriétés proches. Par contre, les très faibles concentrations en Pb et Sb détectées dans le Douglas sur le sol L2 laissent penser que cette espèce ne pourrait pas participer à la phytoextraction de ces ET, à moins de tester des amendements favorisant la mobilité de Pb et Sb dans le sol et de voir si ces traitements facilitent l'absorption racinaire des ET et le transfert vers les parties aériennes. Une alternative serait de planter en parallèle d'autres espèces plus efficaces pour extraire les ET difficilement absorbés par le Douglas. L'augmentation de la solubilité des ET dans le sol par des amendements appropriés serait aussi à envisager sur les sols L1 et P. De plus, il serait également souhaitable d'apporter des fertilisants sur ces sols car nos résultats ont montré que ces sols présentent une faible teneur en matière organique (surtout pour le sol P), une faible CEC et un pH relativement acide aux alentours de 4.

Les résultats de cette étude sont bien entendu à interpréter avec précautions car celle-ci a été effectuée en serre et sur une durée de 10 semaines. Elle ne prend donc pas en compte les variations de précipitations et atténue en grande partie les écarts de température et d'intensité lumineuse (lesquels peuvent influencer sur l'absorption racinaire). De plus, ces travaux ont été réalisés sur des plantules de quelques semaines et il est fort probable que des arbres plus âgés montrent une meilleure tolérance et avec peut-être des capacités d'absorption différentes. Cependant, le taux de phytoextraction peut diminuer avec l'âge des arbres comme l'ont montré Mertens *et al.* (2006) avec du saule, c'est pourquoi un apport de fertilisants serait à envisager pour stimuler la croissance des Douglas et / ou améliorer la solubilité des éléments traces et leur absorption ultérieure par les racines. En prenant en compte ces paramètres, il serait donc intéressant de tester l'efficacité de Douglas de 2 à 3 ans sur un temps d'exposition de quelques années, c'est-à-dire 2 à 5 ans comme ce qui est généralement réalisé sur le terrain *via* la technique de taillis à courte rotation (Labrecque et Teodorescu, 2003).

**CONCLUSIONS**  
**ET**  
**PERSPECTIVES**



## Conclusions et Perspectives

Le bilan global de ce travail et les perspectives possibles sont présentés selon deux directions. La première est liée à la concentration et à la quantité d'ET mesurées dans les conifères testés et la potentialité avérée ou non de ces conifères pour la phytoremédiation. Le second axe porte sur les réponses physiologiques qui ont pu être mises en évidence et les voies métaboliques qui pourraient être par la suite explorées davantage pour mieux comprendre les mécanismes d'accumulation des ET par les conifères.

### Axe 1 : La place des conifères en phytoremédiation des ET

#### ❖ Accumulation du Cd par les conifères

Le premier objectif de cette étude était de déterminer si des espèces de conifères implantées localement pouvaient accumuler des quantités acceptables d'ET et être utilisées pour la phytoextraction. A ce jour, aucune espèce de conifère n'a été décrite comme hyperaccumulatrice d'un ou de plusieurs ET (Saladin, 2015). Notre hypothèse initiale de travail était que les conifères que nous avons sélectionnés n'avaient probablement pas les critères nécessaires pour être qualifiés d'hyperaccumulateurs mais qu'ils pouvaient peut-être présenter une capacité intéressante d'extraction et d'accumulation d'ET. Le modèle se rapprochant le plus de ce qui est utilisé sur le terrain correspond aux mélèzes (hybride, d'Europe et du Japon) de 2 ans cultivés en serre et exposés pendant 9 mois à une contamination artificielle de leur substrat par du Cd.

Les travaux réalisés sur ce modèle ont mis en évidence que les mélèzes ne présentaient pas de modifications de croissance par rapport aux témoins lorsque qu'ils ont été exposés à des concentrations de Cd dans le sol de 12,5 et 25 mg. Cd. kg<sup>-1</sup> sol sec. Parmi les 3 espèces testées, le mélèze du Japon est celui qui a présenté la plus forte concentration en Cd dans les parties aériennes, le meilleur facteur de transfert et la quantité de Cd la plus élevée au niveau aérien, notamment grâce à un ratio de biomasse aérienne sur racinaire plus élevé que celui des deux autres mélèzes. Nous avons présenté au départ le mélèze hybride comme plus vigoureux que ses parents et plus tolérant à divers stress environnementaux biotiques et abiotiques. Nos



résultats ont montré que malgré ces meilleures prédispositions, le mélèze hybride n'apparaît pas comme plus intéressant que les mélèzes d'Europe et du Japon en ce qui concerne la capacité d'accumulation du Cd. Concernant le mélèze du Japon, les valeurs obtenues pour les différents calculs (concentration et quantité de Cd dans les parties aériennes et facteur de transfert) sont très faibles par rapport à d'autres espèces d'arbres fréquemment utilisées en phytoextraction comme le saule, le peuplier ou encore le bouleau. Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire (Astier, 2010 ; Astier *et al.*, 2014) sur du Douglas dans les mêmes conditions de culture et de traitements au Cd que les nôtres, ont montré que cette espèce avait une concentration en Cd 1,5 fois plus importante que le mélèze du Japon dans les parties aériennes mais un facteur de transfert 4 fois plus faible (évalué à environ 0,3).

Afin d'améliorer la capacité d'extraction du Cd par le Douglas et le mélèze du Japon, il serait nécessaire de stimuler la croissance des conifères. En effet, bien que le Douglas et les mélèzes soient souvent présentés comme des conifères à croissance rapide, cette croissance reste inférieure à celle des saules et des peupliers déjà utilisés en phytoextraction. De plus, il serait également nécessaire de pouvoir augmenter la biodisponibilité du Cd dans le sol. En effet, concernant ce dernier point, nos résultats ont montré que le Cd était peu phytodisponible, ce qui peut expliquer la faible absorption et le faible stockage final de Cd par les conifères. Pour améliorer ces deux points (croissance et phytodisponibilité), diverses stratégies pourraient être combinées comme l'utilisation de fertilisants, d'amendements et / ou de mycorhizes adaptées (Fischerová *et al.*, 2006 ; Sessitsch *et al.*, 2013). Si ces améliorations aboutissaient malgré tout à une efficacité d'extraction du Cd inférieure à celle des saules ou peupliers en zone tempérée, le Douglas et le mélèze du Japon pourraient tout de même être des candidats d'intérêt sur des sites pollués en zone plus froide. Il est à noter toutefois que des conifères peuvent se montrer plus résistants que des angiospermes sur certains sols pollués comme l'ont montré Wang et Jia (2010). En effet, ces auteurs ont montré qu'après une saison sur un sol contaminé en Cd, Cu et Zn, des peupliers (*P. canadensis*) âgés de 2 ans au début de l'expérience ont vu leur croissance réduite de 26 % par rapport aux témoins alors que des mélèzes (*L. olgensis*) du même âge cultivés dans les mêmes conditions ne présentaient pas de modification de croissance.

### ❖ Accumulation d'As, Pb et Sb

Concernant la capacité d'accumulation d'ET, nous avons également entrepris une étude avec des sols pollués en plusieurs ET (As, Pb et Sb) et collectés en Limousin (La Petite Faye - sols notés L1 et L2) et en Auvergne (Pontgibaud - sol noté P). Un modèle plantule est plus fragile qu'un modèle arbre donc si les plantules tolèrent un stress à ce stade de développement, il est probable que des arbres de 2 ans le supportent également. Les travaux ont montré que le Douglas pourrait être un candidat potentiel à tester pour une phytoextraction de l'As sur le sol L2 ou sur un sol présentant des caractéristiques similaires. Par contre, les faibles concentrations en Pb et Sb mesurées dans la biomasse aérienne laissent penser que le Douglas ne serait pas adapté pour la phytoaccumulation de ces deux ET, à moins peut-être de favoriser la phytodisponibilité de Pb et Sb dans le sol (mais au risque de générer une toxicité pour la plante).

Une bonne connaissance du site contaminé détermine les objectifs de réhabilitation. En effet, de nombreux paramètres sont à prendre en compte pour optimiser le procédé, notamment en ce qui concerne les amendements : l'apport d'amendements pour stimuler la croissance des arbres et d'autres amendements pour augmenter la biodisponibilité des ET dans le sol doit être contrôlé et régulé de manière à ne pas entraîner de lessivage trop important des ET et / ou d'absorption trop rapide d'ET menant à une toxicité pour l'arbre. L'intégration d'un projet de phytoremédiation sur les sites de la Petite Faye (L) et de Pontgibaud (P) nécessiterait en amont des tests supplémentaires sur les plantules en serre qui peuvent être divisés en 3 catégories successives :

1) Un premier volet serait de comparer et de sélectionner des amendements qui favoriseraient la croissance des plantules de Douglas et donc leur biomasse. Des expériences ont débuté très récemment au laboratoire dans ce sens avec l'ajout d'une solution nutritive (riche en N, P et K entre autres) dans les 3 sols (L1, L2 et P) basée sur le protocole de Friend *et al.* (1990), lequel est adapté aux cultures de jeunes plants de Douglas. Un autre essai est en cours avec des boues compostées (à hauteur de 10 % v/v) afin d'augmenter la quantité de matière organique. Nos résultats ont en effet montré que les sols, surtout P et L1, présentent une faible teneur en matière organique. Il est également prévu de tester des boues non compostées associées ou non à du biochar (charbon issu de résidus agricoles transformés par pyrolyse qui permettent d'améliorer la fertilité des sols).

2) Une fois l'amendement sélectionné pour une meilleure croissance des plantules de Douglas, l'étape suivante serait de tester différents agents favorisant la solubilisation des ET dans le sol préalablement fertilisé. Il est conseillé d'utiliser des molécules biodégradables comme l'EDDS, le NTA ou les acides citrique ou gluconique plutôt que l'EDTA. En effet, l'EDTA est faiblement photodégradable et biodégradable et forme des complexes très stables avec certains ET qui sont ainsi facilement lessivables et donc susceptibles d'entraîner une extension de la pollution vers les ressources aquatiques. De plus, des études ont montré que l'EDTA a une action toxique sur certains microorganismes et certaines plantes, entraînant alors une diminution de la biomasse aérienne de ces dernières (Epstein *et al.*, 1999 ; Chen et Cutright, 2001 ; Grčman *et al.*, 2001). L'utilisation de l'acide citrique et de l'acide gluconique peut être prometteuse car ces molécules sont d'origine naturelle, non toxiques pour les plantes et facilement biodégradables dans le sol (Smolinska et Krol, 2012). Ce type d'étude nécessitera une analyse rigoureuse des lixiviats et devra veiller à déterminer le dosage d'amendements solubilisants le mieux adapté pour favoriser la phytodisponibilité des ET sans entraîner leur trop forte lixiviation. Il devra également permettre d'obtenir une phytodisponibilité du Pb « adéquate » ne risquant pas de perturber l'absorption des autres ET, ni d'entraîner d'effet toxiques pour la plante qui en absorberait en trop grande quantité.

3) Enfin, une fois les paramètres de culture établis, une étude avec des plantules de mélèze du Japon sur les 3 sols (L1, L2 et P) en présence des amendements sélectionnés (dans les points 1 et 2 précédents) pourrait également être effectuée afin de voir si cette espèce pourrait montrer des capacités de phytoextraction aussi intéressantes que celles du Douglas. Le taux de phytoextraction pouvant diminuer avec l'âge des arbres comme l'ont montré Mertens *et al.* (2006) avec du saule, un essai pilote de phytoextraction assistée avec les amendements sélectionnés précédemment pourrait être envisagé en parallèle sur les 2 sites (L et P) avec de jeunes Douglas de 2 à 3 ans (ou de mélèzes du Japon s'ils s'avèrent plus intéressants) sur un temps d'exposition de 2 à 5 ans comme préconisé pour les taillis à courte rotation (Labrecque et Teodorescu, 2003).

Ainsi, ce type de projet permettrait une reconstitution progressive des sols. Au-delà d'une approche qui vise à considérer la phytoremédiation comme un procédé de dépollution, la « simple » revégétalisation des sites s'avère tout aussi intéressante comme élément structurant de composition paysagère pour des terrains qui n'ont pas de vocation à une reconversion

immédiate et ne subissent donc pas de pression de temps pour la réhabilitation. A cet effet, le Douglas et les mélèzes ont montré des niveaux de tolérance au stress métallique prometteurs. Ces espèces, déjà bien implantées et bien acclimatées en région Limousin, constituent donc des espèces de choix pour les sols acides de la région et de régions présentant des caractéristiques climatiques et pédologiques proches.

## **Axe 2 : Réponses physiologiques des conifères aux ET du sol**

Nous avons pu observer que la réponse face à une exposition à un stress métallique différait d'un modèle végétal à l'autre de par leur différence dans leur stade de développement (plantule, arbre), les espèces, leur variabilité génétique (clones ou non) et les conditions expérimentales mises en œuvre (conditions contrôlées ou semi-contrôlées, ET différents, période d'exposition et substrats différents...).

L'étude *in vitro* sur le mélèze hybride a mis en évidence que les plantules pouvaient tolérer une concentration en Cd de 250  $\mu\text{M}$  dans le milieu pendant au moins 4 semaines. De même, qu'il s'agisse des plantules en serre exposées pendant deux mois ou des arbres exposés pendant 9 mois à 25 mg Cd.  $\text{kg}^{-1}$  Cd, ces deux modèles ont maintenu un taux de croissance proche des témoins, montrant ainsi une bonne tolérance au Cd dans de telles conditions. Les plantules de Douglas ayant poussé en serre sur des sols provenant d'anciens sites miniers (riches en As, Pb et Sb) ont également montré une bonne tolérance aux ET, surtout sur le sol L2 pour des raisons présentées précédemment (concentrations totales en ET et phytodisponibilité en Pb plus faibles, plus forte teneur en matière organique...). Pour comprendre cette tolérance aux ET, nous avons donc orienté nos recherches vers l'étude de différents processus impliqués dans la tolérance des conifères.

### **❖ Métabolisme azoté et carboné et lutte contre le stress oxydant**

Nous avons pu constater qu'en réponse au Cd et / ou à d'autres ET (As, Pb et Sb), les conifères avaient mis en place diverses stratégies de défense comme par exemple :

- une accumulation de glucides solubles dans leurs parties aériennes (probablement en partie par une hydrolyse de l'amidon). Ces solutés sont non seulement connus pour maintenir la

turgescence des cellules (Jones, 1984 ; Morgan, 1984) mais aussi pour protéger les structures membranaires (protéines, lipides) contre l'oxydation (Rudolph *et al.*, 1986 ; Crowe *et al.*, 1988 ; Hoekstra *et al.*, 2001).

- une stimulation du métabolisme azoté afin de maintenir la croissance de la plante, notamment par une élévation des teneurs en acides aminés. L'exposition au Cd des plantules en serre semble stimuler la biosynthèse des protéines cytosoliques seulement dans les aiguilles de Douglas et de mélèze du Japon, suggérant que, dans cet organe, le Cd stimulerait la production de protéines impliqués dans le phénomène de tolérance. Le Cd pouvant générer un stress oxydant, il est possible que l'activité de certaines enzymes soit stimulée comme celle des superoxyde dismutases (SOD), de la catalase (CAT), de diverses peroxydases comme l'ascorbate peroxydase (APX) ou de la glutathion peroxydase (GPX) ou encore des glutathion-S-transférases (GST). Une quantification des espèces réactives de l'oxygène et un suivi de certaines activités enzymatiques anti-oxydantes pourrait permettre d'évaluer le niveau de stress et les capacités de défense du Douglas et des mélèzes. Par ailleurs, l'accumulation de proline observée dans plusieurs de nos modèles peut être considérée comme un biomarqueur de tolérance chez les conifères étudiés. La proline semble en effet être un élément clé dans la réponse aux ET car la littérature fait mention de la diversité de ses rôles comme la contribution à l'ajustement osmotique (Yamchi *et al.*, 2005) et sa capacité à piéger des espèces réactives de l'oxygène en excès pour protéger notamment les lipides (Chinnusamy *et al.*, 2005 ; Zarei *et al.*, 2012 ; Rejeb *et al.*, 2014).

#### ❖ Réorientation de la croissance

Une autre stratégie de défense a été mise en évidence chez les plantules de mélèze d'Europe en réponse au Cd et surtout chez les plantules de Douglas ayant poussé sur les sols multi-pollués issus de La Petite Faye (sol L). Nous avons pu en effet observer une augmentation de la biomasse racinaire ainsi qu'une élongation de la racine principale. Ce phénotype s'apparente à une RMIS postulée comme étant une stratégie d'acclimatation qui consiste à augmenter (au moins temporairement) la surface racinaire dans une ou plusieurs direction(s) afin de trouver des conditions du sol plus favorables (Potters *et al.*, 2007). Ce phénotype peut être considéré comme un biomarqueur de stress (surdéveloppement anormal du système racinaire) mais aussi comme un biomarqueur de défense (capacité à rechercher de meilleures conditions).

## ❖ Adsorption des ET pour limiter leur toxicité

### • Chélation intracellulaire

Les travaux menés sur les réponses des conifères au Cd ont montré que les oligopeptides riches en thiols de type phytochélatines ou glutathion ne semblent pas être impliqués dans le piégeage de cet ET. La seule observation d'une stimulation de synthèse de ces molécules concerne les plantules de Douglas qui ont poussé sur le sol P et plus particulièrement au niveau des racines. La particularité de ce sol est sa phytodisponibilité en Pb élevée avec comme conséquence pour les plantules une forte concentration en Pb dans les racines. Il est donc possible que le Pb soit complexé à ces molécules riches en groupes thiols (surtout au niveau racinaire) mais nous avons montré que cette augmentation de synthèse s'est avérée insuffisante car les plantules présentaient une très forte réduction de biomasse par rapport aux plantules témoins. Cependant, le dosage des TNP ne permettant pas de distinguer le glutathion des phytochélatines et des précurseurs (cystéine et glutamylcystéine), il est tout à fait possible que la réponse observée soit davantage une tentative de lutte contre le stress oxydant et que l'augmentation de la teneur TNP soit plus liée à une augmentation de glutathion que de phytochélatines (Sun *et al.*, 2005 et 2007 ; Freeman *et al.*, 2004 ; Verbruggen *et al.*, 2009).

Par ailleurs, l'étude réalisée sur les plantules en serre exposée au Cd a montré que les polyamines les plus couramment présentes chez les plantes (Put, Spm et Spd) avaient tendance à diminuer en réponse au Cd dans les aiguilles et dans les racines. La teneur en Put est pourtant souvent augmentée en réponses à divers stress contrairement à la Spd et à la Spm qui restent souvent inchangées ou montrent des changements mineurs de teneur (Liu *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2013). Néanmoins, le taux de polyamines endogènes dépend non seulement de l'ET et de la dose d'exposition mais aussi de l'organe et de l'espèce végétale ainsi que du stade de développement de cette dernière (Balestrasse *et al.*, 2003 et 2005 ; Sharma et Dietz, 2006 ; Dhir *et al.*, 2012). Afin de pouvoir confirmer la tendance observée, une étude complémentaire serait utile pour voir si la diminution de ces teneurs en polyamines libres pourrait provenir d'une réduction de leur biosynthèse notamment *via* l'inhibition par le Cd de l'arginine décarboxylase ou de l'ornithine décarboxylase, des enzymes impliquées dans la production de la Put.

Nos travaux ont montré que pour différents modèles, différentes espèces de conifères et différents ET (Cd seul ou mélange d'As, Pb et Sb), la teneur en proline était souvent augmentée. La proline est le plus souvent considérée comme un osmoprotectant contre la sécheresse et la

salinité et un piègeur d'espèces réactives de l'oxygène mais elle peut aussi former des complexes avec le Cd (Farago et Mullen, 1979 ; Xu *et al.*, 2009) et peut-être avec d'autres ET en ce qui concerne l'étude sur les sols L et P riches en As, Pb et Sb. D'après nos résultats, les TNP et les polyamines ne semblent pas être à l'origine des phénomènes de chélation d'ET chez le Douglas et les mélèzes, contrairement à la proline. D'autres composés potentiellement chélateurs pourraient être étudiés, plus particulièrement certains acides organiques (citrate, malate, oxalate) présentés dans la littérature comme des molécules chélatrices d'ET et dont l'augmentation de synthèse a déjà été mise en évidence chez plusieurs espèces végétales en réponse à des ET (Bao *et al.*, 2011 ; Zacchini *et al.*, 2001).

- **Adsorption extracellulaire**

En ce qui concerne les composés impliqués dans la séquestration pariétale du Cd, nous avons pu constater que l'activité PME était stimulée au niveau racinaire chez les plantules de MJ et Douglas cultivées en serre et exposées au Cd. Les PME, en provoquant une déméthylestérisation des acides galacturoniques des pectines, facilitent la séquestration du Cd par adsorption aux fonctions acide carboxylique (Parrota *et al.*, 2015). Nos résultats ont montré que le Cd n'a pas modifié la teneur en protéines pariétales totales mais il n'est pas exclu que la synthèse de certaines protéines comme les PME ait été accrue au détriment d'autres protéines pariétales. De plus, l'activité des PME a pu être renforcée par les cations, ce qui laisse penser que les ions  $Cd^{2+}$  ont pu agir directement sur l'activité PME (Nari *et al.*, 1991). En favorisant la libération de la PME liée aux carboxylates libres des homogalacturonanes, les ions  $Cd^{2+}$  pourraient ainsi permettre à la PME d'aller agir plus rapidement sur un autre résidu d'acide galacturonique méthylestérifié (Moustacas *et al.*, 1991).

Les résultats de l'étude de l'effet du Cd sur la composition pectique des écorces et du bois néoformés des mélèzes ont montré qu'il n'y a pas eu d'effet réellement marqué du Cd sur ces composés. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les concentrations en Cd dans les organes étudiés étaient particulièrement faibles. Nos observations suggèrent la mise en place de deux processus distincts qui diffèrent selon les espèces et le compartiment étudié (bois et écorces néoformés) :

- Une stratégie de renforcement des capacités potentielles d'adsorption. Cette réponse ne va pas dans le même sens que l'augmentation de l'activité PME détectée dans les racines pour les plantules de MJ mais il est possible que les modifications

structurales mises en place au niveau pariétal dépendent de la concentration en Cd dans les organes et du stade de développement des conifères.

- Un mécanisme d'exclusion du Cd.

Bien que les pectines représentent au sein de la paroi un site de liaison majeur pour le Cd, d'autres composants de la paroi cellulaire peuvent potentiellement être impliqués. Des études récentes ont mis en évidence le fait que des modifications des hémicelluloses pourraient affecter la rétention du Cd dans la paroi cellulaire (Zhu *et al.*, 2013 ; Han *et al.*, 2014a). Ainsi, un processus concernant la synthèse et / ou la modification des composants de la paroi cellulaire permet d'envisager d'autres expériences en mettant l'accent sur la modulation de la composition d'autres composés pariétaux tels que les hémicelluloses et les lignines en réponse à l'exposition au Cd. De même, une étude d'enzymes dont les rôles sont associés à la biosynthèse des pectines comme par exemple la galacturonosyl-transférase, largement impliquée dans la biosynthèse des domaines HG des pectines s'avèrerait intéressante.

Malgré l'optimisation et la mise en œuvre de deux stratégies de dosage, nous ne sommes pas parvenus à déterminer le DME des fractions pectiques par la méthode de dosage du méthanol et par la méthode en IR. D'autres techniques sont envisageables comme par exemple la méthode de Pattathil *et al.* (2010) et Muschitz *et al.* (2015) d'immunomarquage *in vitro* utilisant des anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre des épitopes de polysaccharides pariétaux. Les anticorps dirigés contre des domaines plus ou moins méthylestérifiés des pectines les plus utilisés sont les anticorps LM19 (Plantprobes) dirigés contre les HG non-estérifiés (Verhertbruggen *et al.*, 2009), les anticorps LM20 (Plantprobes) dirigés contre les HG estérifiés (Verhertbruggen *et al.*, 2009) et les anticorps JIM7 (Plantprobes) dirigés contre les HG partiellement estérifiés (Knox *et al.*, 1990).

#### ❖ **La protéomique pour mieux cibler les réponses aux ET**

Nos résultats ont montré que de nombreuses voies métaboliques pourraient être étudiées pour mieux comprendre les mécanismes de défense des conifères et de piégeage des ET au niveau intracellulaire et pariétal. Une approche transcriptomique semble à l'heure actuelle peu judicieuse dans la mesure où le génome des mélèzes n'est pas séquencé et celui du Douglas, en voie de l'être, est d'une taille très conséquente (environ 37 Gb selon O'Brien *et al.*, 1996). Cependant, dans le cas du Douglas, des travaux actuellement en cours au laboratoire visant à



caractériser le transcriptome du bois de Douglas, amèneront des outils facilitant ce type d'études.

Concernant le Douglas, les travaux de Dziedzic et McDonald (2012 et 2015) se sont attachés à caractériser le profil protéique à différents stades de la formation du bois tandis qu'une autre étude s'est focalisée sur les réponses de plantules de Douglas *in vitro* à un champignon pathogène (*Phellinus sulphurascens*) à l'origine de perte potentielle de rendement ou de qualité du bois (Islam *et al.*, 2008). Chez le mélèze, des travaux ont été publiés pour mieux caractériser le développement d'embryons somatiques chez le mélèze hybride *L. x eurolepis* (Teyssier *et al.*, 2014) et chez *L. gmelinii* var. *principis-rupprechtii* (Zhao *et al.*, 2015) et une autre étude s'est concentrée sur le développement racinaire chez des plantules d'un mélèze hybride *L. kaempferi* x *L. olgensis* (Han *et al.*, 2014b). Par ailleurs, il serait opportun d'examiner de façon plus attentive les fractions de protéines pariétales afin de confirmer si les modifications quantitatives et/ou qualitatives des constituants pectiques pourraient s'expliquer par des variations de quantités d'enzymes participant aux modifications structurales des polysaccharides pariétaux. En parallèle à la protéomique, les études complémentaires au niveau du métabolome sont également envisageables pour aborder les réponses des conifères à l'exposition aux ET. Peu de travaux ont été réalisés à ce jour chez le Douglas et chez des mélèzes. On peut noter toutefois les travaux de Robinson *et al.* (2007) qui ont comparé le métabolome de populations de Douglas sur plusieurs sites.

Ce bilan global des travaux de Thèse met donc en avant deux perspectives possibles sur la suite de ce programme : un aspect plutôt lié à un développement appliqué sur le terrain et un aspect davantage focalisé sur les mécanismes de défense et d'accumulation d'ET. Ce deuxième aspect apportera également des informations supplémentaires pour optimiser à plus long terme les technologies de terrain visant à extraire et stocker les ET.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**



# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## -A-

- Abdullah S.N.A., Cheah S.C. et Murphy D.J.** (2002). Isolation and characterization of two divergent type 3 metallothioneins from oil palm *Elaeis guineensis*. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 255-263.
- Acheampong M.A., Pakshirajan K., Annachhatre A.P., Lens P.N.L.** (2013). Removal of Cu (II) by biosorption onto coconut shell in fixed-bed column systems. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 19 (3), 841-848.
- Achyuthan K.E., Achyuthan A.M., Adams P.D., Dirk S.M., Harper J.C., Simmons B.A. et Singh A.K.** (2010). Supramolecular Self-Assembled Chaos: Polyphenolic Lignin's Barrier to Cost-Effective Lignocellulosic Biofuels. *Molecules* 15, 8641-8688.
- Adriano D.C.** (2001). Ecological and health risks of metals. *In: Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals*. Seconde édition. Springer-Verlag, New York, pp 134-165.
- Ae N., Arihara J., Okada K., Yoshihara T. et Johansen C.** (1990). Phosphorus uptake by pigeon pea and its role in cropping systems of Indian subcontinent. *Science* 248, 477-480.
- Ahonen-Jonnarh U. et Finlay R.D.** (2001). Effects of elevated nickel and cadmium concentrations on growth and nutrient uptake of mycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings. *Plant and Soil* 236, 129-138.
- Albenne C., Canut H., Boudart G., Zhang Y., San Clemente H., Pont-Lezica R. et Jamet E.** (2009). Plant Cell Wall Proteomics: Mass Spectrometry Data, a Trove for Research on Protein Structure/Function Relationships. *Molecular Plant* 2, 977-989.
- Alcázar R., Marco F., Cuevas J.C, Patron M., Ferrando A., Carrasco P., Tiburcio A.F. et Altabella T.** (2006). Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress *Biotechnology Letters* 28, 1867-1876.
- Alén R.** (2000). Structure and chemical composition of wood. *Papermaking Science and Technology* 3, 11-57.
- Alford E.R., Pilon-Smits E.A.H. et Paschke M.W.** (2010). Metallophytes - a view from the rhizosphere. *Plant and Soil* 337, 33-50.
- Ali H., Khan E. and Sajad M.A.** (2013). Phytoremediation of heavy metals - Concepts and applications. *Chemosphere* 91, 860-881.
- Alloway B.J. et Steinnes E.** (1999). Cadmium in Soils and Plants. *In: Anthropogenic addition of cadmium to soils*. McLaughlin M.J. et Singh B.R. (Eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 97-123.
- Alomary A.A et Belhadj S.** (2007). Determination of heavy metals (Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn) by ICP-OES and their speciation in Algerian Mediterranean Sea sediments after a five-stage sequential extraction procedure. *Environmental Monitoring and Assessment* 135, 265-280.
- Amaral C.D.B., Nóbrega J.A. et Nogueira A.R.A.** (2013). Sample preparation for arsenic speciation in terrestrial plants - A review. *Talanta* 115, 291-299.
- Amaral S.S., de Carvalho Junior J.A., Martins Costa M.A., Soares Neto T.G., Dellani R. et Scavacini Leite L.H.** (2014). Comparative study for hardwood and softwood forest biomass: chemical characterization, combustion phases and gas and particulate matter emissions. *Bioresource Technology* 164, 55-63.

- Amouei A.I., Amooey A.A et Asgharzadeh F. (2013).** Cadmium Removal from Aqueous Solution by Canola Residues: Adsorption Equilibrium and Kinetics. *Iranian Journal of Chemical Engineering* 10, 39-50.
- Anastopoulos I. et Kyzas G.Z. (2014).** Agricultural peels for dye adsorption: A review of recent literature. *Journal of Molecular Liquids* 200 (B), 381-389.
- Anderson C.W.N., Brooks R.R., Chiarucci A., LaCoste C.J., Leblanc M., Robinson B.H., Simcock R. et Stewart R.B. (1999).** Phytomining for nickel, thallium and gold. *Journal of Geochemical Exploration* 67, 407-415.
- Andren A.W., Klein D.H. et Talmi Y. (1975).** Selenium in coal-fired steam plant emissions. *Environmental Science and Technology* 9 (9), 856-858.
- Andrews J., Adams S.R., Burton K.S et Evered C.E. (2002).** Subcellular localization of peroxidase in tomato fruit skin and the possible implications for the regulation of fruit growth. *Journal of Experimental Botany* 53, 2185-2191.
- Anthony G.E. et Barrett D.M. (2004).** Comparison of three colorimetric reagents in the determination of methanol with alcohol oxidase. Application to the assay of pectin methylesterase. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 52, 3749-3753.
- Anthony G.E. et Barrett D.M. (2008).** Combined enzymatic and colorimetric method for determining the uronic acid and methylester content of pectin: Application to tomato products. *Food chemistry* 110, 239-247.
- Apel K. et Hirt H. (2004).** Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55, 373-399.
- Arazi T., Sunkar R., Kaplan B. et Fromm H. (1999).** A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni<sup>2+</sup> tolerance and Pb<sup>2+</sup> hypersensitivity in transgenic plants. *The Plant Journal* 20, 171-182.
- Arduini I., Godbold D. et Onnis A. (1994).** Cadmium and copper change root growth and morphology of *Pinus pinea* and *Pinus piaster* seedlings. *Physiologia Plantarum* 92, 675-680.
- Arduini I., Masoni A., Mariotti M. et Ercoli L. (2004).** Low cadmium application increase miscanthus growth and cadmium translocation. *Environmental and Experimental Botany* 52, 89-100.
- Astier C. (2010).** Adsorption des éléments traces métalliques par les écorces forestières, un co-produit de la filière bois. Optimisation des propriétés par modifications induites par voies chimique et biologique. Thèse [74-2010] de l'Université de Limoges, Faculté des Sciences et Techniques, LCSN.
- Astier C., Chaleix C., Faugeron C., Ropartz D., Gloaguen V. et Krausz P. (2010).** Grafting of aminated oligogalacturonans onto Douglas fir barks. A new route for the enhancement of their lead (II) binding capacities. *Journal of Hazardous Materials* 182, 279-285.
- Astier C., Chaleix C., Faugeron C., Ropartz D., Krausz P. et Gloaguen V. (2012).** Biosorption of lead (II) on modified barks explained by the hard and soft acids and bases (HSAB) theory. *BioResources* 7 (1), 1100-1110.
- Astier C., Gloaguen V., Faugeron C. (2014).** Phytoremediation of Cadmium-Contaminated Soils by Young Douglas Fir Trees: Effects of Cadmium Exposure on Cell Wall Composition. *International Journal of Phytoremediation* 16, 790-803.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). (2005).** Toxicological Profiles for nickel. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp15.pdf>
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). (2007).** Toxicological profile for lead. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp13.pdf>

## -B-

- Babu B.V. et Chaurasia A.S.** (2003). Modeling, simulation and estimation of optimum parameters in pyrolysis of biomass. *Energy Conversion and Management* 44, 2135-2158.
- Babu A.G., Shea P.J. et Oh B.T.** (2014). *Trichoderma* sp. PDR1-7 promotes *Pinus sylvestris* reforestation of lead-contaminated mine tailing sites. *Science of the Total Environment* 476-477, 561-567.
- Badr N., Fawzy M. et Al-Qahtani K.M.** (2012). Phytoremediation: an economical solution to heavy-metal-polluted soil and evaluation of plant removal ability. *World Applied Sciences Journal* 16, 1292-1301.
- Bagni N. et Tassoni A.** (2001). Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* 20, 301-317.
- Baize D.** (1995). Teneurs totales en métaux lourds dans les sols français : premiers résultats du programme ASPITET. *Courrier de l'Environnement de l'INRA* 22, 37-46.
- Baize D.** (1997). Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). Références et stratégies d'interprétation. Programme ASPITET. INRA (Ed), Paris, 410 p.
- Baize D.** (2006). Cours sur les éléments traces dans les sols - Université de Poitiers - Les Éléments Traces Métalliques (ETM) dans les sols. Tout ce qu'il faut savoir ! Site de Baize Denis, pédologue, [http://www.denis-baize.fr/index.php?option=com\\_content&task=view&id=5&Itemid=9](http://www.denis-baize.fr/index.php?option=com_content&task=view&id=5&Itemid=9)
- Baize D.** (2009). Éléments traces dans les sols. Fonds géochimiques, fonds pédogéochimiques naturels et teneurs agricoles habituelles : définitions et utilités. *Courrier de l'Environnement de l'INRA* 57, 63-72.
- Baker A.J.M.** (1981). Accumulators and excluders - Strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition* 3 (1-4), 643-654.
- Baker A.J.M. et Brooks R.R.** (1989). Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements: A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1, 81-126.
- Baker A.J.M. et Walker P.L.** (1989). Physiological responses of plants to heavy metals and the quantification of tolerance and toxicity. *Chemical Speciation and Bioavailability* 1, 7-17.
- Baker A.J.M., McGrath S.P, Reeves R.D. et Smith J.A.C.** (2000) Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biochemical resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Phytoremediation of contaminated soil and water. Terry N., Bañuelos G. et Vangronsveld J. (Eds), Lewis, Boca Raton, USA, pp 85-107.
- Bakircioglu D., Bakircioglu Kurtulus Y. et Ibar H.** (2011). Comparison of extraction procedures for assessing soil metal bioavailability of to wheat grains. *Clean Soil Air Water* 39 (8), 728-734.
- Balandin T. et Castresana C.** (2002). AtCOX17, an *Arabidopsis* homolog of the yeast copper chaperone COX17. *Plant Physiology* 129, 1852-1857.
- Balestrasse K.B., Benavides M.P., Gallego S.M. et Tomaro M.L.** (2003). Effect of cadmium stress on nitrogen metabolism in nodules and roots of soybean plants. *Functional Plant Biology* 30, 57-64.
- Balestrasse K.B., Gallego S.M., Benavides M.P. et Tomaro M.L.** (2005). Polyamines and proline are affected by cadmium stress in nodules and roots of soybean plants. *Plant and Soil* 270, 343-353.
- Balsberg Pålsson A.M.** (1989). Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. *Water Air and Soil Pollution* 47, 287-319
- Bani A., Echevarria G., Sulce S., Morel J.L. et Mullai A.** (2007). *In-situ* phytoextraction of Ni by a native population of *Alyssum murale* on an ultramafic site (Albania). *Plant and Soil*, 293, 79-89.
- Bao W., O'Malley D.M. et Sederof R.R.** (1992). Wood contains a cell-wall structural protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 6604-6608.

- Bao T., Sun T. et Sun L.** (2011). Low molecular weight organic acids in root exudates and cadmium accumulation in cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and non-hyperaccumulator *Solanum lycopersicum* L. *African Journal of Biotechnology* 10, 17180-17185.
- Bar-Peled M., Urbanowicz B.R. et O'Neill M.A.** (2012). The synthesis and origin of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II - insights from nucleotide sugar formation and diversity. *Frontiers in Plant Science* 3 (92), 1-12.
- Barbaroux R., Plasari E., Mercier G., Simonnot M.O., Morel J.L. et Blais J.F.** (2012). A new process for nickel ammonium disulfate production from ash of the hyperaccumulating plant *Alyssum murale*. *Science of the Total Environment* 423, 111-119.
- Barceló J., Vazquez M.D. et Poschenrieder C.H.** (1988). Cd induced structural and ultrastructural changes in the vascular system of bush bean stems. *Botanica Acta* 101, 254-261.
- Barceló J. et Poschenrieder C.** (1990). Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *Journal of Plant Nutrition* 13, 1-37.
- Barta K., Matson T.D., Fettig M.L., Scott S.L., Iretskii A.V. et Ford P.C.** (2010). Catalytic disassembly of an organosolv lignin via hydrogen transfer from supercritical methanol. *Green Chemistry* 12, 1640-1647.
- Baryla A., Carrier P., Franck F., Coulomb C., Sahut C. et Havaux M.** (2001). Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth. *Planta* 212, 696-709.
- Bastien J.C et Keller R.** (1980). Intérêts comparés du mélèze hybride (*Larix x eurolepis* Henry) avec les deux espèces parentes. *Revue Forestière Française* 6, 521-530.
- Bastien J.C., Roman-Amat B. et Michaud D.** (1986). Les programmes d'amélioration, résultats actuels et escomptés : Douglas. *Revue Forestière Française* 38, 113-120.
- Battaglia M., Solorzano R.M., Hernandez M., Cuellar-Ortiz S., Garcia-Gomez B., Marquez J. et Covarrubias A.A.** (2007). Proline-rich cell wall proteins accumulate in growing regions and phloem tissue in response to water deficit in common bean seedlings. *Planta* 225, 1121-1133.
- Baum C., Hryniewicz K., Peter Leinweber P. et Meißner 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.
- Bayçu G.** (2002). Phytochelatin biosynthesis and cadmium detoxification. *Journal of Cell and Molecular Biology* 1, 45-55.
- Becwar M.R., Nagmani R. et Wann S.R.** (1990). Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Canadian Journal of Forest Research* 20, 810-817.
- Benavides M.P., Gallego S.M et Tomaro M.L.** (2005). Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 22-34.
- Bennet R.J., Breen C.M. et Bandu V.** (1985). Aluminium toxicity and regeneration of the root cap: preliminary evidence for a Golgi apparatus derived morphogen in the primary root of *Zea mays*. *South African Journal of Botany* 51, 363-370.
- Bergqvist C. et Greger M.** (2012). Arsenic accumulation and speciation in plants from different habitats. *Applied Geochemistry* 27, 615-622.
- Bergstrom J.G.T.** (1986). Mercury behavior in flue gases. *Waste Management and Research* 4, 57-64.
- Bernard C, Roosens N, Czernic P, Lebrun M, Verbruggen N.** (2004). A novel CPx-ATPase from the cadmium hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *FEBS Letters* 569, 140- 148.

- Bert V., Macnair M.R., De Laguerie P., Saumitou-Laprade P. et Petit D.** (2000). Zinc tolerance and accumulation in metallicolous and nonmetallicolous populations of *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *New Phytologist* 146, 225-233.
- Bert V., Hadj-Saharaoui A., Leyval C., Fontaine J. et Ouvrard S.** (2012). Les phytotechnologies appliquées aux sites et sols pollués - État de l'art et guide de mise en œuvre. ADEME (Ed), EDP Sciences, 72 p.
- Berta G., Altamura M., Fusconi A., Cerruti F., Capitani F. et Bagni N.** (1997). The plant cell wall is altered by inhibition of polyamine biosynthesis. *New Phytologist* 137, 569-577.
- Bertsch C.R., Fernelius W.C. et Block B.P.** (1958). A thermodynamic study of some complexes of metal ions with polyamines. *The Journal of Physical Chemistry* 62, 444-450.
- Bidlack J., Malone M. et Benson R.** (1992). Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science* 72, 51-56.
- Bienert G.P., Schjoerring J.K et Jahn T.P.** (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta- Biomembrane* 1758, 994-1003.
- Bienert G.P., Møller A.L.B., Kristiansen K.A., Schulz A., Møller I.M., Schjoerring J.K et Jahn T.P.** (2007). Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 1183-1192.
- Bienert G.P., Thorsen M., Schüssler M.D., Nilsson H.R., Wagner A., Tamás M.J. et Jahn T.P.** (2008). A subgroup of plant aquaporins facilitate the bi-directional diffusion of As(OH)<sub>3</sub> and Sb(OH)<sub>3</sub> across membranes. *BMC Biology* 6, 26.
- Bindler R., Brannvall M.L. and Renberg I.** (1999). Natural lead concentrations in Pristine boreal forest soils and past pollution trends: a reference for critical load models. *Environmental Science and Technology* 33, 362-3367.
- Bisson M., Vivier S., La Rocca B. et Gourland C.** (2009). Point sur les Valeurs Toxicologiques de Référence (VTR). Rapport d'étude INERIS N° DRC-08-94380-11776C.
- Blaylock M. J. and Huang J. W.** (2000). Phytoextraction of metals. *In: Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean-up the environment.* Raskin I. et Ensley B.D. (Eds), Wiley, New York, pp 53-70.
- Blee K.A., Jupe S.C., Richard G., Zimmerlin A., Davies D.R. et Bolwell G.P.** (2001). Molecular identification and expression of the peroxidase responsible for the oxidative burst in French bean (*Phaseolus vulgaris L.*) and related members of the gene family. *Plant Molecular Biology* 47, 607-620.
- Bliefert C. et Perraud R.** (2001). Chimie de l'environnement. Air, eau, sols, déchets. Première édition, De Boeck (Ed), Paris, Bruxelles, 478 p.
- Blumenkrantz N. et Asboe-Hansen G.** (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* 54, 484-489.
- Boerjan W., Ralph J. et Baucher M.** (2003). Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 54, 519-546
- Bolwell G.P. et Woftastek P.** (1997). Mechanism for the generation of reactive oxygen species in plant defense-broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51, 347-349.
- Bonet A., Saladin G., Gloaguen V. et Faugeron C.** (2014). Efficiency of Cadmium accumulation in European and hybrid larch for use in phytoremediation. 11<sup>th</sup> International Phytotechnologies Conference. Kalogerakis N. et Manios T. (Eds), Grafima Publ., Thessaloniki, Grèce, p. 162.
- Bonet A., Pascaud G., Faugeron C., Soubrand M., Joussein E., Gloaguen V. et Saladin G.** (2016). Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) plantlets responses to As, Pb, and Sb- contaminated soils from former mines. *International Journal of phytoremediation* doi: 10.1080/15226514.2015.1086297



- Bordenave M. et Goldberg R.** (1994). Purification and characterization of pectinmethylesterases from mung bean hypocotyl cell walls. *Phytochemistry* 33, 999-1003.
- Bordenave M.** (1996). Analysis of pectin methylesterases. *In: Modern methods of plant analysis, volume 17, Plant Cell Wall Analysis.* Linskens H.F. et Jackson J.F. (Eds), Springer-Verlag, New York, Berlin, pp 165-170.
- Borrell A., Culianez-Macia F.A., Altabella T., Besford R.T., Flores D. et Tiburcio A.F.** (1995). Arginine decarboxylase is localized in chloroplast. *Plant Physiology* 109(3), 771-776.
- Bors W., Langebartels C., Michel C. et SandermannH.** (1989). Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone damage. *Phytochemistry* 28, 1589-1595.
- Bortolotti C., Cordeiro A., Alcázar R., Borrell A., Culiañez-Macià F.A., Tiburcio A. F. et Altabella T.** (2004). Localization of arginine decarboxylase in tobacco plants. *Physiologia Plantarum* 120, 84-92.
- Bothe H.** (2011). Plants in heavy metal soils. *In: Detoxification of Heavy Metals, Soil Biology, volume 30.* Sherameti I. et Varma A. (Eds), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 35-57.
- Bouchereau A., Aziz A., Larher F. et Martin-Tanguy J.** (1999). Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science* 140, 103-125.
- Boudet A.M.** (2000). Lignins and lignification: Selected issues. *Plant Physiology and Biochemistry* 38, 81-96
- Boyd R.S et Martens S.N.** (1992). The raison d'être for metal hyperaccumulation by plants. *In: The Vegetation of ultramafic (serpentine) soils. Proceedings of the First International Conference on Serpentine Ecology.* Baker A.J.M., Proctor J. et Reeves R.D. (Eds), Andover: Intercept, pp 279-289.
- Boyd R.S et Martens S.N.** (1998). The significance of metal hyperaccumulation for biotic interactions. *Chemoecology* 8, 1-7.
- Bradley D.J., Kjellbom P. et Lamb C.J.** (1992.) Elicitor- and wound- induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel rapid defence response. *Cell* 70, 21-30.
- Breckle S.W et Kahle H.** (1992). Effect of toxic heavy metals (Cd, Pb) on growth and mineral nutrition of beech (*Fagus sylvatica* L.). *Vegetatio* 101, 43-53.
- Brevet :** Production d'un sel cristallisé de nickel à partir de plantes hyperaccumulatrices, Canada n°2.731.457 le 4 Février 2011 – N/Réf : 00 5199-0025. Inventeurs: Mercier G., Barbaroux R., Plasari E., Blais J.F., Simonnot M.O., Morel J.L. Demande internationale déposée le 6/2/2012, PCT/CA2012/050059, INRS-ETE, Université de Lorraine, INRA, CNRS).
- Briat J.F. et Lebrun M.** (1999). Plant responses to metal toxicity. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie, Plant Biology and Pathology* 322 (1), 43-54.
- Brignon J.M. et Malherbe L.** (2005). Cadmium et ses dérivés. Rapport INERIS-DRC-MECO.
- Broadhurst C.L., Chaney R.L., Angle J.S., Erbe E.F. et Maugel T.K.** (2004). Nickel localization and response to increasing ni soil levels in leaves of the Ni hyperaccumulator *Alyssum murale* "kotodesh". *Plant and Soil Journal* 265, 225-242.
- Brooks R.R., Chambers M.F., Nicks L.J. et Robinson B.H.** (1998). Phytomining. *Trends in Plant Science* 1, 359-362.
- Buchanan B.B., Gruissen W. et Jones R.L.** (2000). Biochemistry and molecular biology of plants, première édition. American Society of Plant Physiologists, USA, 1408 p.
- Buendía-González L., Orozco-Villafuerte J., Cruz-Sosa F., Barrera-Díaz C.E. et Vernon-Carter E.J.** (2010) *Prosopis laevigata* a potential chromium (VI) and cadmium (II) hyperaccumulator desert plant. *Bioresource Technology* 101 (15), 5862-5867.

**Bural G.I., Dixon D.G. et Glick B.R.** (2000). Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Canadian Journal of Microbiology* 46, 237-245.

**-C-**

**Cadet J., Delatour T., Douki T., Gasparutto D., Pouget J.P., Ravanat J.L. et Sauvaigo S.** (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation Research* 424, 9-21.

**Callahan D.L., Baker A.J.M., Kolev S.D. et Wedd A.G.** (2006). Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 11, 2-12.

**Callahan D.L., Kolev S.D., O'Hair R.A.J., Salt D.E. et Baker A.J.M.** (2007). Relationships of nicotianamine and other amino acids with nickel, zinc and iron in *Thlaspi* hyperaccumulators. *New Phytologist* 176, 836-848.

**Callahan D.L., Roessner U., Dumontet V., Perrier V., Wedd A.G., O'Hair R.A.J., Baker A.J.M. et Kolev S.D.** (2008). LC-MS and GC-MS metabolite profiling of nickel (II) complexes in the latex of the nickel-hyperaccumulating tree *Sebertia acuminata* and identification of methylated aldaric acid as a new nickel(II) ligand. *Phytochemistry* 69, 240-251.

**Cameron R.G., Baker R.A. et Grohmann K.** (1998). Multiple Forms of Pectinmethylesterase from Citrus Peel and Their Effects on Juice Cloud Stability. *Journal of Food Science* 63 (2), 253-256.

**Carbonell J. et Blázquez M.A.** (2009). Regulatory mechanisms of polyamine biosynthesis in plants. *Genes Genomics* 31, 107-118.

**Carnicer J., Barbeta A., Sperlich D., Coll M. et Penuelas J.** (2013). Contrasting trait syndromes in angiosperms and conifers are associated with different responses of tree growth to temperature on a large scale. *Frontiers in Plant Science* 4 (409), 1-19.

**Carpin S., Crevecoeur M., de Meyer M., Simon P., Greppin H. et Penel C.** (2001). Identification of a Ca<sup>2+</sup> pectate binding site on an apoplastic peroxidase. *Plant Cell* 13, 511-520.

**Carpita N.C. et Gibeaut D.M.** (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal* 3, 1-30.

**Carpita N.C.** (2011). Update on Mechanisms of Plant Cell Wall Biosynthesis: How Plants Make Cellulose and Other (1 → 4)-beta-D-Glycans. *Plant Physiology* 155, 171-184

**Caslin B., Finnan J. et McCracken A.** (2010). Short rotation coppice willow best practice guidelines, Department of Agriculture Fisheries and Food, Irlande, 66 p.

**Cassab G.I.** (1998). Plant cell wall proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, 281-309.

**Catoire L., Pierron M., Morvan C., Hervé du Penhoat C. et Goldberg R.** (1998). Investigation of the action patterns of pectin methylesterase isoforms through kinetic analyses and NMR spectroscopy. Implications in cell wall expansion. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 33150-33156.

**Cervantes C., Campos-Garcia J., Devars S., Gutierrez-Corona F., Loza-Tavera H., Torres-Guzman J.C. et Moreno-Sanchez R.** (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Review* 25, 335-347.

**Chaney R.L.** (1983). Plant uptake of inorganic waste constituents. *In: Land Treatment of Hazardous Wastes.* Parr J.F., Marsh P.B. et Kla J.M. (Eds), Noyes Data Corp, Park Ridge, NJ, pp 50-76.

**Chaney R.L., Malik M., Li Y.M., Brown S.L., Brewer E.P., Angle J.S. et Baker A.J.M.** (1997). Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology* 8 (3), 278-284.

- Chaney R.L., Angle, McIntosh M.S., Reeves R.D., Li Y.M., Brewer E.P., Chen K.Y., Roseberg R.J., Perner H., Synkowski E.C., Broadhurst C.L., Wang S. et Baker A.J.M.** (2005). Using hyperaccumulator plants to phytoextract soil Ni and Cd. *Zeitschrift fur Naturforschung C Journal* 60, 190-198.
- Chaney R.L., Angle J.S., Broadhurst C.L., Peters C.A., Tappero R.V. et Sparks D.L.** (2007). Improved understanding of hyperaccumulation yields commercial phytoextraction and phytomining technologies. *Journal of Environmental Quality* 36, 1429-1443.
- Charnay D., Nari J. et Noat G.** (1992). Regulation of plant cell-wall pectin methyl esterase by polyamines-Interactions with the effects of metal ions. *European Journal of Biochemistry* 205, 711-714.
- Chassin P., Baize D., Cambier Ph. et Sterckrman T.** (1996). Les éléments traces métalliques et la qualité des sols. *Étude et gestion des sols* 3 - 4, 297-306.
- Chatjigakis A.K., Pappas C., Proxenia N., Kalantzi O., Rodis P. et Polissiou M.** (1998). FT-IR spectroscopic determination of the degree of esterification of cell wall pectins from stored peaches and correlation to textural changes. *Carbohydrate Polymers* 37, 395-408.
- Chaudhry T.M., Hayes W.J., Khan A.G. et Khoo C.S.** (1998). Phytoremediation focusing on accumulator plants that remediate metal contaminated soils. *Australian Journal of Ecotoxicology* 4, 37-51.
- Chen H.T. et Cutright T.** (2001). EDTA and HEDTA effects on Cd, Cr, and Ni uptake by *Helianthus annuus*. *Chemosphere* 45, 21-28.
- Cheng S.** (2003). Effects of Heavy Metals on Plants and Resistance Mechanisms. *Environmental Science and Pollution Research* 10, 256-264.
- Chinnusamy V., Jagendorf A. et Zhu J.K.** (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science* 45, 437-448.
- Chmielowska-Bąk J., Izbiańska K. et Deckert J.** (2013). The toxic Doppelgänger: on the ionic and molecular mimicry of cadmium. *Acta Biochimica Polonica* 60, 369- 374.
- Cho U.H. et Seo N.H.** (2005). Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science* 168, 113-120.
- Choudhary S.P., Bhardwaj R., Gupta B.D., Dutt P., Gupta R.K., Kanwar M. et Dutt P.** (2010). Changes induced by Cu<sup>2+</sup> and Cr<sup>6+</sup> metal stress in polyamines, auxins, abscisic acid titers and antioxidative enzymes activities of radish seedlings. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 22 (4), 263-270.
- Choudhury S., Panda P., Sahoo L. et Kumar Panda S.** (2013). Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling and Behavior* 8, 1-6.
- Christensen T.M.I.E., Nielsen J.E., Kreiberg J.D., Rasmussen P. et Mikkelsen J.D.** (1998). Pectin methyl esterase from orange fruit: characterization and localization by in- situ hybridization and immunohistochemistry. *Planta* 206, 493-503.
- Claus H.** (2004). Laccases: Structure, reaction, distribution. *Micron* 35, 93-96.
- Clemens S., Kim E.J., Neumann D. et Schroeder J.I.** (1999). Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO Journal* 18, 3325-3333.
- Clemens S.** (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88, 1707-1719.
- Cluis C.** (2004). Junk-greedy greens: phytoremediation as a new option for soil decontamination. *BioTeach Journal* 2, 61-67.
- Cobbet C. et Goldsbrough P.** (2002). Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 53, 159-82.

- Cohen S.S.** (1998). A Guide to the Polyamines. Oxford University Press, New York, 624 p.
- Colombano S., Saada A., Guerin V., Bataillard P., Bellenfant G., Beranger S., Hube D., Blanc C., Zornig C. et Girardeau I.** (2010). Quelles techniques pour quels traitements - Analyse coûts-bénéfices. Rapport Final BRGM/RP - 58609 – FR. Étude réalisée dans le cadre des projets de Service public du BRGM 08POLA06 correspondant à la convention BRGM-MEEDDAT 2008 n°0001386.
- Colzi I., Arnetolia M., Gallo A., Doumett S., Del Bubba M., Pignattelli S., Gabbrielli R. et Gonnelli C.** (2012). Copper tolerance strategies involving the root cell wall pectins in *Silene paradoxa* L. *Environmental and Experimental Botany* 78, 91-98.
- COM.** (2006). 231 final. Communication from the Commission of the Council, the European Parliament, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions. Thematic strategy for soil protection. 22 September 2006. Bruxelles.
- Commissariat général au développement durable.** (2013). Basol : un panorama des sites et sols pollués, ou potentiellement pollués, nécessitant une action des pouvoirs publics. *Études et documents* 97, 1-40.
- Cooper E.M., Sims J.T., Cunningham S.D., Huang J.W. et Berti W.R.** (1999). Chelate- assisted phytoextraction of lead from contaminated soil. *Journal of Environmental Quality* 28, 1709-1719.
- Cosgrove D.J.** (1997). Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annual Review of Cell Developmental Biology* 13, 171-201.
- Cosgrove D.J.** (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 850-861.
- 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.
- Costa G. et Morel J.L.** (1994). Water relation, gas exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce. *Plant Physiology Biochemistry* 32, 561-570.
- Costa G., Michaut J. et Morel J.** (1994). Influence of cadmium on water relations and gas exchanges in phosphorus deficient *Lupinus albus*. *Plant Physiology and Biochemistry* 32, 105-114.
- Coste B. et Itard Y.** (2006). Pollution des sols en contexte minier : démarche et choix des techniques d'évaluation du risque. Rapport final BRGM/RP-54713-FR. Étude réalisée dans le cadre du projet de Recherche du BRGM APMR01.
- Cotton F.A et Wilkinson G.** (1972). Zinc, cadmium and mercury. *In: Advanced inorganic chemistry*. Troisième édition. Interscience Publishers, p. 503.
- Courtin-Nomade A., Neel C., Brill H. et Davranche M.** (2002). Trapping and mobilisation of arsenic and lead in former mine tailings – Environmental conditions effects. *Bulletin de la société géologique de France* 173 (5), 479-485.
- Criquet S., Joner E.J., Leglize P. et Leyval C.** (2000). Anthracene and mycorrhiza affect the activity of oxidoreductases in the roots and the rhizosphere of lucerne (*Medicago sativa* L.). *Biotechnology Letters* 22, 1733-1737.
- Crowe J.H., Crowe L., Carpenter J.F., Rudolph A.S., Wistrom C.A., Spargo B. et Anchordoguy T.J.** (1988). Interactions of sugars with membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes* 947(2), 367-384.
- Cumming J.R. et Taylor G.J.** (1991). Mechanism of metal tolerance in plants: physiological adaptations for exclusion of metal ions from the cytoplasm. *In: Stress responses in plants, adaptation and acclimation mechanisms*. Alscher R.G. et Cummings J.R. (Eds), Wiley Liss, New York, pp 329-356.

**Curguz V.G., Raicevic V., Veselinovic M., Tabakovic-Tosic M. et Vilotic D.** (2012). Influence of heavy metals on seed germination and growth of *Picea abies* L. *Karst Polish Journal of Environmental Studies* 21 (2), 355-361.

**Curie C., Panaviene Z., Loulergue C., Dellaporta S.L., Briat J.F. et Walker E.L.** (2001). Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* 409, 346-349.

**Curie C., Cassin G., Couch D., Divol F., Higuchi K., Le Jean M., Misson J., Schikora A., Czernic P. et Mari S.** (2009). Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of Botany* 103, 1-11.

## -D-

**D'Agostino L., Di Pietro M. et Di Luccia A.** (2005). Nuclear aggregates of polyamines are supramolecular structures that play a crucial role in genomic DNA protection and conformation. *FEBS Journal* 272, 3777-3787.

**D'Orazi D. et Bagni N.** (1987). *In vitro* interactions between polyamines and pectic substances. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 148, 1259-1263.

**Dahmani-Muller H., Van Oort F., Gélie, 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.

**Dai H.P., Wei Y., Zhang Y.Z., Wei A.Z. et Yang T.X.** (2012). Subcellular localization of cadmium in hyperaccumulator *Populus × canescens*. *African Journal of Biotechnology* 11 (16), 3779-3787.

**Dakora F.D. et Phillips D.A.** (2002). Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil* 245, 35-47.

**DalCorso G., Farinati S., Maistri S. et Furini A.** (2008). How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression. *Journal of Integrative Plant Biology* 50 (10), 1268-1280.

**Darvill A.G., Mc Neil M., Albersheim P. et Delmer D.P.** (1980). The primary cell walls of flowering plants. *In: The Biochemistry of plants, volume 1.* Tolbert N.E. (Ed), Academic Press, New York, pp 91-162.

**Das P., Samantaray S. et Rout G. R.** (1997). Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental Pollution* 98, 29-36.

**Daud M.K., Yuquiang S., Dawood M., Hayat Y., Variath M.T., Wy Y.X., Raziuddin., Mishkat U., Salahuddin., Najeeb U et Shuijin Z.** (2008). Cadmium-induced functional and ultrastructural alterations in roots of two transgenic cotton cultivars. *Journal of Hazardous Materials* 161 (1), 463-473.

**De Agazio M., Rea E., Fruggiero A. et Zacchini M.** (2000). Spermine treatment improves lead accumulation and translocation in maize. 12th FESPP Congress on Plant Physiology and Biochemistry 38, 188.

**De Andrade L.R.M., Barros L.M.G., Echevarria G.F., Velho do Amaral L.I., Cotta M.G., Rossatto D.R., Haridasan M. et Franco A.C.** (2011). Al-hyperaccumulator Vochysiaceae from the Brazilian Cerrado store aluminum in their chloroplasts without apparent damage. *Environmental and Experimental Botany* 70, 37-42.

**De Assis S.A., Martins A.B.G., Guaglianoni D.G. et de Faria Oliveira O.M.M.** (2002). Partial Purification and Characterization of Pectin Methyltransferase from Acerola (*Malpighia glabra* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (14), 4103-4107.

**De Burbure C., Buchet J.P., Leroyer A., Nisse C., Haguenoer J.M., Mutti A., Smerhovsky Z., Cikrt M., Trzcinka-Ochocka M., Razniewska G., Jakubowski M. et Bernard A.** (2006). Renal and neurologic effects of cadmium, lead, mercury, and arsenic in children: evidence of early effects and multiple interactions at environmental exposure levels. *Environmental Health Perspectives* 114, 84-90.

- De Maria S. et Rivelli A.R.** (2013). Trace element accumulation and distribution in sunflower plants at the stages of flower bud and maturity. *Italian Journal of Agronomy* 8:e9, 65-72.
- De Silva N.D.J, Cholewa E. et Ryser P.** (2012). Effects of combined drought and heavy metal stresses on xylem structure and hydraulic conductivity in Red Maple (*Acer rubrum* L.). *Journal of Experimental Botany* 63, 5957-5966.
- De Souza M.P., Pilon-Smits E.A.H., Lytle M., Hwang S., Tai J., Honma T.S.U, Yeh L. et Terry N.** (1998). Rate-limiting steps in Selenium assimilation and volatilization by Indian Mustard. *Plant Physiology* 117, 1487-1494.
- De Souza, M.P., Chu D., Zhao M., Zayed A.M., Ruzin S.E., Schichnes D. et Terry N.** (1999). Rhizosphere bacteria enhance Selenium accumulation and volatilization by Indian Mustard. *Plant Physiology* 119, 565-574.
- Delannoy E., Marmey P., Penel C. et Nicole M.** (2004). Les peroxydases végétales de classe III. *Acta Botanica Gallica* 151 (4), 353-380.
- Delhaize E., Ryan P.R. et Randall P.J.** (1993). Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiology* 103, 695-702.
- Demidchik V.** (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany* 109, 212-228.
- Denès J.M., Baron A., Renard C.M., Péan C. et Drilleau J.F.** (2000). Different action pattern for apple pectin methylesterase at pH 7.0 and 4.5. *Carbohydrate Research* 327, 385-393.
- Dermont G., Bergeron M., Mercier G. et Richer-Lafèche M.** (2008). Soil washing for metal removal: A review of physical / chemical technologies and field applications. *Journal of Hazardous Materials* 152, 1-31.
- Deschamps T., Benzaazoua M., Bussière B., Belem T. et Mbonimpa M.** (2006). Mécanismes de rétention des métaux lourds en phase solide : cas de la stabilisation des sols contaminés et des déchets industriels. *Vertigo* 7 (2), Septembre 2006.
- Dhillion S.S.** (1992). Evidence for host-mycorrhizal preference in native grassland species. *Mycological Research* 96, 359-362.
- Dhir B., Nasim S.A., Samantary S. et Srivastava S.** (2012). Assessment of osmolyte accumulation in heavy metal exposed *Salvinia natans*. *International Journal of Botany* 8, 153-158.
- Di Lonardo S., Capuana M., Arnetoli M., Gabbrielli R. et Gonnelli C.** (2011). Exploring the metal phytoremediation potential of three *Populus alba* L. clones using an *in vitro* screening. *Environmental Science and Pollution Research* 18, 82-90.
- Dickinson N.M., Turner A.P., Watmough S.A. et Lepp N.W.** (1992). Acclimation of trees to pollution stress: cellular metal tolerance traits. *Annals of Botany* 70, 569-572.
- Dietz K.J, Krämer U. et Baier M.** (1999). Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: Heavy metal stress in plants: Molecules to ecosystem. Prasad M.N.V. (Ed), Hagemeyer J. Springer, pp 73-97.
- Dietz K.J., Tavakoli N., Kluge C., Mimura T., Sharma S.S., Harris G.C., Chardonens A.N. et Gollack D.** (2001). Significance of the V- type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *Journal of Experimental Botany* 52, 1969-1980.
- Dinelli E. et Lombini A.** (1996). Metal distributions in plants growing on copper mine spoils in Northern Apennines, Italy: the evaluation of seasonal variations. *Applied Geochemistry* 11, 375-385.
- Do Nascimento C.W.A., Amarasiriwardena D. et Xing B.** (2006). Comparison of natural organic acids and synthetic chelates at enhancing phytoextraction of metals from a multi-metal contaminated soil. *Environmental Pollution* 140, 14-123.

- Domènech J., Mir G., Huguet G., Capdevila M., Molinas M. et Atrian S.** (2006). Plant metallothionein domains: functional insight into physiological metal binding and protein folding. *Biochimie* 88, 583- 593.
- Donaldson L.A.** (2001). Lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view. *Phytochemistry* 57, 859-873
- Dong J., Mao W.H., Zhang G.P., Wu F.B. et Cai Y.** (2007). Root excretion and plant tolerance to cadmium toxicity - a review. *Plant Soil and Environment* 53 (5), 193-200.
- Dong J., Wu F. et Zhang G.** (2005). Effect of cadmium on growth and photosynthesis of tomato seedlings. *Journal of Zhejiang University SCIENCE* 6B (10), 974-980.
- Douay F.** (2014). Phytener : Une expérience en phytomanagement sur le site atelier « Metaleurop ». 25 et 26 Septembre 2014, Cité scientifique - Villeneuve d'Ascq.
- Douay F. et Bidar G.** (2015). Synthèse du projet PHYTENER - Rapport final. ADEME. 33.
- Douchiche O., Rihouey C., Schaumann A., Driouich A. et Morvan C.** (2007). Cadmium-induced alterations of the structural features of pectins in flax hypocotyls. *Planta* 225, 1301-1312.
- Droux M.** (2004). Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey. *Photosynthesis Research* 79, 331-348.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. et Smith F.** (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356.
- Durand T.** (2009). Approche protéomique des stress abiotiques chez *Populus tremula x P. alba*. Life Sciences [q-bio]. Université d'Orléans, 2009. French. <NNT : 2009ORLE2073>. <tel-00520792>
- Dziedzic J.A. et McDonald A.G.** (2012). A comparative survey of proteins from recalcitrant tissues of a non-model gymnosperm, Douglas-fir. *Electrophoresis* 33 (37), 1102-1112.
- Dziedzic J.A. et McDonald A.G.** (2015). *In vitro* protein profiles in the early and late stages of Douglas-fir xylogenesis. *Electrophoresis* 36 (17), 2035-2045.

## -E-

- Ebringerova A. et Heinze T.** (2000). Xylan and xylan derivatives - biopolymers with valuable properties, 1 - Naturally occurring xylans structures, procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications* 21, 542-556.
- Edwards R., Dixon D.P. et Walbot V.** (2005). Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science* 5 (5), 193-198.
- El-Moneim D.A., Contreras R., Silva-Navas J., Gallego F.J., Figueiras A.M. et Benito C.** (2014). Pectin methylesterase gene and aluminum tolerance in *Secale cereale*. *Environmental and Experimental Botany* 107, 125-133.
- Epstein A.L., Gussman C.D., Blaylock M.J., Yermiyahu U., Huang J.W., Kapulnik Y. et Orser C.S.** (1999). EDTA and Pb-EDTA accumulation in *Brassica juncea* grown in Pb-amended soil. *Plant and Soil* 208, 87-94.
- Ernst W.H.O., Verkleij J.A.C. et Schat H.** (1992). Metal tolerance in plants. *Acta Botanica Neerlandica* 41, 229-248.
- Ernst et Young.** (2012). Taux d'utilisation et coûts des différentes techniques et filières de traitement des sols et des eaux souterraines pollués en France. Synthèse des données 2010 pour l'ADEME, 114 p.
- Ernst et Young.** (2014). Taux d'utilisation et coûts des différentes techniques et filières de traitement des sols et des eaux souterraines pollués en France. Synthèse des données 2012 pour l'ADEME, 148 p.

- Escande V., Garoux L., Grison C., Thillier Y., Debart F., Vasseur J.J, Boulanger C. et Grison C.** (2014). Ecological catalysis and phytoextraction: symbiosis for future. *Applied Catalysis B* 146, 279-288.
- Evangelou M.W.H., Ebel M. et Schaeffer A.** (2007). Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. *Chemosphere* 68, 989-1003.
- Evangelou M.W.H., Deram A., Gogos A., Studer B. et Schulin R.** (2012). Assessment of suitability of tree species for the production of biomass on trace element contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials* 209-210, 233-239.
- Ewers U.** (1991). Standards, guidelines and legislative regulations concerning metals and their compounds. In: Metals and their compounds in the environment: occurrence, analysis and biological relevance. Merian E. (Ed), VCH, Weinheim, pp 458-468.

## -F-

- Fahr M., Laplaze L., Bendaou N., Hocher V., El Mzibri M., Bogusz D. et Abdelaziz Smouni A.** (2013). Effect of lead on root growth. *Frontiers in Plant Science* 4 (175), 1-7.
- FAO/OMS.** (2001). Food additives and contaminants. Codex Alimentarius Commission. Joint FAO/WHO Food Standards Program, ALI-NORM 01/12A, 289 p.
- Farago M.E. et Mullen W.A.** (1979). Plants which accumulate metals. IV. A possible copper-proline complex from the roots of *Armeria maritima*. *Inorganica Chimica Acta* 32, 93-94.
- Farid M., Shakoor M.B., Ehsan S., Ali S., Zubair M. et Hanif M.A.** (2013). Morphological, physiological and biochemical responses of different plant species to Cd stress. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences* 3, 53-60.
- Farrar J.F. et Jones D.L.** (2000). The control of carbon acquisition by roots. *New Phytologist* 147, 43-53.
- Feix I. et Wyart J.** (1998). Connaissance et maîtrise des aspects sanitaires de l'épandage des boues d'épuration des collectivités locales. ADEME (Ed), 74 p.
- Feng M.H., Shan X.Q., Zhang S.Z. et Wen B.** (2005). Comparison of a rhizosphere-based method with other one-step extraction methods for assessing the bioavailability of soil metals to wheat. *Chemosphere* 59, 939-949.
- Feng R., Wei C., Tu S., Ding Y., Wang R. et Guo J.** (2013). The uptake and detoxification of antimony by plants: A review. *Environmental and Experimental Botany* 96, 28-34.
- Fernández R., Bertrand A., Casares A., García R, González A. et Tamés R.S.** (2008). Cadmium accumulation and its effect on the in vitro growth of woody fleabane and mycorrhized white birch. *Environmental Pollution* 152, 522-529.
- Fernández R., Fernández-Fuego D., Rodríguez-González P., García Alonso J.I., Bertrand A. et González A.** (2014a). Cd-induced phytochelatin synthesis in *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter is determined by the dilution of the culture medium. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 1133-1145.
- Fernández R., Fernández-Fuego D., Bertrand A. et González A.** (2014b). Strategies for Cd accumulation in *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter: role of the cell wall, non-protein thiols and organic acids. *Plant Physiology and Biochemistry* 78, 63-70.
- Fernando D.R., Batianoff G.N., Baker A.J. et Woodrow I.E.** (2006). In vivo localization of manganese in the hyperaccumulator *Gossia bidwillii* (Benth.) N. Snow & Guymmer (Myrtaceae) by cryo-SEM/EDAX. *Plant Cell and Environment* 29, 1012-1020.
- Fernando E., Quimado M., et Doronila A.** (2014). *Rinorea niccolifera* (Violaceae), a new, nickel-hyperaccumulating species from Luzon Island, Philippines. *PhytoKeys* 37, 1-13.



- Fidalgo F., Azenha M., Silva A.F., de Sousa A., Santiago A., Lopes P. et Teixeira J.** (2013). Copper-induced stress in *Solanum nigrum* L. and antioxidant defense system response. *Food and Energy Security* 2 (1), 70-80.
- Finnegan P.M. et Weihua Chen W.** (2012). Arsenic toxicity: the effects on plant metabolism. *Frontiers in Physiology* 3 (182), 1-18.
- Fischerova Z., Tlustos P., Szakova J. et Sichorova K.** (2006). A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. *Environmental Pollution* 144, 93-100.
- Fleischer A., O'Neill M.A. et Ehwald R.** (1999). The pore size of non-graminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Plant Physiology* 121, 829-838.
- Flora G., Gupta G. et Tiwari A.** (2012). Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdisciplinary Toxicology* 5(2), 47-58.
- Fodor F., Gaspar L., Morales F., Gogorcena Y., Lucena J.J., Cseh E., Kropfl K., Abadia J. et Sarvari E.** (2005). Effects of two iron sources on iron and cadmium allocation in poplar (*Populus alba*) plants exposed to cadmium. *Tree Physiology* 25, 1173-1180.
- Förstner U.** (1985). Chemical forms and reactivities of metals in sediments. In: Chemical methods for assessing bio-available metals in sludges and soil. Leschber R., Davis R.D. et L'Hermite P. (Eds), CEC, Elsevier Applied Science Publishers, pp 1-30.
- Foyer C.H et Noctor G.** (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17, 1866-1875.
- Franchin C., Fossati T., Pasquini E., Lingua G., Castiglione S. et Torrigiani P.** (2007). High concentrations of Zn and Cu induce differential polyamine responses in micropropagated white poplar (*Populus alba* L. 'Villafranca'). *Physiologia Plantarum* 130, 77-90.
- Franco C.R., Chagas A.P. et Jorge R.A.** (2002). Ion-exchange equilibria with aluminium pectinates. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects* 204, 83-192.
- Freeman J.L., Persans, M.W., Nieman K., Albrecht C., Peer W., Pickering I.J. et Salt D.E.** (2004). Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. *Plant Cell* 16, 2176-2191.
- Freisinger E.** (2008). Plant MTs-long neglected members of the metallothionein superfamily. *Dalton Transactions* 47, 6649-6852.
- Friend A.L., Eide M.R et Hinckley T.M.** (1990). Nitrogen stress alters root elongation in Douglas-fir seedlings. *Canadian Journal of Forest research* 20, 1524-1529.
- Friis R.H.** (2012). The Praeger Handbook of Environmental Health. Praeger, 2361 p.
- Fry S.C.** (1986). Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology* 37, 165-186.
- Fry S.C.** (1988). The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. Longman Scientific and Technical, Harlow, Essex, 333 p.
- Fry S.C.** (1995). Polysaccharides-modifying enzymes in plant cell wall. *Annual Review of Plant Physiology* 46, 497-520.
- Fuentes D., Disante K.B., Valdecantos A., Cortina J. et Vallejo V.R.** (2007a). Sensitivity of Mediterranean woody seedlings to copper, nickel and zinc. *Chemosphere* 66, 412-420.
- Fuentes D., Disante K.B., Valdecantos A., Cortina J. et Vallejo V.R.** (2007b). Response of *Pinus halepensis* Mill. seedlings to biosolids enriched with Cu, Ni and Zn in three Mediterranean forest soils. *Environmental Pollution* 145, 316-323.

**Fusconi A., Repetto O., Bona E., Massa N., Gallo C., Dumas-Gaudot E. et Berta G.** (2006). Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 58, 253-260.

## -G-

**Gallego S.M., Pena L.B., Barcia R.A., Azpilicueta C.E., Iannone M.F., Rosales E.P., Zawoznik M.S., Groppa M.D. et Benavides M.P.** (2012). Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany* 83, 33-46.

**Galli U., Meier M. et Brunold C.** (1993). Effects of cadmium on non-mycorrhizal and mycorrhizal Norway spruce seedlings *Picea abies* (L.) Karst. and its ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* (Scop, ex Fr.) Bk. & Br.: sulphate reduction, thiols and distribution of the heavy metal. *New Phytologist* 125, 837-843.

**Galli, U., Scheupp H. et Brunold C.** (1994). Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum* 92, 364-368.

**Gandois L., Manuel N., VanderHeijden G. et Probst A.** (2010). The importance of biomass net uptake for a trace metal budget in a forest stand in north-eastern France. *Science of the Total Environment* 408 (23), 5870-5877.

**Gangwar S., Singh V.P., Tripathi D.K., Chauhan D.K., Prasad M. et Maurya J.N.** (2014). Plant responses to metal stress: the emerging role of plant growth hormones in toxicity alleviation. *In: Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance, Volume 2, a sustainable approach.* Ahmad P. et Rasool S. (Eds), Elsevier Inc., pp 215-148.

**Garbisu C. et Alkorta I.** (2003). Basic concepts on heavy metal soil bioremediation. *European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection* 3, 58-66.

**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.

**Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z. et Jore D.** (2003). Espèces réactives de l'oxygène - Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique, Novembre-Décembre* 2003, 91-96.

**Gaur A. et Adholeya A.** (2004). Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Science* 86 (4), 528 -534.

**Gawronski S.W., Graczyk J. et Gawronska H.** (2007). Air phytoremediation-removal of particulate matter, PAHs and metals by higher plants. *In: Fate of pollutants in the plant / rhizosphere system: fundamental aspects and their significance for field applications-prospects and research needs, COST Action 859.* Baltreinaite E. (Ed), VGTU Press Technica, Vilnius, 151 p.

**Geisler M., Axelsen K.B., Harper J.F. et Palmgren M.G.** (2000). Molecular aspects of higher plant P-type Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *Biochimica and Biophysica Acta* 1465, 52-78.

**Gendre D., Czernic P., Conejero G., Pianelli K., Briat J.F., Lebrun M. et Mari S.** (2007). TcYSL3, a member of the YSL gene family from the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, encodes a nicotianamine-Ni/Fe transporter. *The Plant Journal* 49, 1-15.

**Geuns J.M.G., Cuypers A.J.F., Michiels T, Colpaet J.V., Van Laere A., Van Den Brock K.A.O. et Vandecasteele C.H.A.** (1997). Mung bean seedlings as bioindicators for soil and water contamination by cadmium. *Science of the Total Environment* 203, 183-197.

**Ghosh M et Singh S.P.** (2005). A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its by products. *Applied Ecology and Environmental Research* 3, 1-18.

**Gibeaut D.M. et Carpita N.C.** (1994). Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. *The FASEB Journal* 8, 904-915.

- Gill S.S. et Tuteja N.** (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909-930.
- Giorno F., Guerriero G., Biagetti M., Ciccotti A.M. et Baric S.** (2013). Gene expression and biochemical changes of carbohydrate metabolism in in vitro micro-propagated apple plantlets infected by 'Candidatus *Phytoplasma mali*'. *Plant Physiology and Biochemistry* 70, 311-317.
- Girard M.C., Walter C., Rémy J.C., Berthelin J. et Morel J.L.** (2005). Sols et environnement. Dunod (Ed), Paris, 816 p.
- Gleeson D., Lelu-Walter M.A. et Parkinson M.** (2004). Influence of exogenous L-proline on embryogenic cultures of larch (*Larix leptoeuropaea* Dengler), sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) and oak (*Quercus robur* L.) subjected to cold and salt stress. *Annals of Forest Science* 61, 125-128.
- Gleeson D., Lelu-Walter M.A. et Parkinson M.** (2005). Overproduction of proline in transgenic hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea* (Dengler)) cultures renders them tolerant to cold, salt and frost. *Molecular Breeding* 15, 21-29.
- Gloaguen, V., & Morvan, H.** (1997). Removal of heavy ions from aqueous solution by modified barks. *Journal of Environmental Science and Health A* 32 (4), 901-912.
- Godbold D.L., Jentschke G., Winter S. et Marschner P.** (1998). Ectomycorrhizas and amelioration of metal stress in forest trees. *Chemosphere* 36(4-5), 757-762.
- Gohari M., Habib-Zadeh A.R. et Khayat M.** (2012). Assessing the intensity of tolerance to lead and its effect on amount of protein and proline in root and aerial parts of two varieties of rape seed (*Brassica napus* L.). *Journal of Basic and Applied Scientific Research* 2 (1), 935-938.
- Goldberg R., Pierron M., Durand L. et Mutaftschiev S.** (1992). *In vitro* and *in situ* properties of cell wall pectinmethylesterases from mung bean hypocotyls. *Journal of Experimental Botany* 43, 41-46.
- Goldberg R., Morvan C., Jauneau A. et Jarvis M.C.** (1996). Methyl-esterification, de-esterification and gelation of pectins in the primary cell wall. In: Pectins and Pectinases, Progress in Biotechnology, volume 14. Visser J. et Voragen A.G.J. (Eds), Elsevier, pp 151-172.
- Goldberg R., Pierron M., Bordenave M., Breton C. et Morvan C.** (2001). Control of Mung bean pectinmethylesterase isoform activities. Influence of pH and carboxyl group distribution along the pectic chains. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 8841- 8847.
- Gonzalez R., Daystar J., Jett M., Treasure T., Jameel H., Venditti R. et Phillips R.** (2012). Economics of cellulosic ethanol production in a thermochemical pathway for softwood, hardwood, corn stover and switchgrass. *Fuel Processing Technology* 94, 113-222.
- Gorinova N., Nedkovska M., Todorovska E., Simova-Stoilova L., Stoyanova Z., Georgieva K., Demirevska-Kepova K., Atanassov A. et Herzig R.** (2007). Improved phytoaccumulation of cadmium by genetically modified tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). Physiological and biochemical response of the transformants to cadmium toxicity. *Environmental Pollution* 145, 161-170.
- Gorshkova T.A., Gurjanov O.P., Mikshina P.V., Ibragimova N.N., Mokshina N.E., Salnikov V.V., Ageeva M.V., Amenitskii S.I., Chernova T.E. et Chemikosova S.B.** (2010). Specific type of secondary cell wall formed by plant fibers. *Russian Journal of Plant Physiology* 57, 328-341.
- Gramss G., Voight K.D. et Kirsche B.** (1999). Oxidoreductase enzymes liberated by plant roots and their effects on soil humic material. *Chemosphere* 38, 1481-1494.
- Gravot A., Lieutaud A., Verret F., Auroy P., Vavasseur A. et Richaud P.** (2004). AtHMA3, a plant P1B-ATPase, functions as a Cd/Pb transporter in yeast. *FEBS Letters* 561, 22-28.
- Grčman H., Velikonja-Bolta S., Vodnik D., Kos B. et Leštan D.** (2001). EDTA enhanced heavy metal phytoextraction: metal accumulation, leaching and toxicity. *Plant and Soil* 235, 105-114.

- Greger M.** (1999). Metal availability and bioconcentration in plants. *In: Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems.* Prasad M.N.V. et Hagemayer J. (Eds), Springer- Verlag, Berlin, pp 1-27.
- Greger M. et Landberg T.** (1999) Use of willow in phytoextraction. *International Journal of Phytoremediation* 1 (2), 115-123.
- Greipsson S.** (2011). Phytoremediation. *Nature Education Knowledge* 3 (10), 7.
- Grill E., Löffler S., Winnacker E.L. et Zenk M.H.** (1989). Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific  $\gamma$ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 6838-6842.
- Groppa M.D., Tomaro M.L. et Benavides M.P.** (2001). Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Science* 161, 481-488.
- Groppa M.D., Benavides M.P. et Tomaro M.L.** (2003). Polyamine metabolism in sunflower and wheat leaf discs under cadmium or copper stress. *Plant Science* 164, 293-299.
- Groppa M.D., Ianuzzo M.P., Tomaro M.L. et Benavides M.P.** (2007a). Polyamine metabolism in sunflower plants under long-term cadmium or copper stress. *Amino Acids* 32, 265-275.
- Groppa M.D., Tomaro M.L. et Benavides M.P.** (2007b). Polyamines and heavy metal stress : the antioxidant behavior of spermine in cadmium- and copper-treated wheat leaves. *BioMetals* 20, 185-195.
- Groppa M.D et Benavides M.P.** (2008). Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* 34, 35-45.
- Grotz N. et Guérinot M.L.** (2006). Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763, 595-608.
- Grzam A., Martin M.N., Hell R. et Meyer A.J.** (2007).  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* 581, 3131-3138.
- Gu J., Qi L., Jiang W. et Liu D.** (2007). Cadmium accumulation and its effects on growth and gas exchange in four *Populus* cultivars. *Acta Biologica Cracoviensia* 49 (2), 7-14.
- Guérinot M.L.** (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465, 190-198.
- Guidi W., Pitre F.E. et Labrecque M.** (2013). Short-rotation coppice of willows for the production of biomass in eastern Canada. *In: Biomass Now -Sustainable Growth and Use.* Matovic M.D. (Ed), InTech Publisher, pp. 421-448.
- Guillaumot D., Lelu-Walter M.A., Germot A., Meytraud F., Gastinel L. et Riou-Khamlichi C.** (2008). Expression patterns of LmAP2L1 and LmAP2L2 encoding two-APETALA2 domain proteins during somatic embryogenesis and germination of hybrid larch (*Larix x marschlinii*). *Journal of Plant Physiology* 165, 1003-1010.
- Gullner G., Komives T. et Rennenberg H.** (2001). Enhanced tolerance of transgenic poplar plants overexpressing  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase towards chloroacetanilide herbicides. *Journal of Experimental Botany* 52 (358), 971-979.
- Gunsé B., Llugany M., Poschenrieder C.H et Barcelo J.** (1992). Growth, cell wall elasticity and plasticity in *Zea mays* L. coleoptiles exposed to cadmium. *Suelo y Planta* 2, 485-493.
- Guo W.J., Bundithya W. et Goldsbrough P.B.** (2003). Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. *New Phytologist* 159, 369-381.

## -H-

- Hachem K., Astier C., Chaleix V., Faugeron C., Krausz P., Kaid-Harche M. et Gloaguen V.** (2012). Optimization of lead and cadmium binding by oxidation of biosorbent polysaccharidic moieties. *Water, Air and Soil Pollution* 223 (7), 3877-3885.
- Hall J.L.** (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53, 1-11.
- Hall J.L. et Williams L.E.** (2003). Transition metal transporters in plants. *Journal of Experimental Botany* 54, 2601-2613.
- Halliwell B. et Gutteridge J.M.C.** (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal* 219, 1-14.
- Halliwell B. et Gutteridge J.M.C.** (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. Troisième édition, Oxford University Press, 888 p.
- Hamanishi E.T. et Campbell M.M.** (2011). Genome-wide responses to drought in forest trees. *Forestry* 84 (3), 273-283.
- Han H., Sun X., Xie Y., Feng J. et Zhang S.** (2014a). Transcriptome and proteome profiling of adventitious root development in hybrid larch (*Larix kaempferi* × *Larix olgensis*). *BMC Plant Biology*: 14, 35.
- Han Y., Sa G., Sun J., Shen Z., Zhao R., Ding M., Deng S., Lu Y., Zhang Y., Shen X. et Chen S.** (2014b). Overexpression of *Populus euphratica* xyloglucanendotransglucosylase/hydrolase gene confers enhanced cadmium tolerance by the restriction of root cadmium uptake in transgenic tobacco. *Environmental and Experimental Botany* 100, 74-83.
- Handique G.K. et Handique A.K.** (2009). Proline accumulation in lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* Stapf.) due to heavy metal stress. *Journal of Environmental Biology* 30 (2), 299- 302.
- Hänsch R. et Mendel R.R.** (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology* 12, 259-266.
- Hara T. et Sonoda Y.** (1979). Comparison of the toxicity of heavy metals to cabbage growth. *Plant Soil* 51, 127-133
- Hares G.B., Fernelius W.C. et Douglas B.E.** (1956). Equilibrium constants for the formation of complexes between metal ions and polyamines. *Journal of the American Chemical Society* 78, 1816-1818.
- Harrington C.F., Roberts D.J. et Nickless G.** (1996). The effect of cadmium, zinc and copper on the growth, tolerance index, metal uptake, and production of malic acid in two strains of the grass, *Festuca rubra*. *Canadian Journal of Biology* 74, 1742-1752.
- Harris R.F., Karlen D.L. et Mulla D.J.** (1996). A conceptual framework for assessment and management of soil quality and health. In: Methods for assessing soil quality. Doran J.WW et Jones A.JJ (Eds), Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, pp 61-82.
- Hasnain S. et Sabri A.N.** (1997). Growth stimulation of *Triticum aestivum* seedlings under Cr-stresses by non-rhizospheric pseudomonad strains. *Environmental Pollution* 97, 265-273.
- Hassinen V.H., Tervahauta A.I., Halimaa P., Plessl M., Peraniemi S., Schat H., Aarts M.G.M., Servomaa K. et Karenlampi S.O.** (2007). Isolation of Zn-responsive genes from two accessions of the hyperaccumulator plant *Thlaspi caerulescens*. *Planta* 225, 977-989.
- Havelange A., Lejeune P., Bernier G., Kaur-Sawhney R. et Galston A.W.** (1996). Putrescine export from leaves in relation to floral transition in *Sinapis alba*. *Physiologia Plantarum* 96, 59-65.

- Hayashi T., Kaida R., Kaku T. et Baba K.** (2010). Loosening xyloglucan prevents tensile stress in tree stem bending but accelerates the enzymatic degradation of cellulose. *Russian Journal of Plant Physiology* 57, 316-320.
- Haydon M.J. et Cobbett C.S.** (2007). Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytologist* 174, 499-506.
- Haynes R.J.** (1980). Ion exchange properties of roots and ionic interactions within the root apoplasm: their role in ion accumulation by plants. *Botanical Review* 46, 75-79.
- He Y., Kashiwagi K., Fukuchi J., Terao K., Shirahata A. et Igarashi, K.** (1993). Correlation between the inhibition of cell growth by accumulated polyamines and the decrease of magnesium and ATP. *European Journal of Biochemistry* 217, 89-96.
- He J.Y., Zhu C., Ren Y.F., Yan Y.P., Cheng C., Jiang D.A. et Sun Z.X.** (2008). Uptake, subcellular distribution, and chemical forms of cadmium in wild-type and mutant rice. *Pedosphere* 18, 371-377.
- He J., Ma C., Ma Y., Li H., Kang J., Liu T., Polle A., Peng C. et Luo Z.B.** (2013). Cadmium tolerance in six poplar species. *Environmental Science and Pollution Research* 20, 163-174.
- Heckathorn S.A. Mueller J.K., LaGuidice S., Zhu B., Barrett T., Blair B. et Dong Y.** (2004). Chloroplast small heat-shock proteins protect photosynthesis during metal stress. *American Journal of Botany* 91, 1312-1318.
- Heidari B., Pessaraki M., Dadkhodaie A. et Daneshnia N.** (2012). Reactive Oxygen Species-Mediated Functions in Plants under Environmental Stresses. *Journal of Agricultural Science and Technology B* 2, 159-168.
- Held M.A., Tan L., Kamyab A., Hare M., Shpak E. et Kieliszewski M.J.** (2004). Di-isodityrosine is the intermolecular cross-link of isodityrosine-rich extensin analogs crosslinked *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 55474-55482.
- Henriksen H.A.** (1988). Skoven og dens dyrkning. Dansk Skovforening. Nyt Nordisk forlag, Arnold Busck, Copenhagen. ISBN 87-17-05937.
- Heois B.** (1994). Variabilité juvénile chez *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco - Contribution à la mise au point de tests précoces. Thèse de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, Grignon, France.
- Hernandez L.E., Carpena-Ruiz R. et Garate A.** (1996). Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. *Journal of Plant Nutrition* 19, 581-1598.
- Hernández-Allicia J., Garbisu C., Becerril J.M., Barrutia O., García-Plazaola J.I., Zhao F.J. et McGrath S.P.** (2006). Synthesis of low molecular weight thiols in response to Cd exposure in *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell and Environment* 29, 1422-1429.
- Herrera-Ruiz J., Ruiz-Medrano R. et Dominguez A.** (1995). Selective inhibition of cytosine-DNA methylases by polyamines. *FEBS Letters* 357, 192-196.
- Heyno E., Klose C. et Krieger-Liszkay A.** (2008). Origin of cadmium-induced reactive oxygen species production: mitochondrial electron transfer versus plasma membrane NADPH oxidase. *New Phytologist* 179(3), 687-699.
- Hirschi K.D., Korenkov V.D., Wilganowski N.L. et Wagner G.J.** (2000). Expression of *arabidopsis* CAX2 in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiology* 124, 125-133.
- Hocquard C.** (2005). Les enjeux des nouveaux matériaux métalliques. *Revue Ecomine (Juillet- Août)*, Ministère de l'Économie, des Finances et de l'Industrie, Analyse prospectif 45-50.
- Hoekstra F.A., Golovina E.A., Tetteroo F.A.A. et Wolkers W.F.** (2001). Induction of desiccation tolerance in plant somatic embryos: how exclusive is the protective role of sugars? *Cyobiology* 43, 140-150.

- Hopff D., Wienkoop S. et Lüthje S.** (2013). The plasma membrane proteome of maize roots grown under low and high iron conditions. *Journal of Proteomics* 91, 605-618.
- Hopkins W.G.** (2003). Physiologie végétale. De Boeck Supérieur (Ed), Louvain-La-Neuve, Paris, 532 p.
- Hossain A.K.M.Z., Koyama H. et Hara T.** (2006). Growth and cell wall properties of two wheat cultivars differing in their sensitivity to aluminium stress. *Journal of Plant Physiology* 163, 39-47.
- Hossain M.A., Piyatida P., Teixeira da Silva J.A. et Fujita M.** (2012). Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *Journal of Botany* 2012, 1-37.
- Hossain A., Hoque Md.A., Burritt D. J. et Fujita M.** (2014). Proline Protects Plants Against Abiotic Oxidative Stress: Biochemical and Molecular Mechanisms. *In: Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling.* Ahmad P. (Ed), Academic Press, Elsevier, pp 477-522.
- HSDB** (Hazardous Substances Data Bank) (2000). Zinc. National Library of Medicine. <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>.
- Huang J.W. et Cunningham S.D.** (1996). Lead phytoextraction: Species variation in lead uptake and translocation. *New Phytologists* 134, 5-84.
- Huang J.W., Chen J., Berti W.R., et Cunningham S.D.** (1997). Phytoremediation of lead contaminated soils-Role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environmental Science and Technology* 31, 800-806.
- Huck M.G.** (1972). Impairment of sucrose utilization for cell wall formation in the roots of aluminium damaged cotton seedlings. *Plant and Cell Physiology* 13, 7-14.

**-I-**

- INERIS.** (2003). Plomb et ses dérivés. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. INERIS-DRC-01-25590-ETSC-API/SD –N°00df257
- INERIS.** (2005). Chrome et ses dérivés. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques.
- INERIS.** (2006). Nickel et ses dérivés. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques.
- INERIS.** (2007). Antimoine et ses dérivés. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. INERIS–DRC-03-47020-03DD050.
- INERIS.** (2010). Arsenic et ses dérivés inorganiques. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. INERIS- DRC-09-103112-11453A.
- INERIS.** (2014). Cadmium et ses dérivés. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. INERIS –DRC-11-117259-10308B.
- Inouhe M.** (2005). Phytochelatins. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17 (1), 65-78.
- Isaure M.P., Huguet S., Meyer C.L., Castillo-Michel H., Testemale D., Vantelon D., Saumitou-Laprade P., Nathalie Verbruggen N. et Sarret G.** (2015). Evidence of various mechanisms of Cd sequestration in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*, the non-accumulator *Arabidopsis lyrata*, and their progenies by combined synchrotron-based techniques. *Journal of Experimental Botany* 66 (11), 3201-3214.
- Isayenkov S.V. et Maathuis F.J.M.** (2008). The *Arabidopsis thaliana* aquaglyceroporin AtNIP7;1 is a pathway for arsenite uptake. *FEBS Letters* 582, 1625-1628.
- Islam M.A., Sturrock R.N. et Ekramoddoullah A.K.** (2008). A proteomics approach to identify proteins differentially expressed in Douglas-fir seedlings infected by *Phellinus sulphurascens*. *Journal of Proteomics* 71 (4), 425-438.

**Israr M., Sahi S., Datta R. et Sarkar D.** (2006). Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sesbania drummondii*. *Chemosphere* 65, 591-598.

**IUCLID** (International Uniform Chemical Information Database) (1996). Lead. European Commission ISPRA. CD.

**Ivanov Y.V., Savochkin Y.V. et Kuznetsov V.I.V.** (2011). Scots pine as a model plant for studying the mechanisms of conifers adaptation to heavy metal action: 1. Effects of continuous zinc presence on morphometric and physiological characteristics of developing pine seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology* 58 (5), 871-878.

**Ivanov Y.V., Savochkin Y.V. et Kuznetsov V.I.V.** (2012). Scots pine as a model plant for studying the mechanisms of conifers adaptation to heavy metal action: 2. Functioning of antioxidant enzymes in pine seedlings under chronic zinc action. *Russian Journal and Plant Physiology* 59 (1), 50-58.

**Ivezić V., Lončarić Z., Engler M., Kerovec D. et Singh B.R.** (2013). Comparison of different extraction methods representing available and total concentrations of Cd, Cu, Fe, Mn and Zn in soil. *Poljoprivreda* 19 (1), 53-58.

## -J-

**Jaffré T., Brooks R.R., Lee J. et Reeves R.D.** (1976). *Sebertia acuminata*: a hyperaccumulator of nickel from New Caledonia. *Science* 193, 579-580.

**Jaffré T., Pillon Y., Thomine S. et Merlot S.** (2013). The metal hyperaccumulators from New Caledonia can broaden our understanding of nickel accumulation in plants. *Frontiers in Plant Science* 4, 1-7.

**Jagtap U.B., Bapat V.A., Saladin G., Chudzińska E., Krzesłowska M., Pawlaczyk E.M., Komal T., Kazi A.G., Sherameti I. et Ali Z.** (2016). Microbes and plants for phytoremediation: potential of genetic engineering. In: Ecological restoration: global challenges, social aspects and environmental benefits. Squires V.R. et Whisenant S. (Eds), Nova Publishers, New-York (sous presse).

**Jambhulkar H.P et Juwarkar A.A.** (2009). Assessment of bioaccumulation of heavy metals by different plant species grown on fly ash dump. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1222-1228.

**Jamet E., Canut H., Boudart G. et Pont-Lezica R.F.** (2006). Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends in Plant Science* 11, 33-39.

**Jansen S., Broadley M.R., Robbrecht E. et Smets E.** (2002). Aluminium hyperaccumulation in Angiosperms: a review of its phylogenetic significance. *Botanical Review* 68 (2), 235-269.

**Jarvis M.C.** (1984). Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. *Plant Cell and Environment* 7, 153-164.

**Jarvis M.D. et Leung D.W.M.** (2002). Chelated lead transport in *Pinus radiata*: an ultrastructural study. *Environmental and Experimental Botany* 48, 21-32.

**Jauberty L., Gloaguen V., Astier C., Krausz P., Delpech V., Berland A., Granger V., Niort I., Royer A. et Decossas J.L.** (2011). Bark, a suitable biosorbent for the removal of uranium from wastewater-From laboratory to industry. *Radioprotection* 46 (4), 443-456.

**Jentschke G., Marschner P., Vodnik D., Marth C., Bredemeier M., Rapp C., Fritz E., Gogala N. et Godbold D.L.** (1998). Lead uptake by *Picea abies* seedlings: effects of nitrogen source and mycorrhizas. *Journal of Plant Physiology* 153, 97-10.

**Jentschke G., Winter S. et Godbold D.L.** (1999). Ectomycorrhizas and cadmium toxicity in Norway spruce seedlings. *Tree Physiology* 19, 23-30.

**Johansson K., El-Ahmad M., Friemann R., Jörnvall H., Markovic O. et Eklund H.** (2002). Crystal structure of plant pectin methylesterase. *FEBS Letters* 514 (2-3), 243-249.



- 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), 65-76.
- Johnson M.D., Kenney N., Stoica A., Hilakivi-Clarke L., Singh B., Chepko G., Clarke R., Sholler P.F., Lirio A.A., Foss C., Reiter R., Trock B., Paik S. and Martin M.** (2003). Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nature Medicine* 9 (8), 1081-1084.
- Jolie R.P., Duvetter T., Van Loey A.M. et Hendrickx M.E.** (2010). Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. *Carbohydrate Research* 345, 2583-2595.
- Joner E.J. et Leyval C.** (1997). Uptake of <sup>109</sup>Cd by roots and hyphae of a *Glomus mosseae/Tripholium subterraneum* mycorrhiza from soil amended with high and low concentration of cadmium. *New Phytologist* 135, 353-360.
- Jones R.G.** (1984). Phytochemical aspects of osmotic adaptation. *Recent Advances in Phytochemistry* 18, 55-78.
- Jones R., Lapp T. et Wallace D.** (1993). Locating and estimating air emissions from sources of cadmium and cadmium compounds, prepared by Midwest Research Institute for the U.S. *Environmental Protection Agency, Office of Air and Radiation*. EPA-453/R-93- 040.
- Jones D.L., Darrah P.R. et Kochain L.V.** (1996). Critical evaluation of organic acid mediated iron dissolution in the rhizosphere and its potential role in root iron uptake. *Plant and Soil* 180, 57-66.
- Joshi C.P., Thammannagowda S., Fujino T., Gou J.Q., Avci U., Haigler C.H., McDonnell L.M., Mansfield S.D., Mengesha B., Carpita N.C., Harris D., DeBolt S. et Peter G.F.** (2011). Perturbation of Wood Cellulose Synthesis Causes Pleiotropic Effects in Transgenic Aspen. *Molecular Plant* 4, 331-345.
- Juste C., Chassin P., Gomez A., Linères M. et Mocquot, B.** (1995). Les micro-polluants métalliques dans les boues résiduaires des stations d'épuration urbaines. <http://prodinra.inra.fr/record/115288>.

## -K-

- Kai Y.** (1991). Chemistry of extractives. *In: Wood and cellulosic chemistry*. Hon D.N.S. et Shiraishi N. (Eds), Marcel Dekker Inc., New York, pp 215-255.
- Kamerling J.P., Gerwig G.J., Vliegthart J.F.G., Clamp J.R.** (1975). Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides. *Biochemical Journal* 151, 491-495.
- Kampfenkel K., Kushnir S., Babiychuk E., Inzé D. et Montagu M.** (1995). Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 28479-28486.
- Kaplan B., Sherman T. et Fromm H.** (2007). Cyclic nucleotide-gated channels in plants. *FEBS Letters* 581, 2237-2246.
- Karami A. et Shamsuddin Z.H.** (2010). Phytoremediation of heavy metals with several efficiency enhancer methods. *African Journal of Biotechnology* 9, 3689-3698.
- Kashem M.A., Singh B.R., Kondo T., Imamul Huq S.M. et Kawai S.** (2007). Comparison of extractability of Cd, Cu, Pb and Zn with sequential extraction in contaminated and non-contaminated soils. *International Journal of Environmental Science and Techonoly* 4 (2), 169-176.
- Kasim W.A.** (2006). Changes induced by copper and cadmium stress in the anatomy and grain yield of *Sorghum bicolor* (L.) Moench *International Journal of Agriculture and Biology* 8, 123-128.
- Kasim W.A.** (2007). Physiological consequences of structural and ultra-structural changes induced by Zn stress in *Phaseolus vulgaris*. I. Growth and photosynthetic apparatus. *International Journal of Botany* 3, 15-22.

- Keiding H.** (1968). Preliminary investigations of inbreeding and out crossing in Larch. *Silvae Genetica* 17 (5-6), 159-164.
- Kelley B.C. et Tuovinen O.H.** (1988). Microbial oxidation of minerals in mine tailings. *In: Chemistry and biology of solid waste.* Solomons W. et Foerstner V. (Eds), Springer Verlag, Berlin, 33-53.
- Khan A.G., Keuk C., Chaudhry T.M., Khoo C.S. et Hayes W.J.** (2000). Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 4, 197-207.
- Khan A., Khan S., Khan M.A., Qamar Z. et Waqas M.** (2015). The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrients, and associated health risk: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 22 (18), 13772-13799.
- Kiikkilä O.** (2003). Heavy-metal pollution and remediation of forest soil around the Harja valta Cu-Ni smelter, in SW Finland. *Silva Fennica* 37(3), 399-415.
- Kim D., Gustin J.L., Lahner B., Persans M.W, Baek D., Yun D. et Salt D.E** (2004). The plant CDF family member TgMTP1 from the Ni/Zn hyperaccumulator *Thlaspi goesingense* acts to enhance efflux of Zn at the plasma membrane when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Journal* 39, 237-251.
- Knox J.P., Linstead P.J., King J., Cooper C. et Roberts K.** (1990). Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. *Planta* 181, 512-521.
- Kohler C., Merkle T. et Neuhaus G.** (1999). Characterisation of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulin-regulated ion channels in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 18, 97-104.
- Koji N., Yuichi Y., Ryumon H., Masao I., Ikiko T., Shunichi K. et Takashi K.** (1983). The relationship between itai-itai disease among inhabitants of the jinzu river basin and cadmium in rice. *Toxicology Letters* 17, 263-266.
- Komalavilas P. et Mort A.J.** (1989). The acetylation at O-3 of galacturonic acid in the Rhamnose-rich region of pectins. *Carbohydrate Research* 189, 261-272.
- Konlechner C., Türktas M., Langer I., Vaculík M., Wenzel W.W, Puschenreiter M. et Hauser M.T.** (2013). Expression of zinc and cadmium responsive genes in leaves of willow (*Salix caprea* L.) genotypes with different accumulation characteristics. *Environmental Pollution* 178, 121-127.
- Konno H., Nakato T., Nakashima S. et Katoh K.** (2005). *Lygodium japonicum* fern accumulates copper in the cell wall pectin. *Journal of Experimental Botany* 56, 1923-1931.
- Korenkov V., Park S., Cheng N.H., Sreevidya C., Lachmansingh J., Morris J., Hirschi K. et Wagner G.J.** (2007). Enhanced Cd<sup>2+</sup>-selective root-tonoplast-transport in tobaccos expressing *Arabidopsis* cation exchangers. *Planta* 225, 403-411.
- Kovacik J., Klejdus B., Kadukova J. et Backor M.** (2007). Physiology of *Matricaria chamomilla* exposed to nickel excess. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 603-609.
- Kozdrój J., Piotrowska-Seget Z. et Krupa P.** (2007). Mycorrhizal fungi and ectomycorrhiza associated bacteria isolated from an industrial desert soil protect pine seedlings against Cd(II) impact. *Ecotoxicology* 16, 449-456.
- Krämer U., Cotter-Howells J.D., Charnock J.M., Baker A.J.M. et Smith J.A.C.** (1996). Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 379, 635-638.
- Krämer U., Pickering I.J., Prince R.C., Raskin I. et Salt D.E.** (2000). Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. *Plant Physiology* 122, 1343-1353.
- Krämer U., Talke I.N. et Hanikenne M.** (2007). Transition metal transport. *FEBS Letter* 581, 2263-2272.

- Krishna R., Fulekar M.H et Bhawana Pathak B.** (2012). Rhizofiltration : a green technology for remediation of heavy metals. *International Journal of Innovations in Bio-Sciences* 2, 193-199.
- Krishnamurti G.S.R., Cieśliński G., Huang P.M. et Van Rees K.C.J.** (1997). Kinetics of cadmium release from soils as influenced by organic acids: Implication in cadmium availability. *Journal of Environmental Quality* 26, 271- 277.
- Krzesłowska M.** (2011). The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiologiae Plantarum* 33, 35-51.
- Krznaric E., Wevers J.H.L., Cloquet C., Vangronsveld J., Vanhaecke F. et Colpaert J.V.** (2010). Zn pollution counteracts Cd toxicity in metal-tolerant ectomycorrhizal fungi and their host plant, *Pinus sylvestris*. *Environmental Microbiology* 12(8), 2133-2141.
- Kukkola E., Rautio P. et Huttunen S.** (2000). Stress indications in copper- and nickel-exposed Scots pine seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 43, 197-210.
- Kumar P.B.A.N., Dushenkov V., Motto H. et Raskin, I.** (1995). Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science and Technology* 29 (5), 1232-1238.
- Kumar V., Awasthi G. et Chauhan P.K.** (2012). Cu and Zn tolerance and responses of the biochemical and physiochemical system of wheat. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry* 8 (3), 203-213.
- Kumar B., Smita K. et Flores L.C.** (2014). Plant mediated detoxification of mercury and lead. *Arabian Journal of Chemistry - Special Issue: Environmental Chemistry*, 8 p., doi:10.1016/j.arabjc.2013.08.010.
- Kumpiene J., Guerri G., Landi L., Pietramellara G., Nannipieri P. et Renella G.** (2009). Microbial biomass, respiration and enzyme activities after *in situ* aided phytostabilization of a Pb- and Cu-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 115-119.
- Kupper H., Mijovilovich A., Meyer-Klaucke W. et Kroneck P.M.H.** (2004). Tissue- and age-dependent differences in the complexation of Cadmium and Zinc in the Cadmium/Zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges ecotype) revealed by X-Ray absorption spectroscopy. *Plant Physiology* 134, 748-757.
- Kusano T., Yamaguchi K., Berberich T. et Takahashi Y.** (2007). Advances in polyamine research in 2007. *Journal of Plant Research* 120, 345-350.

## -L-

- Labrecque M. et Teodorescu T.I.** (2003). High biomass yield achieved by *Salix* clones in SRIC following two 3-year coppice rotations on abandoned farmland in southern Quebec, Canada. *Biomass and Bioenergy* 25, 135-146.
- Lafuente A.L., Gonzalez C., Quintana J.R., Vazquez A. et Romero A.** (2008). Mobility of heavy metals in poorly developed carbonate soils in the Mediterranean region. *Geoderma* 145, 238-244.
- Lai H.Y.** (2015). Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Impatiens walleriana* in relation to its phytoextraction potential. *Chemosphere* 138, 370-376.
- Lalvani T., Wiltowskiand T. et Weston A.** (1997). Metal ions removal from wastewater by adsorption. Symposium 1997, Las Vegas, Carbons for advanced energy and environmental applications. *MJ Road* 877-879.
- Lamoreaux R.J et Chaney W.R.** (1977). Growth and water movement in Silver Maple seedlings affected by cadmium. *Journal of Environmental Quality* 6, 201-205.
- Lane T.W et Morel F.M.** (2000). A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 97, 4627-4631.
- Lane BG.** (2002). Oxalate, germins, and higher-plant pathogens. *IUBMB Life* (53) 2, 67-75.

- Laperche V., Dictor M.C, B. Clozel-Leloup B. et Baranger Ph.** (2004). Guide méthodologique du plomb, appliqué à la gestion des sites et sols pollués. BRGM/RP-52881-FR. Étude réalisée dans le cadre des actions de Service public du BRGM 2003-POLA06.
- Larsson-Stern M.** (2003). Larch in Commercial Forestry: A literature review to help clarify the potential of hybrid larch (*Larix x eurolepis* Henry) in Southern Sweden forestry. Licentiate thesis Swedish University of Agricultural Sciences Alnarp, ISBN 91-576-6296-7.
- Lasat M.M.** (2002). Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality* 31, 109-120.
- Laureysens I., Blust R., De Temmerman L., Lemmens C. et Ceulemans R.** (2004). Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: I. Seasonal variation in leaf, wood and bark concentrations. *Environmental Pollution* 131, 485-494.
- Le Gall H., Philippe F., Domon J.M., Gillet F., Pelloux J. et Rayon C.** (2015). Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants* 4 (1), 112-166.
- Lebrun C.** (1970). Prétraitement des graines de Douglas à l'eau oxygénée. Technique et forêt. *Revue Forestière Française* 4, 473-476.
- Lecomte J.** (2009). Les cires végétales : sources et applications. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* 16, 262-266.
- Lee B.G. et Rowell R.M.** (2004). Removal of Heavy Metal Ions from Aqueous Solutions Using Lignocellulosic Fibers. *Journal of Natural Fibers* 1(1), 97-108.
- Lehmann, C. et Rebele F.** (2004). Evaluation of heavy metal tolerance in *Calamagrostis epigejos* and *Elymus repens* revealed copper tolerance in a copper smelter population of *C. epigejos*. *Environmental and Experimental Botany* 51, 199-213.
- Lelu-Walter M.A. et Pâques L.E.** (2009). Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix x eurolepis* and *Larix x eurolepis*). Perspectives for breeding. *Annals of Forest Science* 66 (104), 1-10.
- Lelu-Walter M.A., Teyssier C., Guérin V. et Pâques L.E.** (2015). Vegetative propagation of larch species: somatic embryogenesis improvement towards its integration in breeding programs. *In: Vegetative Propagation of Forest Trees*. Park Y.S., Bonga J.M. et Moon H.K. (Eds), National Institute of Forest Science. Seoul, Korea (sous presse).
- Lerouge P., O'Neill M.A., Darvill A.G. et Albersheim P.** (1993). Structural characterization of endo-glycanase-generated oligoglycosyl side chains of rhamnogalacturonan I. *Carbohydrate Research* 243, 359-371.
- Lesko K. et Simon-Sarkadi L.** (2002). Effect of cadmium stress on amino acid and polyamine content of wheat seedlings. *Periodica Polytechnica: Chemical Engineering* 46 (1-2), 65-71.
- Lesniewska E., Adrian M., Klinguer A. et Pugin A.** (2004). Cell wall modification in grapevine cells in response to UV stress investigated by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* 100, 171-178.
- Leung H.M., Wang Z.W., Ye Z.H., Yung K.L., Peng X.L. et Cheung K.C.** (2013) Interactions between arbuscular mycorrhizae and plants in phytoremediation of metal-contaminated soils: a review. *Pedosphere* 23(5), 549-563.
- Levresse G., Lopez G., Tritlla J., López E.C., Chavez A.C., Salvador E.M., Soler A., Corbella M., Sandoval L.G.H. et Corona-Esquivel R.** (2012). Phytoavailability of antimony and heavy metals in arid regions: the case of the Wadley Sb district (San Luis, Potosí Mexico). *Science of Total Environment* 427-428, 115-125.
- Lewandowski I., Schmidt U., Londo M. et Faaij A.** (2006). The economic value of the phytoremediation function - Assessed by the example of cadmium remediation by willow (*Salix* ssp). *Agricultural Systems* 89, 68-89.

- Li X.F., Ma J.F. et Matsumoto H.** (2000). Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. *Plant Physiology* 123, 1537-1543.
- Li Y.M., Chaney R. L., Brewer E. P., Roseberg R. J., Angle J. S., Baker A. J. M., Reeves R. D. et Nelkin J.** (2003). Development of a technology for commercial phytoextraction of nickel: Economic and technical considerations. *Plant Soil* 249, 107-115.
- Li J.T., Liao B., Dai Z.Y., Zhu R. et Shu W.S.** (2009). Phytoextraction of Cd-contaminated soil by carambola (*Averrhoa carambola*) in field trials. *Chemosphere* 76, 1233-1239.
- Li J.T., Liao B., Zhu R., Dai Z.Y., Lan C.Y. et Shu W.S.** (2011). Characteristics of Cd uptake, translocation and accumulation in a novel Cd-accumulating tree, star fruit (*Averrhoa carambola* L., Oxalidaceae). *Environmental and Experimental Botany* 71, 352-358.
- Liang H.M., Lin T.H., Chiou J.M. et Yeh K.C.** (2009). Model evaluation of the phytoextraction potential of heavy metal hyperaccumulators and non-hyperaccumulators. *Environmental Pollution* 157, 1945-1952.
- Liao M. et Xie X.M.** (2004). Cadmium release in contaminated soils due to organic acids. *Pedosphere* 14, 223-228.
- Lichtenthaler H.K.** (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148, 350-382.
- Liepman A.H., Nairn C.J., Willats W.G.T., Sorensen I., Roberts A.W. et Keegstra K.** (2007). Functional genomic analysis support conservation of function among cellulose synthase-like A gene family members and suggests diverse roles of mannans in plants. *Plant Physiology* 143, 1881-1893.
- Lin C.H. et Kao C.H.** (1999). Excess copper induces an accumulation of putrescine in rice leaves. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 40, 213-218.
- Lin Y.F., Liang H.M., Yang S.Y., Boch A., Clemens S., Chen C.C., Wu J.F., Huang J.L. et Yeh K.C.** (2009). *Arabidopsis* IRT3 is a zinc-regulated and plasma membrane localized zinc/iron transporter. *New Phytologist* 182, 392-404.
- Lindeboom J., Mulder B.M., Vos J.W., Ketelaar T. et Emons A.M.C.** (2008). Cellulose microfibril deposition: coordinated activity at the plant plasma membrane. *Journal of Microscopy* 231, 192-200
- Liners F. et Van Cutsem P.** (1992). Distribution of pectic polysaccharides throughout walls of suspension-cultured carrot cells. An immunocytochemical study. *Protoplasma* 170, 10-21.
- Lingua G., Franchin C., Todeschini V., Castiglione S., Biondi S., Burlando B., Parravicini V., Torrigiani P. et Berta G.** (2008). Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect the response to high zinc concentrations of two registered poplar clones. *Environmental Pollution* 153, 147-157.
- Liu J.H., Nada K., Honda C., Kitashiba H., Wen X.P., Pang X.M. et Moriguchi T.** (2006). Polyamine biosynthesis of apple callus under salt stress: importance of the arginine decarboxylase pathway in stress response. *Journal of Experimental Botany* 57, 2589-2599.
- Liu J.H., Kitashiba H., Wang J., Ban Y. et Moriguchi T.** (2007). Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotechnology* 24, 117-126.
- Liu M.Q., Yanai J., Jiang R.F., Zhang F., McGrath S.P. et Zhao F.J.** (2008). Does cadmium play a physiological role in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*? *Chemosphere* 71, 1276-1283.
- Liu Z., He X., Chen W., Yuan F., Yan K. et Tao D.** (2009). Accumulation and tolerance characteristics of cadmium in a potential hyperaccumulator - *Lonicera japonica* Thunb. *Journal of Hazardous Materials* 169 (1-3), 170-175.
- Liu W., Ni J., Zhou Q.** (2013). Uptake of heavy metals by trees: prospects for phytoremediation. *Materials Science Forum* 743-744, 768-781.

**Liu J.G., Qu P., Zhang W., Dong Y., Li L. et Wang M.X.** (2014). Variations among rice cultivars in subcellular distribution of Cd: the relationship between translocation and grain accumulation. *Environmental and Experimental Botany* 107, 25-31.

**Lo I.M.C. et Yang X.Y.** (1999). EDTA extraction of heavy metals from different soil fractions and synthetic soils. *Water Air and Soil Pollution* 109, 219-236.

**Løvaas E.** (1997). Antioxidant and metal-chelating effects of polyamines. *Advances in Pharmacology* 38, 119-149.

## -M-

**Ma J.F., Zheng S.J., Hiradate S. et Matsumoto H.** (1997). Detoxifying aluminium with buckwheat. *Nature* 390, 569-570.

**Ma J.F., Ryan P.R. et Delhaize E.** (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Science* 6, 273-278.

**Ma J.F., Yamaji N., Mitani N., Xu X.Y., Su Y.H., McGrath S.P et Zhao F.J.** (2008). Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 9931-9935.

**Macfie S. M. et Welbourn P. M.** (2000). The cell wall as a barrier to uptake of metal ions in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39, 413-419.

**Macnair M.R.** (1993). The genetics of metal tolerance in vascular plants. *New Phytologist* 124, 541-559.

**Macnair M.R., Tilstone G.H. et Smith S.E.** (2000). The genetics of metal tolerance and accumulation in higher plants. In: *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Terry N. (Ed), CRC Press LLC, pp 235-250.

**Magné C. et Larher F.** (1992). High sugar content of extract interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Analytical Biochemistry* 200, 115-118.

**Maisch T., Baier J., Franz B., Maier M., Landthaler M., Szeimies R.M. et Baumler W.** (2007). The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 7223-7228.

**Malan H.L., Mesjasz-Przybylowicz J., Przybylowicz W.J., Farrant J.M. et Linder P.W.** (2012). Distribution patterns of the metal pollutants Cd and Ni in soybean seeds. *Nuclear Instruments and Methods B* 273, p157-160.

**Malar S., Vikram S.S., Favas P.J. et Perumal V.** (2014). Lead heavy metal toxicity induced changes on growth and antioxidative enzymes level in water hyacinths [*Eichhornia crassipes* (Mart.)]. *Botanical Studies* 55(1), 1-11.

**Manara A.** (2012). Plant Responses to Heavy Metal Toxicity. In: *Plants and Heavy Metals*. Furini A. (Ed), Springer Briefs in Biometals, pp 27-53.

**Manrique G.D. et Lajolo F.M.** (2002). FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. *Postharvest Biology and Technology* 25, 99-107.

**Marcus S.E., Blake A.W., Benians T.A.S., Lee K.J.D., Poyser C., Donaldson L., Leroux O., Rogowski A., Petersen H.L, Boraston A., Gilbert H.J., Willats W.G.T. et Knox J.P.** (2010). Restricted access of proteins to mannan polysaccharides in intact plant cell walls. *The Plant Journal* 64, 191-203.

**Marga F., Freyssac V. et Morvan H.** (1995). Rapid gas liquid chromatography microanalysis of carbohydrates in woody plant tissues. *Journal of Trace and Microprobe Techniques* 13 (4), 473- 478.

- Mari S., Gendre D., Pianelli K., Ouerdane L., Lobinski R., Briat J.F., Lebrun M. et Czernic P.** (2006). Root-to-shoot long-distance circulation of nicotianamine and nicotianamine–nickel chelates in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany* 57, 4111-4122.
- Markkola A.M., Tarvainen O., Ahonen-Jonnarth U. et Strommer R.** (2002). Urban polluted forest soils induce elevated root peroxidase activity in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Environmental Pollution* 116, 273-278.
- Marmioli M., Pietrini F., Maestri E., Zacchini M., Marmioli N. et Massacci A.** (2011). Growth, physiological and molecular traits in Salicaceae trees investigated for phytoremediation of heavy metals and organics. *Tree Physiology* 31, 1319-1334
- Marschner H.** (1995). Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London, 889 p.
- Marsoni M., Vannini C., Campa M., Cucci U., Espen L. et Bracale M.** (2005). Protein extraction from grape tissues by two-dimensional electrophoresis. *Vitis* 44 (4), 181-186.
- Martin-Dupont F., Gloaguen, V., Granet, R., Guilloton, M., Morvan, H. et Krausz P.** (2002). Heavy metal adsorption by crude coniferous barks: a modelling study. *Journal of Environmental Science and Health A* 37(6), 1063-1073.
- Martin-Dupont F.** (2003). Valorisation chimique d'un produit de la filière bois, Thèse de Doctorat Université de Technologie de Compiègne, 156 p.
- Martin-Dupont F., Gloaguen V., Guilloton M., Granet R., Krausz P.** (2006). Study of the chemical interaction between barks and heavy metal cations in the sorption process. *Journal of Environmental Science and Health - Part A, Toxic / Hazardous Substances and Environmental Engineering* 4, 149-160.
- Martin-Dupont F., Fontaine N.Y. et Fontaine G.** (2008). La construction, un avenir pour le bois du Limousin. *La lettre du Limousin* 79, 11-12.
- Martin-Tanguy J.** (2001). Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regulation* 34, 135-148.
- Matoh T., Takasaki M., Takabe K. et Kobayashi M.** (1998). Immunocytochemistry of rhamnogalacturonan II in cell walls of higher plants. *Plant Cell Physiology* 39, 483-491.
- Matsunaga T., Ishii T., Matsumoto S., Higuchi M., Darvill A., Albersbeim P. et O'Neill M.** (2004). Occurrence of the primary cell wall polysaccharide rhamnogalacturonane II in Pteridophytes, Lycophytes and Bryophytes. Implications for the evolution of vascular plants. *Plant Physiology* 134, 339-351.
- Matthews D.J., Moran B.M., McCabe P.F. et Otte M.L.** (2004). Zinc tolerance, uptake, accumulation and distribution in plants and protoplasts of five European populations of the wetland grass *Glyceria fluitans*. *Aquatic Botany* 80, 39-52.
- Matthews D.J., Moran B.M. et Otte M.L.** (2005). Screening the wetland plant species *Alisma plantago-aquatica*, *Carex rostrata* and *Phalaris arundinacea* for innate tolerance to zinc and comparison with *Eriophorum angustifolium* and *Festuca rubra* Merlin. *Environnemental Pollution* 134(2), 343-351.
- McCann M.C. et Roberts K.R.** (1991). The cytoskeletal basis of plant growth and form. Lloyd C.W. (Ed), Academic Press, pp 109-129.
- McCann M.C., Shi J., Roberts K. et Carpita N.C.** (1994). Changes in pectin structure and localization during the growth and NaCl-adapted tobacco cells. *Plant Journal* 5, 773-785.
- McGrath S.P., Zhao F.J. et Lombi E.** (2002). Phytoremediation of metals, metalloids and radionuclides. *Advances in Agronomy* 75, 1-56.

- McLean C.M., Koller C.E., Rodger J.C. et MacFarlane G.R.** (2009). Mammalian hair as an accumulative bioindicator of metal bioavailability in Australian terrestrial environments. *Science of the Total Environment* 407 (11), 3588-3596.
- McNaughton S.J., Folsom T.C., Lee T., Park F., Price C., Roeder D., Schmitz J. et Stockwell C.** (1974). Heavy metal tolerance in *Typha latifolia* without the evolution of tolerant races. *Ecology* 55, 1163-1165.
- Meagher R.** (2000). Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 153-162.
- Meers E., Slycken S.V., Adriaensen K., Ruttens A., Vangronsveld J., Laing G.D., Witters N., Thewys T. et Tack F.M.G.** (2010). The use of bio-energy crops (*Zea mays*) for phytoremediation of heavy metals on moderately contaminated soils: a field experiment. *Chemosphere* 78, 35-41.
- Meharg A.A.** (1994). Integrated tolerance mechanisms: constitutive and adaptive plant responses to elevated metal concentrations in the environment. *Plant Cell and Environment* 17, 969-993.
- Meharg A.A., Naylor J. et Macnair M.R.** (1994). Phosphorus nutrition of arsenate tolerant and nontolerant phenotypes of velvetgrass. *Journal of Environmental Quality* 23, 234-238.
- Meharg A.A. et Jardine L.** (2003). Arsenite transport into paddy rice (*Oryza sativa*) roots. *New Phytologist* 157, 39-44.
- Meharg A.A.** (2005). Mechanisms of plant resistance to metal and metalloid ions and potential biotechnological applications. *Plant and Soil* 274, 163-174.
- Memon A.R. et Schröder P.** (2009). Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research* 16, 162-75.
- Mench M. et Baize D.** (2004). Contamination des sols et de nos aliments d'origine végétale par les éléments en traces : mesures pour réduire l'exposition. *Courrier de l'Environnement de l'INRA* 52, 31-56.
- Mench M., Vangronsveld J., Lepp N., Bleeker P., Ruttens A. et Geebelen W.** (2006). Phytostabilisation of metal-contaminated sites. In: Phytoremediation of metal-contaminated soils. Morel J.M., Echevarria G. et Goncharova N. (Eds), Springer, Netherlands, pp 109-190.
- Mench M., Schwitzguébel J.P., Schroeder P., Bert V., Gawronski S. et Gupta S.** (2009). Assessment of successful experiments and limitations of phytotechnologies: contaminant uptake, detoxification and sequestration, and consequences for food safety. *Environmental Science and Pollution Research* 16, 876-900.
- Mendoza-Cózatl D.G. et Moreno-Sanchez R.** (2005). Cd<sup>2+</sup> transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1706, 88-97.
- Mendoza-Cózatl D.G., Loza-Tavera H., Hernandez-Navarro A. et Moreno-Sanchez R.** (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 653-671.
- Mendoza-Cózatl D.G. et Moreno-Sanchez R.** (2006). Control of glutathione and phytochelatin synthesis under cadmium stress. Pathway modeling for plants. *Journal of Theoretical Biology* 238, 919-936.
- Mendoza-Cózatl D.G., Butko E., Springer F., Torpey J.W., Komives E.A. et Kehr J.** (2008). Identification of high levels of phytochelatins, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*: a role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *The Plant Journal* 54, 249-259.
- Mendoza-Cózatl D.G., Jobe O.J., Hauser F. et Schroeder J.I.** (2011). Long-distance transport, vacuolar sequestration, tolerance, and transcriptional responses induced by cadmium and arsenic. *Current Opinion in Plant Biology* 14 (5), 564-562.



- Mertens J., Vervaeke P., Meers E. et Tack F.M.F.** (2006). Seasonal changes of metals in willow (*Salix* sp.) stands for phytoremediation on dredged sediment. *Environmental Science and Technology* 40, 1962-1968.
- Metche M. et Girardin M.** (1980). Les tanins végétaux. *In: Les polymères végétaux*. Monties & Bordas (Eds), pp 252-287.
- Meuser H.** (2012). Soil Remediation and Rehabilitation : Treatment of Contaminated and Disturbed Land. Springer Science and Business Media, 408 pages.
- Meychik N. et Yermakov I.P.** (2001). Ion exchange properties of plant root cell walls. *Plant and Soil* 234, 181-193.
- Meychik N., Nikolaeva Y., Kushunina M. et Yermakov I.** (2014). Are the carboxyl groups of pectin polymers the only metal binding sites in plant cell walls? *Plant Soil* 381, 25-34.
- Micheli F.** (2001). Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science* 6, 414-419.
- Mills R.F., Francini A., Ferreira da Rocha P.S.C., Baccarini P.J., Aylett M., Krijger G.C. et Williams L.E.** (2005). The plant P1B-type ATPase AtHMA4 transports Zn and Cd and plays a role in detoxification of transition metals supplied at elevated levels. *FEBS Letters* 579, 783-791.
- Milner M.J. et Kochian L.V.** (2008). Investigating heavy-metal hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a model system. *Annals of Botany* 102, 3-13.
- Mingorance M.D, Valdes B. et Oliva S.R.** (2007). Strategies of heavy metal uptake by plants growing under industrial emissions. *Environment International* 33, 514-520.
- Ministère de l'écologie, de l'énergie, du développement durable et de la mer.** Arrêté du 8 Janvier 1998 fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles, pris en application du décret n° 97-1133 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées. Teneurs limites en éléments traces dans les boues et les sols.
- Minocha R. et Long S.** (2004). Effects of aluminum on organic acid metabolism and secretion by red spruce cell suspension cultures and the reversal of Al effects on growth and polyamine metabolism by exogenous organic acids. *Tree Physiology* 24, 55-64.
- Mira H., Martínez-García F. et Peñarrubia L.** (2001). Evidence for the plant-specific intercellular transport of the Arabidopsis copper chaperone CCH. *The Plant Journal* 25(5), 521-528.
- Mishra V. et Tadepalli S.** (2015). Biosorption of toxic heavy metals on sawdust. *Clean – Soil, Air, Water* 43, 360-367.
- Miyasaka S.C., Buta J.G., Howell R.K. et Foy C.D.** (1991). Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans: root exudation of citric acid. *Plant Physiology* 96, 737-743.
- Mizuno T., Hirano K., Kato S., Obata H.** (2008). Cloning of ZIP family metal transporter genes from the manganese hyperaccumulator plant *Chengiopanax sciadophylloides*, and its metal transport and resistance abilities in yeast. *Soil Science and Plant Nutrition* 54, 86-94.
- Mohnen D.** (1999). Biosynthesis of pectins and galactomannans. *In: Comprehensive natural products chemistry*, volume 3, carbohydrates and their derivatives including tannins, cellulose, and related lignins. Pinto B.M. (Ed), Elsevier, Oxford, pp 497-527.
- Mohnen D.** (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 266-277.
- Mollet J.C.** (2006). La paroi primaire végétale. Habilitation à Diriger les Recherches, Université d'Artois.
- Montanari U.** (2015). Synthesis of lignin star model compounds and their dehydrogenation polymer growth study. Organic chemistry laboratory, Departement of chemistry, Faculty of sciences, Helsinki University.

- Montillet J.L., Chamnongpol S., Rustérucci C., Dat J., Van de Cotte B., Agnel J.P, Battesti C., Inzé D., Van Breusegem F. et Triantaphylidès C.** (2005). Fatty acid hydroperoxides and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiology* 138, 1516-1526.
- Montreuil J., Spik G., Chosson A., Segard E. et Scheppeler N.** (1963). Methods of study of the structure of glycoproteins. *Journal de Pharmacie de Belgique* 18, 529-546.
- Montreuil J., Bouquelet S., Debray H., Fournet B., Spik G. et Strecker G.** (1986). Glycoproteins. *In: Carbohydrate analysis, a practical approach.* Chaplin M.F. et Kennedy J.F. (Eds), IRL Press, Oxford, Washington, pp 143-204.
- Moreira L.R.S. et Filho E.X.F.** (2008). An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79, 165-178.
- Morel J.L., Mench M., et Guckert A.** (1986). Measurement of Pb, Cu and Cd Binding with Mucilage Exudates from Maize (*Zea mays* L.) Roots. *Biology and Fertility of Soils* 2, 29-34.
- Moreno Pires A.M., Marchi G., Mattiazzo M.E. et Guimarães Guilherme L.R.** (2007). Organic acids in the rhizosphere and phytoavailability of sewage sludge-borne trace elements. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 42, 917-924.
- Morgan J.M.** (1984). Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Review of plant Physiology* 35, 299-319.
- Mortvedt J.J.** (1996). Heavy metal contaminants in inorganic and organic fertilizers. *Fertilizer Research* 43, 55-61.
- Moussavou Moudouma C.F.** (2010). Etude des mécanismes d'accumulation du cadmium chez *Arabidopsis thaliana* (écotype Wassilewskija) et chez un mélèze hybride (*Larix x eurolepis*) par des approches moléculaires et développementale. Thèse n°14-2010, Université de Limoges, Faculté des Sciences et Techniques.
- Moussavou Moudouma C.F., Gloaguen V., Riou C., Forestier L. et Saladin G.** (2012). High concentration of cadmium induces AtPCS2 gene expression in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh ecotype Wassilewskija seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* 34 (3), 1083-1091.
- Moussavou Moudouma C.F., Riou C., Gloaguen V. et Saladin G.** (2013). Hybrid larch (*Larix x eurolepis* Henry): a good candidate for cadmium phytoremediation? *Environmental Science and Pollution Research* 20, 1889-1894.
- Moustacas A.M., Nari J., M. Borel M., Noat G. et Ricard J.** (1991). Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension. The role of metal ions in plant cell-wall extension. *Biochemistry Journal* 279, 351-354.
- Mullen M.D., Wolf D.C., Beveridg T.J. et Bailey G.W.** (1992). Sorption of heavy metals by soil fungi *Aspergillus niger* and *Mucor ruoxilii*. *Soil Biology and Biochemistry* 24, 129-145.
- Muratova A., Lyubun Y., German K. et Turkovskaya O.** (2015). Effect of cadmium stress and inoculation with a heavy-metal-resistant bacterium on the growth and enzyme activity of *Sorghum bicolor*. *Environmental Science and Pollution Research* 22 (20), 16098-16109.
- Muschitz A., Faugeron F. et Morvan H.** (2009). Response of cultured tomato cells subjected to excess zinc: role of cell wall in zinc compartmentation. *Acta Physiologiae Plantarum* 31, 1197-1204.
- Muschitz A., Riou C., Mollet J.C., Gloaguen V. et Faugeron C.** (2015). Modifications of cell wall pectin in tomato cell suspension in response to cadmium and zinc. *Acta Physiologiae Plantarum* 37 (245), 11 pages.

-N-

**Nabors M.W.** (2008). Biologie végétale : structures, fonctionnement, écologie et biotechnologies. Pearson Education, 614 p.

- Nagajyoti P.C., Lee K.D. et Sreekanth T.V.M.** (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* 8, 199-216.
- Nagata T., Iizumi S., Satoh K. et Kikuchi S.** (2008). Comparative molecular biological analysis of membrane transport genes in organisms. *Plant Molecular Biology* 66, 565-585.
- Nari J., Noat G., Diamantidis G., Woudstra M. et Ricard L.** (1986). Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. 3. Interplay between limited cell-wall autolysis, pectin methyl esterase activity and electrostatic effects in soybean cell walls. *European Journal of Biochemistry* 155, 199-202.
- Nari J., Noat G. et Ricard J.** (1991). Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension. Hydrolysis of pectin by plant cell-wall pectin methylesterase. *Biochemical Journal* 279, 343-350.
- Navrot N., Rouhier N., Gelhaye E. et J.P. Jaquot J.P.** (2007). Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* 129, 185-195.
- Nelson N.** (1999). Metal ion transporters and homeostasis. *EMBO Journal* 18 (16), 4361-4371.
- Nevo Y. et Nelson N.** (2006). The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763, 609-620.
- Nijse J., Van der Heijden G.W.A.M., Van Ieperen W., Keijzer C.J. et Van Meeteren U.** (2001). Xylem hydraulic conductivity related to conduit dimensions along chrysanthemum stems. *Journal of Experimental Botany* 52, p319-327.
- Nishizono H., Ichikawa H., Suzuki S. et Ishii F.** (1987). The role of the root cell wall in the heavy metal tolerance of *Athyrium yokoscense*. *Plant and Soil* 101, 15-20.
- Noctor G., Arisi A.C.M., Jouanin L., Kunert K.J., Rennenberg H. et Foyer C.H.** (1998). Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany* 49 (321), 623-647,
- Noctor G., Gomez L., Vanacker H. et Foyer C.H.** (2002). Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *Journal of Experimental Botany* 53, 1283-1304.
- Nordberg G.F., Nogawa K., Nordberg M. et Friberg L.T.** (2007). Cadmium. In: Handbook of Toxicology of Metals. Troisième édition. Nordberg G.F., Fowler B.A., Nordberg M. et Friberg L. (Ed.), Elsevier Publishers, Amsterdam, pp 445-480.
- Novozamsky I., Lexmond T.H.M. et Houba V.J.G.** (1993). A single extraction procedure of soil for evaluation of uptake of some heavy metals by plants. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 51, 47-58.
- Nowak C., J. R. Mossmann J.R., et Saada A.** (2003). État des connaissances sur l'atténuation naturelle : mécanismes et mise en œuvre. BRGM/RP-51960- FR. Étude réalisée dans le cadre des actions de Service public du BRGM 2001-01POL-318.
- Nriagu J.O.** (1989). A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature* 338, 47-49.
- Nzihou A. et Stanmore B.** (2013). The fate of heavy metals during combustion and gasification of contaminated biomass - A brief review. *Journal of Hazardous Materials* 256-257, 56-66.

-O-

- O'Brien I.E.W., Smith D.R., Gardner R.C. et Murray B.G.** (1996). Flow cytometric determination of genome size in *Pinus*. *Plant Science* 115, 91-99.
- O'Neill M.A., Warrenfeltz D., Kates K., Pellerin P., Doci T., Darvill A.G. et Albersheim P.** (1996). Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently-linked by a borate ester. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 22923-22930.

- O'Neill M.A. et York W.S.** (2003). The composition and structure of plant primary cell walls. *In: The plant Cell Wall*. Rose J.K.C. (Ed), CRC Press, pp 1-54.
- O'Neill M.A., Ishii T., Albersheim P. et Darvill A.G.** (2004). Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annual Review of Plant Biology* 55, 109-139.
- O'Neil M., York W.S. et Hahn M.G.** (2010). A comprehensive toolkit of plant cell wall glycan-directed monoclonal antibodies. *Plant Physiology* 153, 514-525.
- Olaniran A.O., Balgobind B. et Pillay B.** (2013). Bioavailability of heavy metals in soil: impact on microbial biodegradation of organic compounds and possible improvement strategies. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 10197-10228.
- Oliveira H., Barros A.S., Delgado I., Coimbra M.A. et Santos C.** (2009). Effects of fungus inoculation and salt stress on physiology and biochemistry of in vitro grapevines: emphasis on sugar composition changes by FT-IR analyses. *Environmental and Experimental Botany* 65, 1-10.
- Orchard B.J., Doucette W.J., Chard J.K. et Bugbee B.** (2000). Uptake of Trichloroethylene by hybrid poplar trees grown hydroponically in flow-through plant growth chambers. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 895-903.
- Origo N., Wicherek S. et Hotyat M.** (2012). Réhabilitation des sites pollués par phytoremédiation. *VertigO* 12, 2.
- Orlandi M., Pelfini M., Pavan M., Santilli M. et Colombini M.P.** (2002). Heavy metals variations in some conifers in Valle d'Aosta (Western Italian Alps) from 1930 to 2000. *Microchemical Journal* 73, 237-244.
- Ortiz D.F., Ruscitti T., McCue K.F. et Ow D.W.** (1995). Transport of Metal-binding Peptides by HMT1, A Fission Yeast ABC-type Vacuolar Membrane Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (9), 4721-4728.
- Osawa H., Ikeda S. et Tange T.** (2013). The rapid accumulation of aluminum is ubiquitous in both the evergreen and deciduous leaves of Theaceae and Ternstroemiaceae plants over a wide pH range in acidic soils. *Plant and Soil* 363, 49-59.
- Österås A.H. et Greger M.** (2006). Interactions between calcium and copper or cadmium in Norway spruce. *Biologia Plantarum* 50 (4), 647-652.
- Otani T., Ae N. et Tanaka H.** (1996). P uptake mechanisms of cropgrown in soils with low status. II. Significance of organic acids in root exudates of pigeonpea. *Soil Science and Plant Nutrition* 42, 533-560.
- Ouariti O., Gouia H. et Ghorbel M.H.** (1997). Responses of bean and tomato plants to cadmium: growth, mineral nutrition and nitrate reduction. *Plant Physiology and Biochemistry* 35, 347-354.
- Ouerdane L., Mari S., Czernic P., Lebrun M. et Łobiński R.** (2006). Speciation of non-covalent nickel species in plant tissue extracts by electrospray Q-TOFMS/MS after their isolation by 2D size exclusion-hydrophilic interaction LC (SEC-HILIC) monitored by ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 21, 676-683.
- Ozturk L. et Demir Y.** (2002). *In vivo* and *in vitro* protective role of proline. *Plant Growth Regulation* 38, 259-264.

## -P-

- Padmavathiamma P.K et Li L.Y.** (2007). Phytoremediation Technology: Hyper-accumulation Metals in Plants. *Water, Air and Soil Pollution* 184, 105-126.
- Palmiter R.D.** (1998). The elusive function of metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 8428-8430.

- Palmiter R.D. et Huang L.** (2004). Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 447, 744-751.
- Pan H. et Eberhard T.L.** (2011). Characterization of fly ash from the gasification of wood and assessment for its application as a soil amendment. *BioResources* 6 (4), 3987-4004.
- Pan X., Liu F.C., Chai M.W., Liu L., M., Morita S. et Shi F.C.** (2012). Accumulation, translocation, and subcellular distribution of cadmium in *Spartina alterniflora*. *Chi. Journal of Ecology* 31, 526-531.
- Parent C., Capelli N. et Dat J.** (2008). Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. *Comptes Rendus Biologies* 331, 255-261.
- Park Y.B. et Cosgrove D.J.** (2012). Changes in Cell Wall Biomechanical Properties in the Xyloglucan-Deficient xxt1/xxt2 Mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 158, 465-475.
- Parraga-Aguado I., Querejeta J.I., González-Alcaraz M.N. et Conesa H.M.** (2014). Metal(loid) allocation and nutrient retranslocation in *Pinus halepensis* trees growing on semiarid mine tailings. *The Science of Total Environment* 485-486, 406-414.
- Parrotta L., Guerriero G., Sergeant K., Cai G. et Hausman J.F.** (2015). Target or barrier? The cell wall of early- and later-diverging plants vs cadmium toxicity: differences in the response mechanisms. *Frontiers in Plant Science* 6 (133), 1-16.
- Pascaud P., Leveque T., Soubrand M., Boussem S., Joussein E. et Dumat C.** (2014). Environmental and health risk assessment of Pb, Zn, As and Sb in soccer field soils and sediments from mine tailings: solid speciation and bioaccessibility. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 4254-4264.
- Passardi F., Penel C. et Dunand C.** (2004). Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science* 9, 534-540.
- Passardi F., Cosio C., Penel C. et Dunand C.** (2005). Peroxidases have more functions than a swiss army knife. *Plant Cell Reports* 24, 255-265.
- Pasternak T., Potters G., Caubergs R. et Jansen M.** (2005a). Complementary interactions between oxidative stress and the phytohormone auxin control plant growth responses at plant, organ and cellular level. *Journal of Experimental Botany* 56, 1991-2001.
- Pasternak T., Rudas V., Potters G. et Jansen M.** (2005b). Morphogenic effects of abiotic stress: reorientation of growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 53, 299-314.
- Patel M.J., Patel J.N. et Subramanian R.B.** (2005). Effect of cadmium on growth and the activity of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging enzymes in *Colocassia esculentum*. *Plant and Soil* 273, 183-188.
- Patra M., Bhomik N., Bandopadhyay B. et Sharma A.** (2004). Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 52, 199-223.
- Patthatil S., Avci U., Baldwin D., Swennes A.G., McGill J., Popper Z., Bootten T., Albert A., Davis R.H., Chennareddy C., Dpng R., O'Shea B., Rossi R., Loeff C., Freshour G., Narra R.,**
- Paulsen I.T. et Saier Jr.M.H.** (1997). A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *The Journal of Membrane Biology* 156(2), 99-103.
- Pauly M. et Scheller H.V.** (2000). O-acetylation of plant cell wall polysaccharides: identification and partial characterization of rhamnogalacturonan O-acetyl-transferase from potato suspension cultured cells. *Planta* 210, 659-667.
- Paynel F., Schaumann A., Arkoun M., Douchiche, O. et Morvan C.** (2009). Temporal regulation of cell-wall pectin methyl-esterase and peroxidase isoforms in cadmium-treated flax hypocotyl. *Annals of Botany* 104, 1363-1372.

- Peixoto P.H.P., Cambraia J., Sant Anna R., Mosquim P.R. et Moreira M.A.** (2001). Aluminium effects on fatty acid composition and lipid peroxidation of a purified plasma membrane fraction of root apices of two sorghum cultivars. *Journal of Plant Nutrition* 24, 1061-1070.
- Penarrubia L., Andres-Colas N., Moreno J. et Puig S.** (2010). Regulation of copper transport in *Arabidopsis thaliana*: a biochemical oscillator? *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 15, 29-36.
- Peng H.Y., Yang X. et Tian S.K.** (2005). Accumulation and ultrastructural distribution of copper in *Elsholtzia splendens*. *Journal of Zhejiang University Science* 6B (5), 311-318.
- Peng J., Lai L. et Wang X.** (2008). PRGL: A cell wall proline-rich protein containing GASA domain in *Gerbera hybrida*. *Science in China Series C : Life Sciences* 51 (6), 520-525.
- Pérez S., Rodríguez-Carvajal M.A. et Doco T.** (2003). A complex plant cell wall polysaccharide : rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie* 85, 109-121.
- Perron M.** (2006). Le mélèze hybride et la sylviculture intensive des résineux : parce que le temps c'est de l'argent ! Colloque « La ligniculture : une solution d'avenir », Estrie (Qc), 23-24 Mars 2006.
- Perrone P., Hewage C.M., Thomson A.R., Bailey K., Sadler I.H. et Fry S.C.** (2002). Patterns of methyl and O-acetyl esterification in spinach pectins: new complexity. *Phytochemistry* 60, 67-77.
- Perrono P.** (1999). Les micropolluants métalliques des boues de stations d'épuration urbaine et l'épandage agricole. Mémoire. D.U.E.S.S., D.E.P. Université Picardie, Amiens.
- Persans M.W., Yan X., Patnoe J.M., Krämer U., Salt D.E.** (1999). Molecular dissection of the role of histidine in nickel hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense* (Hálácsy). *Plant Physiology* 121, 1117-1126.
- Pétre M.** (2008). Étude de la spéciation des métaux traces dissous en Seine, relation avec le pH et la matière organique dissoute. Université Pierre et Marie Curie, École des Mines de Paris et École Nationale du Génie Rural des Eaux et des Forêts. Laboratoire de Géochimie des eaux, Institut de Physique du Globe de Paris, Paris VII, 49 p.
- Pilipović A., Nikolić N., Orlović S., Petrović N. et Krstić B.** (2005). Cadmium phytoextraction potential of poplar clones (*Populus* spp.). *Zeitschrift für Naturforschung C* 60 (3-4), 247-251.
- Pilon M., Cohu C.M., Ravet K., Abdel-Ghany S.E. et Gaymard F.** (2009). Essential transition metal homeostasis in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12 (3), 347-357.
- Pilon-Smits E. et Pilon M.** (2002). Phytoremediation of metals using transgenic plants. *Critical Reviews on Plant Sciences* 21 (5), 439-456
- Pilon-Smits E.A.H.** (2005). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* 56, 15-39.
- Pineros M.A. et Kochian L.V.** (2001). A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize. Identification and characterization of Al31-induced anion channels. *Plant Physiology* 125, 292-305.
- Pittman J.K., Shigaki T. et Hirschi K.D.** (2005). Evidence of differential pH regulation of the *Arabidopsis* vacuolar Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters CAX1 and CAX2. *FEBS Letters* 579, 2648-2656.
- Poschenrieder C. et Barceló J.** (2004). Water relations in heavy metal stressed plants. In: Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems. Seconde édition. Prasad M.N.V. (Ed), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp 249-270.
- Potters G., Pasternak T.P., Guisez Y., Palme K.J. et Jansen M.A.K.** (2007). Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *TRENDS in Plant Science* 12, 98-105.
- Potters G., Pasternak T.P., Guisez Y. et Jansen M.A.K.** (2009). Different stresses, similar morphogenic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant Cell and Environment* 32, 158-169.

- Poulin R., Coward J.K., Lakanen J.R. et Pegg A.E.** (1993). Enhancement of the spermidine uptake system and lethal effects of spermidine overaccumulation in ornithine decarboxylase-overproducing L1210 cells under hyposmotic stress. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 4690-4698.
- Pourrut B., Perchet G., Silvestre J., Cecchi M., Guirese M. et Pinelli E.** (2008). Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots. *Journal of Plant Physiology* 165, 571-579
- Pourrut B., Shahid M., Dumat C., Winterton P. et Pinelli E.** (2011). Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 213, 113-36.
- Prasad M.N.V. et Hagemeyer J.** (1999). Heavy metal stress in plants - From molecules to ecosystems. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, New York, 401 p.
- Prasad M.N.V., Greger M. et Landberg T.** (2001). *Acacia nilotica* L. bark removes toxic metals from solution: corroboration from toxicity bioassay using *Salix viminalis* L. in hydroponic system. *International Journal of Phytoremediation* 3, 289-300.
- Prasad M.N.V.** (2003). Phytoremediation of metal-polluted ecosystems: hype for commercialization. *Russian Journal of Plant Physiology* 50, 686-700.
- Prasad M.N.V. et Freitas H.M.D.** (2003). Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology* 6, 285-321.
- Prasad M.N.V.** (2004). Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems. Seconde edition. Springer (Ed), 462 p.
- Prasad M.N.V.** (2005). Nickelophilous plants and their significance in phytotechnologies. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17(1), 113-128.
- Pratas J., Prasad M.N.V., Freitas H. et Conde L.** (2005). Plants growing in abandoned mines of Portugal are useful for biogeochemical exploration of arsenic, antimony, tungsten and mine reclamation. *Journal of Geochemical Exploration* 85, 99-107.
- Pretsch E., Buhlmann P. et Badertscher M.** (2009). Structure Determination of Organic Compounds - Tables of Spectral Data. Springer (Ed), 443 p.
- Prince W.S.P.M., Senthil Kumar P. et Subburam V.** (2001). Mulberry- silkworm food chain – a templet to assess heavy metal mobility in terrestrial ecosystems. *Environmental Monitoring and Assessment* 69, 231-238.
- Puig S., Mira H., Dorcey E., Sancenon V., Andres-Colas N., Garcia-Molina A., Burkhead J.L., Gogolin K.A., Abdel-Ghany S.E., Thiele D.J., Ecker J.R., Pilon M. et Penarrubia L.** (2007). Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354, 385-390.
- Pulford I.D et Watson C.** (2003). Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees - a review. *Environment International* 29, 529-540.
- Punz W.F. et Sieghardt H.** (1993). The response of roots of herbaceous plant species to heavy metals. *Environmental and Experimental Botany* 33, 85-98.

## -R-

- Rabier J., Laffont-Schwob I., Bouraïma-Madjebi S., Leon V., Prudent P., Viano J., Nabors M.W. et Pilon-Smits E.A.H.** (2007). Characterization of metal tolerance and accumulation in *Grevillea exul* var *exul*. *International Journal of Phytoremediation* 9, 419-435.
- Radotic K., Ducic T. et Mutavdic D.** (2000). Changes in peroxidase activity and isoenzymes in spruce needles after exposure to different concentrations of cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 44, 105-113.

- Rafati M., Khorasani N., Moattar F., Shirvany A., Moraghebi F. et Hosseinzadeh S.** (2011). Phytoremediation potential of *Populus alba* and *Morus alba* for cadmium, chromium and nickel absorption from polluted soil. *International Journal of Environmental Research* 5, 961-970.
- Rai V.K.** (2002). Role of amino acids in plant responses to stresses. *Biologia Plantarum* 45 (4), 481-487.
- Ralet M.C. et Thibault J.F.** (2002). Interchain heterogeneity of enzymatically deesterified lime pectins. *Biomacromolecules* 3 (5), 917-925.
- Ralet M.C, Tranquet O., Poulain D, Moise A. et Guillon F.** (2010). Monoclonal antibodies to rhamnogalacturonan I backbone. *Planta* 231, 1373-1383.
- Rascio N.** (1977). Metal accumulation by some plants growing on zinc-mine deposits. *Oikos* 29, 250-253.
- 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, 169-181.
- Raskin I., Kumar P.B.A.N., Dushenkov S. et Salt D.** (1994). Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinion in Biotechnology* 5, 285-290.
- Raskin I. et Ensley B.D.** (2000). Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment. Wiley & Sons, Inc., New York, pp 53-70.
- Rastgoo L., Alemzadeh A. et Afsharifar A.** (2011). Isolation of two novel isoforms encoding zinc- and copper-transporting P1B-ATPase from Gouan (*Aeluropus littoralis*). *Plant Omics Journal* 4 (7), 377-383.
- Rausser W.E.** (1999). Structure and function of metal chelators produced by plants. The case of organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins. *Cell Biochemistry and Biophysics* 31, 19-48.
- Ravanat G. et Rinaudo M.** (1980). Investigation on oligo- and polygalacturonic acids by potentiometry and circular dichroism. *Biopolymers* 19, 2209-2222.
- Rea P.A., Li Z.S., Lu Y.P. et Drozdowicz Y.M.** (1998). From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, 727-760.
- Rea P.A.** (1999). MRP subfamily ABC transporters from plants and yeast. *Journal of Experimental Botany* 50, 895-913.
- Redjala T., Sterckeman T., Morel J.L.** (2009). Influence of plant cadmium content on root cadmium uptake. The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI, 1-8.
- Reeves R.D.** (1992). The hyperaccumulation of nickel by serpentine plants. *In: The vegetation of ultramafic (serpentine) soils. Proceedings of the First International Conference on Serpentine Ecology.* Baker A.J.M., Proctor J. et Reeves R.D. (Eds), Andover Intercept, pp 253-277.
- Reeves R.D., Baker A.J.M., Borhidi A. et Berazaín R.** (1999). Nickel hyperaccumulation in the serpentine flora of Cuba. *Annals of Botany* 83, 29-38.
- Reeves R.D. et Baker A.J.M.** (2000). Metal-accumulating plants. *In: Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean-up the environment.* Raskin I. et Ensley B.D. (Eds), Wiley & Sons, New York, pp 193-230.
- Reeves R.D.** (2006). Hyperaccumulation of trace elements by plants. *In: Phytoremediation of metal-contaminated soils, NATO Science Series IV Earth and Environmental Sciences.* Morel J.L., Echevarria G. et Goncharova N. (Eds), Springer, New York, pp 1-25.
- Reis D. et Vian B.** (2004). Helicoidal pattern in secondary cell walls and possible role of xylans in their construction. *Comptes Rendus Biologies* 327 (9-10), 785-790.
- Rejeb K.B., Abdelly C. et Saviouré A.** (2014). How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiology and Biochemistry* 80, 278-284.



- Rellan-Alvarez R., Abadi a J. et Alvarez-Fern andez A.** (2008). Formation of metal-nicotianamine complexes as affected by pH, ligand exchange with citrate and metal exchange. A study by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22, 1553-1562.
- Renella G., Landi L. et Nannipieni P.** (2004). Degradation of low molecular weight organic acids complexed with heavy metals in soil. *Geoderma* 122, 311-315.
- Rengel Z.** (1997). Mechanisms of Environmental Stress Resistance in Plants. Basra A.S. et Basra R.K. (Eds), Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp 241-276.
- Revy P.S., Jondreville C., Dourmand J.Y. et Nys Y.** (2003). Le zinc dans l'alimentation du porc : oligo-élément essentiel et risque potentiel pour l'environnement. *INRA Productions Animales* 16 (1), 3-18.
- Reyes F. et Orellana A.** (2008). Golgi transporters: opening the gate to cell wall polysaccharide biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 244-251.
- Richard L., Qin L.X et Goldberg R.** (1996). Clustered genes within the genome of *Arabidopsis thaliana* encoding pectin methylesterase-like enzymes. *Gene* 170, 207-211.
- Richer de Forges A., Feller C., Jamagne M. et Arrouays D.** (2008). Perdus dans les triangles des textures. * tude et Gestion des Sols* 15 (2), 97-111.
- Ridley B.L., O'Neill M.A. et Mohnen D.** (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57, 929-967.
- Ringli C., Keller B. et Ryser U.** (2001). Glycine-rich proteins as structural components of plant cell walls. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 1430-1441.
- Riou-Nivert P.** (2001). Les guides du sylviculteur : Le mélèze. Institut pour le développement forestier (IDF), Paris, Forêt privée francaise, 144 p.
- Robert D. et Roland J.C.** (1998). Biologie végétale, volume 1, Organisation cellulaire. Doin (Ed), Paris, 367 p.
- Robert M. et Juste C.** (1997). Stocks et flux d'éléments traces dans les sols du territoire. *In: Aspects sanitaires et environnementaux de l'épandage agricole des boues d'épuration urbaines.* ADEME, Journées techniques des 5 et 6 Juin 1997. ADEME (Ed), 320 p.
- Robert M. et Juste C.** (1999). Dynamique des éléments traces de l'écosystème sol. *Club CRIN Environnement et Ministère de l'environnement.* Spéciation des métaux dans le sol. Paris.
- Robinson B.H., Mills T.M., Petit D., Fung L.E., Green S.R. et Clothier B.E.** (2000). Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: implications for phytoremediation. *Plant and Soil* 227, 301-306.
- Robinson A.R., Ukrainetz N.K., Kang K.Y. et Mansfield S.D.** (2007). Metabolite profiling of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) field trials reveals strong environmental and weak genetic variation. *New Phytologist* 174 (4), 762-773.
- Rodrigo M.A.M., Cernei N., Kominkova M., Zitka O., Beklova M., Zehnalek J., Kizek R. et Adam V.** (2013). Ion Exchange Chromatography and Mass Spectrometric Methods for Analysis of Cadmium-Phytochelatin (II) Complexes. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10 (4), 1304-1311.
- Rodríguez-Carvajal M.A., Hervé du Penhoat C., Mazeau K., Doco T. et Perez S.** (2003). The three-dimensional structure of the mega-oligosaccharide rhamnogalacturonan II monomer: a combined molecular modelling and NMR investigation. *Carbohydrate Research* 338, 651-671.
- Rodríguez-Serrano M., Romero-Puertas M.C., Pazmi o D.M., Testillano P.S., Risue o M.C., Del Río L.A. et Sandalio L.M.** (2009). Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Physiology* 150, 229-243.

- Rollin C. et Quiot F.** (2006). Éléments traces métalliques : Guide méthodologique, Recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines. INERIS, Rapport d'études INERIS-DRC-06-66246/DESP-R01a ([www.ineris.fr/index.php?module=doc&action=getFile&id=2712](http://www.ineris.fr/index.php?module=doc&action=getFile&id=2712)).
- Ros Barceló A., Morales M. et Pedreño M.A.** (1998). Specific compartmentalization of peroxidase isoenzymes in relation to lignin biosynthesis in the plant cell. *In: Lignin and lignan biosynthesis*. Lewis N.G. et Sarkanen S. (Eds), American Chemical Society, Washington, DC, pp 84-95.
- Rotkittikhun P., Kruatrachue M. Chaiyarat R., Ngernsansaruay C., Pokethitiyook P., Paijitprapaporn A. et Baker A.J.M.** (2006). Uptake and accumulation of lead by plants from the Bo Ngam lead mine area in Thailand. *Environmental Pollution* 144, 681-688.
- Rubio M.I, Escrig I., Martinez-Cortina C., Lopez-Benet F.J. et Sanz A.** (1994). Cadmium and nickel accumulation in rice plants. Effects on mineral nutrition and possible interactions of abscisic and gibberellic acids. *Plant Growth Regulation* 14, 151-157.
- Rucinska R., Waplak S. et Gwózdź E.A.** (1999). Free radical formation and activity of antioxidant enzymes in lupin roots exposed to lead. *Plant Physiology and Biochemistry* 37, 187-194.
- Rudolph A.S., Crowe J.H. et Crowe L.M.** (1986). Effects of three stabilizing agents - proline, betaine, and trehalose - on membrane phospholipids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 245(1), 134-143.
- Rudolph J.** (2011). La reconversion de friches industrielles et la dépollution des sols contaminés. La phytoremédiation - une technique «écologique» alternative aux techniques conventionnelles? Ecole Nationale Supérieure d'Architecture de Lyon. Formation continue QEB 2010/11 – mémoire de fin de formation.
- Rugh C.L., Wilde H.D., Stack N.M., Thompson D.M., Summers A.O. et Meagher R.B.** (1996). Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial merA gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 3182-3187.
- Rugh C.L., Senecoff J.F., Meagher R.B et Merkle S.A.** (1998). Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. *Nature Biotechnology* 16, 925-928.
- Ryser U.** (2003). Protoxylem: the deposition of a network containing glycine-rich cell wall proteins starts in the cell corners in close association with the pectins of the middle lamella. *Planta* 216, 854-864.

## -S-

- Saarela K.E., Harju L., Rajander J., Lill J.O., Heselius S.J., Lindroos A. et Mattsson K.** (2005). Elemental analyses of pine bark and wood in an environmental study. *Science of the Total Environment* 343, 231-241.
- Sachetto-Martins G., Franco L.O. et de Oliveira D.E.** (2000). Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? *Biochimica and Biophysica Acta* 1492, 1-14.
- Sadak M.S.H., Abdelhamid M.T. et Schmidhalter U.** (2015). Effect of foliar application of amino acids on plant yield and some physiological parameters in bean plants irrigated with seawater. *Acta Biologica Colombiana* 20 (1), 141-152.
- Sagner S., Kneer R., Wanner G., Cosson J.P., Deus-Neumann B. et Zenk M.H.** (1998). Hyperaccumulation, complexation and distribution of Nickel in *Sebertia acuminata*. *Phytochemistry* 47 (3), 339-347.
- Saha B.C.** (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30, 279-291.

- Sahi S.V., Bryant N.L., Sharma N.C. et Singh S.R.** (2002). Characterization of a Lead hyperaccumulator shrub, *Sesbania drummondii*. *Environmental Science and Technology* 36, 4676-4680.
- Sairam R.K., Srivastava G.C. et Saxena D.C.** (2000). Increased antioxidant activity under elevated temperature: a mechanism of heat stress tolerance in wheat genotypes. *Biologia Plantarum* 43, 245-251.
- Saladin G., Magné C. et Clément C.** (2003a). Effects of Flumioxazin herbicide on carbon nutrition of *Vitis vinifera* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 4017-4022.
- Saladin G., Magné C. et Clément C.** (2003b). Stress effects of Flumioxazin herbicide on grapevine (*Vitis vinifera* L.) grown in vitro. *Plant Cell Reports* 21, 1221-1227.
- Saladin G., Magné C. et Clément C.** (2003c). Impact of flumioxazin herbicide on growth and carbohydrate physiology in *Vitis vinifera* L. *Plant Cell Reports* 21, 821-827.
- Saladin G.** (2015). Phytoextraction of heavy metals: the potential efficiency of conifers. In: Heavy metal contamination of soils: monitoring and remediation. Soil Biology 44. Sherrameti I. et Varma A. (Eds), Springer, Switzerland, pp 333-353.
- Salim R., Al-Subu M.M., Douleh A. et Khalaf S.** (1992). Effects on growth and uptake of broad beans (*Vicia fabae* L.) by root and foliar treatments of plant with lead and cadmium. *Journal of Environmental Science and Health Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology* 27 (7), 1619-1642.
- Salt D.E. et Wagner G.J.** (1993). Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a  $Cd^{2+} / H^{+}$  antiport activity. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 12297-12302.
- Salt D.E. et Rauser W.E.** (1995). MgATP-dependent transport of phytochelatin across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiology* 107 (4), 1293-1301.
- Salt D.E., Prince R.C., Ingrid J. Pickering I.J. et Raskin I.** (1995). Mechanisms of Cadmium Mobility and Accumulation in Indian Mustard. *Plant Physiology* 109, 1427-1433.
- Salt D.E., Smith R.D., Raskin I.** (1998). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, 643-668.
- Salt D.E., Prince R.C., Baker A.J.M., Raskin I. et Pickering I.J.** (1999). Zinc ligands in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy. *Environmental Science and Technology* 33, 713-717.
- Sancenón V., Puig S., Mira H., Thiele D.J. et Peñarrubia L.** (2003). Identification of copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 51, 577-587.
- Sandalio L.M., Dalurzo H.C., Gómez M., Romero-Puertas M.C. et del Río L.A.** (2001). Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany* 52, 2115-2126.
- Sarma H.** (2011). Metal hyperaccumulation in plants: A review focusing on phytoremediation technology. *Journal of Environment Science and Technology* 4, 18-138.
- Sarret G., Saumitou-Laprade P., Bert V., Proux O., Hazemann J.L., Traverse A., Marcus M.A. et Manceau A.** (2002). Forms of Zinc accumulated in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiology* 130, 1815-1826.
- Satofuka H., Fukui T., Takagi M., Atomi H. et Imanaka T.** (2001). Metal-binding properties of phytochelatin-related peptides. *Journal of Inorganic Biochemistry* 86, 595-602.
- Scheller H.V. et Ulvskov P.** (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology* 61, 263- 289.
- Schmidke I., Kruger C., Frommichen R., Scholz G. et Stephan U.** (1999). Phloem loading and transport characteristics of iron in interaction with plant- endogenous ligands in castor bean seedlings. *Physiologia Plantarum* 106, 82-89.

- Schmohl N., Pilling J., Fisahn J. et Horst W.J.** (2000). Pectin methylesterase modulates aluminium sensitivity in *Zea mays* and *Solanum tuberosum*. *Physiologia Plantarum* 109, 419-427
- Schröder P., Fisher C., Debus R. et Wenzel A.** (2003). Reaction of detoxification mechanisms in suspension cultured spruce cells (*Picea abies* L. Karst.) to heavy metals in pure mixture and in soil eluates. *Environmental Science and Pollution Research* 10 (4), 225-234.
- Schuler M. et Bauer P.** (2011). Heavy Metals Need Assistance: The Contribution of Nicotianamine to Metal Circulation Throughout the Plant and the *Arabidopsis* NAS Gene Family. *Frontiers in Plant Science* 2 (69), 1-5.
- Schützendübel A. et Polle A.** (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* 53, 1351-1365.
- Schützendübel A., Schwanz P., Teichmann T., Gross K., Langenfeld-Heyser R., Godbold D.L. et Polle A.** (2001) Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiology* 127, 887-898.
- Sękara A., Poniedziałek M., Ciura J. et Jędrszczyk E.** (2005). Cadmium and lead accumulation and distribution in the organs of nine crops: implications for phytoremediation. *Polish Journal of Environmental Studies* 14 (4), 509-516.
- Selvendran R. R. et O'Neill M. A.** (1987). Isolation and analysis of cell walls from plant material. *Methods of Biochemical Analysis* 32, 25-153.
- Sénéchal F., Wattier C., Rustérucchi C. et Pelloux J.** (2014). Homogalacturonan-modifying enzymes: structure, expression, and roles in plants. *Journal of Experimental Botany* 65(18), 5125-5160.
- SEPA** (State Environmental Protection Administration) (1995). Environmental quality standards for soils. China, GB, 15618-1995.
- SEPA** (State Environmental Protection Administration) (2005) The limits of pollutants in food. China, GB, 2762-2005.
- 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, 523-544.
- Serrano H.C., Pinto M.J., Martins-Loução M.A. et Branquinho C.** (2011). How does an Al-hyperaccumulator plant respond to a natural field gradient of soil phytoavailable Al? *Science of the Total Environment* 409, 3749-3756.
- Sessitsch A., Kuffner M., Kidd P., Vangronsveld J., Wenzel W.W., Fallmann K. et Puschenreiter M.** (2013). The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 60, 182-194.
- Seth C.S.** (2012). A review on mechanisms of plant tolerance and role of transgenic plants in environmental clean-up. *Botanical Review* 78, 32-62.
- Shanker A.K., Cervantes C., Loza-Tavera H. et Avudainayagam S.** (2005). Chromium toxicity in plants. *Environment International* 31, 739-753.
- Sharma S.S., Schat H. et Vooijs R.** (1998). *In vitro* alleviation of heavy metal-induced enzyme inhibition by proline. *Phytochemistry* 46, 1531-1535.
- Sharma P. et Dubey R.S.** (2005). Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 35-52.
- Sharma S.S et Dietz K.J.** (2006). The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *The Journal of Experimental Botany* 57 (4), 711-726.
- Sheoran V., Sheoran A. et Poonia P.** (2011). Role of hyperaccumulators in phytoextraction of metals from contaminated mining sites: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 41, 168-214.

- Shetty K.G., Hetrick B.A.D., Figge D.A.H. et Schwab A.P.** (1994). Effects of mycorrhizae and other soil microbes on revegetation of heavy metal contaminated mine spoil. *Environmental Pollution* 86, 181-188.
- Shevyakova N.I., Il'ina E.N. et Kuznetsov V.V.** (2008). Polyamines increase plant potential for phytoremediation of soils polluted with heavy metals. *Doklady Biological Sciences* 423, 457-460.
- Shi Y.Z., Ruan J.Y, Ma L.F., Han WW.Y. et Wang F.** (2008). Accumulation and distribution of arsenic and cadmium by tea plants. *Journal of Zhejiang University Science B* 9 (3), 265-270.
- Shi S., Richardson A.E., O'Callaghan M., DeAngelis K.M., Jones E.E, Stewart A., Firestone M.K. et Condron L.M.** (2011). Effects of selected root exudate components on soil bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology* 77, 600-610.
- Shi H. et Chan Z.** (2014). Improvement of plant abiotic stress tolerance through modulation of the polyamine pathway. *Journal of Integrative Plant Biology* 56, 114-121.
- Shi G., Su Z., Lu Z., Liu C. et Wang X.** (2014). Relationship between biomass, seed components and seed Cd concentration in various peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars grown on Cd-contaminated soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 110, 174-181.
- Showalter A.M.** (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell* 5, 9- 23.
- Showalter A.M.** (2001). Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 1399-1417.
- Siedlecka A. et Baszynski T.** (1993). Inhibition of electron flow around photosystem I in chloroplasts of Cd-treated maize plants is due to Cd-induced iron deficiency. *Physiologia Plantarum* 87, 199-202.
- Siedlecka A., Wicklund S., Péronne M.A., Micheli F., Lesniewska J., Sethson I., Edlund U., Richard L., Sundberg B. et Mellerowicz E.J.** (2008). Pectin methyl esterase inhibits intrusive and symplastic cell growth in developing wood cell of *Populus*. *Plant Physiology* 146, 554-565.
- Sinegani A.A.S., Tahmasbian I. et Sinegani M.S.** (2015). Chelating agents and heavy metal phytoextraction. In: Heavy metal contamination of soils: monitoring and remediation. Soil Biology 44. Sherameti I. et Varma A. (Eds), Springer, Switzerland, pp 367-393.
- Sirven J.B.** (2006). Détection de métaux lourds dans les sols par spectroscopie d'émission sur plasma induit par laser (LIBS). *Atomic Physics*. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I. HAL Id : tel-00122546.
- Skeffington R.A., Shewry P.R. et Peterson P.J.** (1976). Chromium uptake and transport in barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 132, 209-214.
- Skrebsky E.C., Tabaldi L.A., Pereira L.B., Rauber R., Maldaner J., Cargnelutti D., Gonçalves J.F., Castro G.Y., Shetinger M.R.C et Nicoloso F.T.** (2008). Effect of cadmium on growth, micronutrient concentration, and  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase and acid phosphatase activities in plants of *Pfaffia glomerata*. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 20 (4), 285-294.
- Smith A.T.** (1985). Polyamines. *Annual Review of Plant Physiology* 36, 117-143.
- Smith M.A. et Davis P.J.** (1985). Separation and quantification of polyamines in plant tissue by high performance liquid chromatography of their dansyl derivatives. *Plant Physiology* 78, 89-91.
- Smith E., Juhasz A.L., Weber J. et Naidu R.** (2008). Arsenic uptake and speciation in rice plants grown under greenhouse conditions with arsenic contaminated irrigation water. *Science of the Total Environment* 392, 277-283.
- Smolinska B. et Krol K.** (2012). Leaching of mercury during phytoextraction assisted by EDTA, KI and citric acid. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 87, 1360-1365.
- Smykalova I., Vrbova M., Tejklova E., Vetrovcova M. et Griga M.** (2010). Large scale screening of heavy metal tolerance in flax / linseed (*Linum usitatissimum* L.) tested *in vitro*. *Industrial Crops and Products* 32 (3), 527-533.

- Smykalova I., Vrbova M., Tejklova E., Vetrovcova M. et Griga M.** (2010). Large scale screening of heavy metal tolerance in flax / linseed (*Linum usitatissimum* L.) tested *in vitro*. *Industrial Crops and Products* 32 (3), 527-533.
- Sobkowiak R. et Deckert J.** (2003). Cadmium-induced changes in growth and cell cycle gene expression in suspension-culture cells of soybean. *Plant Physiology and Biochemistry* 41, 767-772.
- Solari L.I., Fulvio Pernice F. et DeJong T.M.** (2006). The relationship of hydraulic conductance to root system characteristics of peach (*Prunus persica*) rootstocks. *Physiologia Plantarum* 128, 324-333.
- Solioz M. et Vulpe C.** (1996). CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends in Biochemical Sciences* 21, 237-241.
- Somerville C.R.** (2006). Cellulose synthesis in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22, 53-78.
- Sommer-Knudsen J., Bacic A. et Clarke A.E.** (1998). Hydroxyproline-rich plant glycoproteins. *Phytochemistry* 47, 483-497.
- Sousa N.R., Ramos M.A., Marques A.P.G.C. et Castro P.M.L.** (2012). The effect of ectomycorrhizal fungi forming symbiosis with *Pinus pinaster* seedlings exposed to cadmium. *Science of the Total Environment* 414, 63-67.
- Sousa N.R., Ramos M.A., Marques A.P.G.C. et Castro P.M.L.** (2014). A genotype dependent-response to cadmium contamination in soil is displayed by *Pinus pinaster* in symbiosis with different mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology* 76, 7-13.
- Stafford H.A. et Lester H.H.** (1980). Procyanidins (condensed tannins) in green cell suspension cultures of Douglas fir compared with those in strawberry and avocado leaves by means of C18-reversed-phase chromatography. *Plant Physiology* 66 (6), 1085-1090.
- Stearns J.C. et Glick B.R.** (2003). Transgenic plants with altered ethylene biosynthesis or perception. *Biotechnology Advances* 21, 193-210.
- Steinnes E. et Friedland A.J.** (2006). Metal contamination of natural surface soils from long-range atmospheric transport: existing and missing knowledge. *Environmental Reviews* 14, 169-186.
- Stephan U.W. et Scholz G.** (1993). Nicotianamine: mediator of transport of iron and heavy metals in the phloem? *Physiologia Plantarum* 88, 522-529.
- Strenstrom I., Damm E et Unestam T.** (1997). Le rôle des mycorhizes dans la protection des arbres forestiers contre les agents pathogènes du sol. *Revue Forestière Française* 49, 121-128.
- Strom L.** (1997). Root exudation of organic acids: importance to nutrient availability and the calcifuge and calcicole behaviour of plants. *Oikos* 80, 459-466.
- Su Y., Han F.X., Chen J., Sridhar B.B.M. et Monts D.L.** (2008). Phytoextraction and accumulation of mercury in three plant species: indian mustard (*Brassica juncea*), beard grass (*Polypogon monspeliensis*), and Chinese brake fern (*Pteris vittata*). *International Journal of Phytoremediation* 10, 547-560.
- Sukalovic V.H.T. et Vuletic M.** (2003). The characterization of peroxidases in mitochondria of maize roots. *Plant Science* 164, 999-1007.
- Sun W., Kieliszewski M.J. et Showalter A.M.** (2004). Overexpression of tomato LeAGP-1 arabinogalactan-protein promotes lateral branching and hampers reproductive development. *Plant Journal* 40, 870- 881.
- Sun Q., Ye Z.H., Wang X.R. et Wong M.H.** (2005). Increase of glutathione in mine population of *Sedum alfredii*: a Zn hyperaccumulator and Pb accumulator. *Phytochemistry* 66, 2549-2556.

- Sun Q., Ye Z.H., Wang X.R. et Wong M.H.** (2007). Cadmium hyperaccumulation leads to an increase of glutathione rather than phytochelatins in the cadmium hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *Journal of Plant Physiology* 164, 1489-1498.
- Sun P., Tian Q.Y., Chen J. et Zhang W.H.** (2010). Aluminum induced inhibition of root elongation in *Arabidopsis* is mediated by ethylene and auxin. *Journal of Experimental Botany* 61, 347-356.
- Sun J., Cui J., Luo C., Gao L., Chen Y. et Shen Z.** (2013). Contribution of cell walls, nonprotein thiols, and organic acids to cadmium resistance in two cabbage varieties. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 64, 243-252.
- Szabados L. et Savouré A.** (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15 (2), 89-97.

## -T-

- Tabuchi A. et Matsumoto H.** (2001). Changes in cell-wall properties of wheat (*Triticum aestivum*) roots during aluminium-induced growth inhibition. *Acta Physiologiae Plantarum* 112, 353-358.
- Takabe K., Takeuchi M., Sato T., Ito M. et Fujita.** (2001). Immunocytochemical localization of enzymes involved in lignification of the cell wall. *Journal of Plant Research* 114, 509-515.
- Takenaka C., Kobayashi M. et Kanaya S.** (2009). Accumulation of cadmium and zinc in *Evodiopanax innovans*. *Environmental Geochemistry and Health* 31, 609-615.
- Talke I.N., Hanikenne M. et Krämer U.** (2006). Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiology* 142, 148-167
- Tan L., Qiu F., Lamport D.T.A. et Kieliszewski M.J.** (2004). Structure of hydroxyproline (Hyp)-arabinogalactan polysaccharide from repetitive Ala-Hyp expressed in transgenic *Nicotiana tabacum*. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 13156-13165.
- Tangahu B.V., Abdullah S. R.S., Basri H., Idris M., Anuar N. et Mukhlisin M.** (2011). A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering*, 2011, 1-31.
- Teyssier C., Mary S., Beaufour M., Grondin C., Delaunay A., Le Metté C., Ader K., Cadene M., Lavel P. et Lelu-Walter M.A.** (2014). In search of markers for somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix × eurolepis*): global DNA methylation and proteomic analyses. *Physiologia Plantarum* 150 (2), 271-291.
- Thangavel P. et Subbhuraam C.** (2004). Phytoextraction: role of hyperaccumulators in metal contaminated soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 70, 109-130.
- Thibault J.F., Renard C.M.G.C., Axelos M.A.V., Roger P. et Crepeau M.J.** (1993). Studies of the length of homogalacturonic region in pectins by acid hydrolysis. *Carbohydrate Research* 238, 271-286.
- Thuleau P., Moreau M., Schroeder J.I. et Ranjeva R.** (1994). Recruitment of plasma membrane voltage-dependent calcium-permeable channels in carrot cells. *EMBO Journal* 13, 5843-5847.
- Tong Y.P., Kneer R. et Zhu Y.G.** (2004). Vacuolar compartmentalization: a second-generation approach to engineering plants for phytoremediation. *Trends in Plant Science* 9, 7-9.
- Trakal L., Martínez-Fernández D., Vítková M. et Komárek M.** (2015). Phytoextraction of metals: modeling root metal uptake and associated processes. In: *Phytoremediation*. Ansari A.A., Gill S.S., Gill R., Lanza G.R. et Newman L. (Eds), Springer International Publishing, pp 69-83.
- Tran T.A. et Popova L.P.** (2013). Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. *Turkish Journal of Botany* 37, 1-13.

- Tremel-Schaub A. et Feix I.** (2005). Sols et transferts. Contamination des sols - Transferts des sols vers les plantes. EDP Sciences et ADEME (Eds), 414 p.
- Tsantrizos Y.S., Kope H.H., Fortin J.A. et Ogilvie K.K.** (1991). Antifungal antibiotics from *Pisolithus tinctorius*. *Phytochemistry* 304, 1113-1118.
- Tsantrizos Y.S., Kope H.H., Fortin J.A. et Ogilvie K.K.** (1991). Antifungal antibiotics from *Pisolithus tinctorius*. *Phytochemistry* 30(4), 1113-1118.
- Tschan M., Robinson B.H. et Schulin R.** (2009). Antimony in the soil - plant system - a review. *Environmental Chemistry* 6, 106-115.
- Tu C. et Ma L.Q.** (2002). Effects of arsenic concentrations and forms on arsenic uptake by the hyperaccumulator ladder brake. *Journal of Environmental Quality* 31, 641-647.
- Tubby I. et Armstrong A.** (2002). Establishment and management of short rotation coppice. Forestry Commission, Edinburgh, Practice Note 7.
- Turner R.G. et Marshall C.** (1972). The accumulation of zinc by subcellular fractions of roots of *Agrostis tenuis* Sibth. in relation to zinc tolerance. *New Phytologist* 71, 671-675.

## -U-

- U.S Environmental Protection Agency (EPA).** (2005). Guidance for developing ecological soil screening levels. Office of solid waste and emergency response, Washington, DC.
- U.S. Geological Survey.** (2013). Mineral commodity summaries 2013. Reston, Virginia (USA), 198 p.
- Ueno D., Ma J.F., Iwashita T.J. et McGrath S.P.** (2005). Identification of the form of Cd in the leaves of a superior Cd accumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens* using Cd-NMR. *Planta* 221, 928-936.
- Unterbrunner R., Puschenreiter M., Sommer P., Wieshammer G., Tlustos P., Zupan M. et Wenzel W.W.** (2007). Heavy metal accumulation in trees growing on contaminated sites in Central Europe. *Environmental Pollution* 148, 107-114.

## -V-

- Van Alebeek G.J. W. M., van Scherpenzeel K., Beldman G., Schols H. A. et Voragen A. G.J.** (2003). Partially esterified oligogalacturonides are the preferred substrates for pectin methylesterase of *Aspergillus niger*. *Biochemical Journal* 372 (1), 211-218.
- Van Assche F. et Clijsters H.** (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell and Environment* 13, 195-206.
- Van de Mortel J.E., Villanueva L.A., Schat H., Kwekkeboom J., Coughlan S., Moerland P.D., Ver Loren van Themaat E., Koornneef M. et Aarts M.G.M.** (2006). Large expression differences in genes for iron and zinc homeostasis, stress response, and lignin biosynthesis distinguish roots of *Arabidopsis thaliana* and the related metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology* 142, 1127-1147.
- Van den Ende W. et Valluru R.** (2009). Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging? *Journal of Experimental Botany* 60 (1), 9-18.
- Van der Ernt A., Baker A.J.M., Reeves R.D, Pollard A.J. et Schat H.** (2012). Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: facts and fiction. *Plant Soil* 362, 319-334.
- Van H.L., Kuraishi S. et Sakurai N.** (1994). Aluminium induced rapid root inhibition and changes in cell wall components of squash seedlings. *Plant Physiology* 106, 971-976.
- Vandecasteele B., Meers E., Veraeke P., De Vos B., Quataert P. et Tack F.M.G.** (2005). Growth and trace metal accumulation of two *Salix* clones on sediment-derived soils with increasing contamination levels. *Chemosphere* 58, 995-1002.



- Vangronsveld J., Herzig R., Weyens N., Boulet J., Adriaensen K., Ruttens A., Thewys T., Vassilev A., Meers E., Nehnevajova E., Van der Lelie D. et Mench, M.** (2009). Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research* 16, 765-794.
- Vassilev A., Tsonev T. et Yordanov I.** (1998). Physiological response of barley plants (*Hordeum vulgare*) to cadmium contamination in soil during ontogenesis. *Environmental Pollution* 103, 287-293.
- Vassilev A., Schwitzguébel J.P., Thewys T., van der Lelie D. et Vangronsveld J.** (2004). The use of plants for remediation of metal-contaminated soils. *The Scientific World Journal* 4, 9-34.
- Vázquez M.D., Poschenrieder C.H. et Barceló J.** (1987). Chromium VI induced structural and ultrastructural changes in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Annals of Botany* 59, 427-438.
- Velma V., Vutukuru S.S. et Tchounwou P.B.** (2009). Ecotoxicology of hexavalent chromium in freshwater fish: a critical review. *Reviews on Environmental Health* 24, 129-145.
- Venkatachalam P., Srivastava A.K., Raghothama K.G. et Sahi S.V.** (2009). Genes Induced in Response to Mercury-Ion-Exposure in Heavy Metal Hyperaccumulator *Sesbania drummondii*. *Environmental Science and Technology* 43, 843-850.
- Verbruggen N., Hermans C. et Schat H.** (2009). Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* 181, 759-776.
- Verherbruggen Y., Marcus S.E., Haeger A., Ordaz-Ortiz J.J et Knox J.P.** (2009). An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. *Carbohydrate Research* 344 (14), 1858-1862.
- Verrier P.J., Bird D., Burla B., Dassa E., Forestier C., Geisler M., Klein M., Kolukisaoglu U., Lee Y., Martinoia E., Murphy A., Rea P.A., Samuels L., Schulz B., Spalding E.J., Yazaki K. et Theodoulou F.L.** (2008). Plant ABC proteins - a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in Plant Science* 13, 151-159.
- Vidakovic M.** (1991). Conifers - morphology and variation. Graficki zavod Hrvatske, Zagreb, Croatie, pp 255-279.
- Vidal S., Doco T., Williams P., Pellerin P., York W.S., O'Neill M.A., Glushka J., Darvill A.G. et Albersheim P.** (2000). Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II: evidence for the backbone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain. *Carbohydrate Research* 326, 277-294.
- Vidal S.M., Malo D., Vogan K., Skamene E. et Gros P.** (1993). Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for beg. *Cell* 73, 469-485.
- Videcoq P.** (2011). Diffusion multi-échelle de Pectine Méthylestérases dans différents systèmes pectiques. Conséquences biochimiques et structurales. Thèse de Doctorat – Université de Nantes.
- Vigil M., Marey-Pérez M.F., Martinez Huerta G. et Álvarez Cabal V.** (2015). Is phytoremediation without biomass valorization sustainable? - Comparative LCA of landfilling vs. anaerobic co-digestion. *The Science of Total Environment* 505, 844-850.
- Visser J. et Voragen A.G.J.** (1996). Progress in Biotechnology, volume 14, Pectins and Pectinases. Elsevier, Amsterdam, pp 941-944.
- Vollhardt K.P.C. et Schore N.E.** (2004). Traité de Chimie Organique. 4ème Edition, Edition De Boeck supérieur, 1297 pages.
- Von Aderkas P., Label P. et Lelu M.A.** (2002a). Charcoal affects early development and hormonal concentrations of somatic embryos of hybrid larch. *Tree Physiology* 22, 431-434.
- Von Aderkas P., Rohr R., Sundberg B., Gutmann M., Dumont-Béboux N. et Lelu M.A.** (2002b). Abscisic acid and its influence on development of the embryonal root cap, storage product and secondary metabolite accumulation in hybrid larch somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69, 111-120.

**Von Wiren N., Klair S., Bansal S., Briat J.F., Khodr H., Shioiri T., Leigh R.A. et Hider R.C.** (1999). Nicotianamine chelates both Fe<sup>III</sup> and Fe<sup>II</sup>. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiology* 119, 1107-1114.

**Vromman D., Flores-Bavestrello A., Šlejkovec Z., Lapaille S., Teixeira-Cardoso C., Briceño M., Kumar M., Martínez J.P. et Lutts S.** (2011). Arsenic accumulation and distribution in relation to young seedling growth in *Atriplex atacamensis* Phil. *Science of the Total Environment* 412-413, 286-295.

## -W-

**Wahsha M., Bini C., Argese E., Minello F., Fontana S. et Wahsheh H.** (2012). Heavy metals accumulation in willows growing on Spolic Technosols from the abandoned Imperina Valley mine in Italy. *Journal of Geochemical Exploration* 123, 19-24.

**Wanat N., Austruy A., Joussein E., Soubrand M., Hitmi A., Gauthier-Moussard C., Lenain J.F., Vernay P., Munch J.C. et Pichon M.** (2013). Potentials of *Miscanthus × giganteus* grown on highly contaminated Technosols. *Journal of Geochemical Exploration* 126-127, 78-84.

**Wanat N., Joussein E., Soubrand M. et Lenain J.F.** (2014). Arsenic (As), antimony (Sb), and lead (Pb) availability from Au-mine Technosols: a case study of transfer to natural vegetation cover in temperate climates. *Environmental Geochemistry and Health* 36, 783-795.

**Wang J., Zhao F.J., Meharg A.A., Raab A., Feldmann J. et McGrath S.P.** (2002). Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. *Plant Physiology* 130, 1552-1561.

**Wang H., Shan X., Wen B., Owens G., Fang J. et Zhang S.** (2007). Effect of indole-3-acetic acid on lead accumulation in maize (*Zea mays* L.) seedlings and the relevant antioxidant response. *Environmental and Experimental Botany* 61, 246-253.

**Wang X., Liu Y., Zeng G., Chai L., Song X., Min Z. et Xiao X.** (2008). Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Beckmannia nivea* (L.) Gaud. *Environmental and Experimental Botany* 62, 389-395.

**Wang X. et Jia Y.** (2010). Study on adsorption and remediation of heavy metals by poplar and larch in contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research* 17, 1331-1338.

**Wang H., Huang J., Liang W., Liang X. et Bi Y.** (2013). Involvement of putrescine and nitric oxide in aluminum tolerance by modulating citrate secretion from roots of red kidney bean. *Plant and Soil* 336 (1), 479-490.

**Wardman P. et Candeias L.P.** (1996). Fenton chemistry: an introduction. *Radiation Research* 145, 523-531.

**Watanabe M., Watanabe Y., Kitaoka S., Utsugi H., Kita K. et Koike T.** (2011). Growth and photosynthetic traits of hybrid larch F1 (*Larix gmelinii* var. japonica × *L. kaempferi*) under elevated CO<sub>2</sub> concentration with low nutrient availability. *Tree Physiology* 31 (9), 965-975.

**Wear J.I. et Evans C.E.** (1968). Relationship of zinc uptake by corn and sorghum to soil zinc measured by three extractants. *Soil Science Society of America Proceedings* 32, 543-546.

**Weber G., von Wiren N. et Hayen H.** (2006). Analysis of iron (II)/iron(III) phytosiderophore complexes by nano-electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20, 973-980.

**Weber T.** (2006). Etude expérimentale et modélisation des modes d'association du fer avec la matière organique naturelle, Université Paris 6, 120 p.

**Weinstein L.H., Kaur-Sawhney R., Rajam M.V., Wettlaufer S.H., Galston A.W. et Galston A.G.** (1986). Cadmium-induced accumulation of putrescine in oat and bean leaves. *Plant Physiology* 82, 641-645.

- Weissenhorn I. et Leyval C.** (1995). Root colonization of maize by a Cd-sensitive and a Cd-tolerant *Glomus mossae* and cadmium uptake in sand culture. *Plant Soil* 175, 223-238.
- Weng B., Xie X., Weiss D.J., Liu J., Lu H. et Yan C.** (2012). *Kandelia obovata* (S., L.) Yong tolerance mechanisms to cadmium: subcellular distribution, chemical forms and thiol pools. *Marine Pollution Bulletin* 64, 2453-2460.
- Wenzel W.W., Bunkowski M., Puschenreiter M. et Horak O.** (2003). Rhizosphere characteristics of indigenously growing nickel hyperaccumulator and excluder plants on serpentine soil. *Environmental Pollution* 123, 131-138.
- White C.N. et Rivin C.J.** (1995). Characterization and Expression of a cDNA Encoding a Seed-Specific Metallothionein in Maize. *Plant Physiology* 108, 831-832.
- Whiting S.N., de Souza M.P. et Terry N.** (2001). Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. *Environmental Science and Technology* 35, 3144-3150.
- Whiting S.N., Reeves R.D., Richards D., Johnson M.S., Cooke J.A., Malaisse F., Paton A., Smith J.A.C., Angle J.S., Chaney R.L., Ginocchio R., Jaffre T., Johns R., McIntyre T., Purvis O.W., Salt D.E., Schat H., Zhao F.J. et Baker A.J.M.** (2004). Research priorities for conservation of metallophyte biodiversity and their potential for restoration and site remediation. *Restoration Ecology* 12, 106-116.
- Willats W.G.T., Orfila C., Limberg G., Buchholt H.C., van Alebeek G.J.W.M., Voragen A.G.J., Marcus S.E., Christensen T.M.I.E., Mikkelsen J.D., Murray B.S. et Knox J.P.** (2001). Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls: implications for pectin methyl esterase action, matrix properties and cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry* 276, 19404-19413.
- Williams L.E, Pittman J.K. et Hall J.L** (2000). Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica and Biophysica Acta-Biomembranes* 1465, 104-126.
- Willscher S., Mirgorodsky D., Jablonski L., Ollivier D., Merten D., Büchel G., Wittig J. et Werner P.** (2013). Field scale phytoremediation experiments on a heavy metal and uranium contaminated site, and further utilization of the plant residues. *Hydrometallurgy* 131-132, 46-53.
- Winandy J.E et Morrell J.J.** (1993). Relationship between incipient decay, trength, and chemical composition of Douglas fir heartwood. *Wood and Fiber Science* 25 (3), 278-288.
- Wintz H., Vulpe C.** (2002). Plant copper chaperones. *Biochemical Society Transactions* 30, 732-735.
- Wojas S., Ruszczynska A., Bulska E., Wojciechowski M. et Antosiewicz D.M.** (2007). Ca<sup>2+</sup>-dependent plant response to Pb<sup>2+</sup> is regulated by LCT1. *Environmental Pollution* 147, 584-592.
- Wu L., Bradshaw A.D. et Thurman D.A.** (1975). The potential for evolution of heavy metal tolerance in plants. III. The rapid evolution of copper tolerance in *Agrostis stolonifera*. *Heredity* 34 (2), 165-187.
- Wu G., Kang., Zhang X., Shao H, Liye Chu L. et Ruan C.** (2010a). A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: Issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities. *Journal of Hazardous Materials* 174, 1-8.
- Wu F., Yang W., Zhang J. et Zhou L.** (2010b). Cadmium accumulation and growth responses of a poplar (*Populus deltoides* x *Populus nigra*) in cadmium contaminated purple soil and alluvial soil. *Journal of Hazardous Materials* 177, 268-273.
- Wu H.L., Chen C.L., Du J., Liu H.F., Cui Y., Zhang Y., He Y.J., Wang Y.Q., Chu C.C., Feng Z.Y., Li J.M. et, Ling H.Q.** (2012). Co-overexpression FIT with AtbHLH38 or AtbHLH39 in *Arabidopsis*-enhanced cadmium tolerance via increased cadmium sequestration in roots and improved iron homeostasis of shoots. *Plant Physiology* 158, 790-800.

**Wuana R.A. et Okieimen F.E.** (2011). Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *International Scholarly Research Network Ecology* 2011, 1-20.

## -X-

**Xu M., Yan R., Zheng C., Qiao Y., Han J. et Sheng C.** (2003). Status of trace element emission in a coal combustion process: a review. *Fuel Processing Technology* 85, 215-237.

**Xu J., Yin H.X. et Li X.** (2009). Protective effects of proline against cadmium toxicity in micro-propagated hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. *Plant Cell Reports* 28, 325-353.

**Xu J., Jia R., Shi G.X., Tian X.L., Yang H.Y. et Xu X.Y.** (2012). Subcellular distribution and phytotoxicity of cadmium in *Alternanthera philoxeroides* leaves. *Journal of Applied Ecology* 23, 1070-1076.

**Xu S.S., Lin S.Z. et Lai Z.X.** (2015). Cadmium impairs iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana* by increasing the polysaccharide contents and the iron-binding capacity of root cell walls. *Plant and Soil* 392, 71-85.

**Xue S.G., Chen Y.X., Reeves R.D., Baker A.J.M., Lin Q. et Fernando D.R.** (2004). Manganese uptake and accumulation by the hyperaccumulator plant *Phytolacca acinosa* Roxb. (Phytolaccaceae). *Environmental Pollution* 131, 393-399.

**Xue S., Wang J., Zhou X., Liu H. et Chen Y.** (2010). A critical reappraisal of *Phytolacca acinosa* Roxb. (Phytolaccaceae) - A manganese-hyperaccumulating plant. *Acta Ecologica Sinica* 30, 335-338.

**Xue K., van Nostrand J.D., Vangronsveld J., Wietters N., Janssen J.O., Kumpiene J., Siebielec G., Galazka R., Giagnoni L., Arenella M., Zhou J.Z. et Renella G.** (2015). Management with willow short rotation coppice increase the functional gene diversity and functional activity of a heavy metal polluted soil. *Chemosphere* 138, 469-477.

## -Y-

**Yadav S.K.** (2010). Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany* 76, 167-179.

**Yadav R., Pooja Arora P., Sandeep Kumar S. et Ashok Chaudhury A.** (2010). Perspectives for genetic engineering of poplars for enhanced phytoremediation abilities. *Ecotoxicology* 19, 1574-1588.

**Yamchi A., Rastgar Jazii F., Ghobadi C., Mousavi A. et Karkhanehee A.A.** (2005). Increasing of tolerance to osmotic stresses in tobacco *Nicotiana tabacum* cv. *xanthi* through overexpression of p5cs gene. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources* 8, 40- 49.

**Yang S.X., Deng H. et Li M.S.** (2008). Manganese uptake and accumulation in a woody hyperaccumulator, *Schima superba*. *Plant Soil and Environment* 54, 441-446.

**Yang Z. et C. Chu C.** (2011). Towards understanding plant response to heavy metal stress. *In: Abiotic stress in plants - mechanisms and adaptations*. Shanker A. et Venkateswarlu B. (Eds), InTech, pp 59-78.

**Yang W., Zhao F., Zhang X., Ding Z., Wang Y., Zhu Z. et Yang X.** (2015). Variations of cadmium tolerance and accumulation among 39 *Salix* clones: implications for phytoextraction. *Environmental Earth Sciences* 73, 3263-3274.

**Yates E.A., Valdor J.F., Haslam S.M., Morris H.R., Dell A., Mackie W. et Knox J.P.** (1996). Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti- arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology* 6, 131-139.

**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, 456-464.

**York W.S. et O'Neill M.A.** (2008). Biochemical control of xylan biosynthesis - which end is up? *Current Opinion in Plant Biology* 11, 258-265.

**Yoshihara T., Hodoshima H., Miyano Y., Shoji K., Shimada H. et Goto F.** (2006). Cadmium inducible Fe deficiency responses observed from macro and molecular views in tobacco plants. *Plant Cell Reports* 25, 365-373.

**Yruela I.** (2005). Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 147-156.

**Yu Y., Jina C., Sun C., Wang J., Ye Y., Lu L. et Lina X.** (2015). Elevation of arginine decarboxylase-dependent putrescine production enhances aluminum tolerance by decreasing aluminum retention in root cell walls of wheat. *Journal of Hazardous Materials* 299, 280-288.

## -Z-

**Zacchini M., Iori V., Scarascia Mugnozza G., Pietrini F. et Massacci A.** (2011). Cadmium accumulation and tolerance in *Populus nigra* and *Salix alba*. *Biologia Plantarum* 55, 383-386.

**Zapusek U. et Lestan D.** (2009). Fractionation, mobility and bio-accessibility of Cu, Zn, Cd, Pb and Ni in aged artificial soil mixtures. *Geoderma* 154, 164-169.

**Zarei S., Ehsanpour A.A. et Abbaspour J.** (2012). The role of over expression of P5CS gene on proline, catalase, ascorbate peroxidase activity and lipid peroxidation of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) plant under *in vitro* drought stress. *Journal of Cell and Molecular Research* 4 (1), 43-49.

**Zas R.** (2003) Foliar nutrient status and tree growth response of young *Pseudotsuga menziesii* Mirb. (Franco) to nitrogen, phosphorus and potassium fertilization in Galicia (Northwest Spain). *Investigación Agraria - Sistemas y Recursos Forestales* 12(1), 75-85.

**Zayed A.M. et Terry N.** (2003). Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. *Plant and Soil* 249, 139-156.

**Zengin F.K et Kirbag S.** (2007). Effects of copper on chlorophyll, proline, protein and abscisic acid level of sunflower (*Helianthus annuus L.*) seedlings. *Journal of Environmental Biology* (28) 3, 561-566.

**Zenk H.M.** (1996). Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene* 179, 21-30.

**Zhang G., Fukami M. et Sekimoto H.** (2000). Genotypic differences in effects of cadmium on growth and nutrient compositions in wheat. *Journal of Plant Nutrition* 23, 1337-1350.

**Zhao F.J., Ma J.F., Meharg A.A. et McGrath S.P.** (2009). Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist* 181, 777-794.

**Zhao J., Li H., Chen B., Sun W., Zhang J. et Zhang J.** (2015). An iTRAQ-based proteomics approach to clarify the molecular physiology of somatic embryo development in Prince Rupprecht's larch (*Larix principis-rupprechtii* Mayr). *Plos One* 10 (3), doi: 10.1371/journal.pone.0119987.

**Zheng S.J., Lin Y., Yang J., Liu Q. et Tang C.** (2003). The kinetics of aluminium adsorption and desorption by root cell walls of aluminium resistant wheat (*Triticum aestivum L.*) cultivar. *Plant and Soil* 261, 85-90.

**Zhu X.F., Gui G.J., Jiang T., Liu Y., Li G.X. et Zheng S.J.** (2012). Cell wall polysaccharides are involved in P-deficiency-induced Cd exclusion in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 236, 989-997.

**Zhu X.F., Wang Z.W., Dong F., Lei G., Shi Y.Z., Li G.X. et Zheng S.J.** (2013). Exogenous auxin alleviates cadmium toxicity in *Arabidopsis thaliana* by stimulating synthesis of hemicellulose 1 and increasing the cadmium fixation capacity of root cell walls. *Journal of Hazardous Materials* 263, 398-403.

**Zhuang P., Yang Q., Wang H. et Shu W.** (2007). Phytoextraction of heavy metals by eight plant species in the field. *Water, and Air Soil Pollution* 184, 235-242.

- Zimmermann M.H.** (1983). Xylem structure and the ascent of sap. *In*: Springer series in wood science. Timell T.E (Ed), Springer, Berlin, Heidelberg, New york, 143 p.
- Zolla G., Heimer Y.M. et Barak S.** (2010) Mild salinity stimulates a stress-induced morphogenic response in *Arabidopsis thaliana* roots. *Journal of Experimental Botany* 61 (1), 211-224.
- Zu Y.Q., Yuan L., Schwartz C., Langlade L. et Fan L.** (2004). Accumulation of Pb, Cd, Cu and Zn in plants and hyperaccumulator choice in Lanping lead-zinc mine area, China. *Environment International* 30, 567-576.



**SITES**  
**INTERNET**





## SITES INTERNET

Site 1 :

<http://www.actu-environnement.com/ae/news/protection-sol-directive-europenne-bureau-europeen-environnement-13907.php4>

Site 2 :

<http://basias.brgm.fr>

Site 3 :

<http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=LEGITEXT000021263097&dateTexte=20151201>

Site 4 :

<http://basol.developpement-durable.gouv.fr>

Site 5 :

<http://www.developpement-durable.gouv.fr>

Site 6 :

<http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/lessentiel/ar/272/1122/sites-sols-pollues.html>

Site 7 :

<http://www.ineris.com/fr/rapports-détude/toxicologie-et-environnement/fiches-de-données-toxicologiques-et-environnementales->

Site 8 :

[http://cronodon.com/BioTech/Plant\\_Transport.html](http://cronodon.com/BioTech/Plant_Transport.html)

Site 9 :

<http://homepage.ruhr-uni-bochum.de/Markus.Piotrowski/Bilder/Polyaminebiosynthesis72.gif>

Site 10 :

<https://amazingseaweed.wordpress.com/a-propos/>

Site 11 :

<http://www.vogel.chemie.uni-rostock.de/en/research/chemistry-of-d-glacturonic-acid/>

Site 12 :

<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/paroi/pectines.htm>

Site 13 :

<https://public.ornl.gov/site/gallery/detail.cfm?id=261>

Site 14 :

<http://www.onf.fr>

Site 15 :

<http://franceboisforet.com>

Site 16 :

<http://www.lesarbres.fr>

Site 17 :

<http://www.france-douglas.com>

Site 18 :

<http://franceboisforet.com/france-douglas-a-20-ans/>

Site 19 :

<http://www.crfp-limousin.com>

Site 20 :

<http://www.crfp-poitou-charentes.fr>

Site 21 :

<http://www.pirinoble.eu>

Site 22 :

<http://www.cdaf.be>

Site 23 :

<http://www.crfp.fr>

Site 24 :

<http://agriculture.gouv.fr>

Site 25 :

[http://www.crfp.fr/bretagne/pdf-information/SYNTHESE\\_MELEZES.pdf](http://www.crfp.fr/bretagne/pdf-information/SYNTHESE_MELEZES.pdf)

Site 26 :

<http://www.crfp-limousin.com/sources/files/le%20meleze.pdf>

Site 27 :

<http://folk.uio.no/ohammer/past>

Site 28 :

[http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/Quelle\\_technique\\_quel\\_traitement-brgm-v-final.pdf](http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/Quelle_technique_quel_traitement-brgm-v-final.pdf)

Site 29 :

<http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/construction-th3/les-travaux-souterrains-et-les-depollutions-42551210/techniques-de-rehabilitation-des-sites-et-sols-pollues-c5582/>

Site 30 :

<http://www.gadel-environnement.org/img-user/VERGERS%20A%20GRAINES%20DOC-INFO.pdf>

Site 31 :

<http://agriculture.gouv.fr/fournisseurs-especes-reglementees-provenances-et-materiels-de-base-forestiers>

# **ANNEXES**



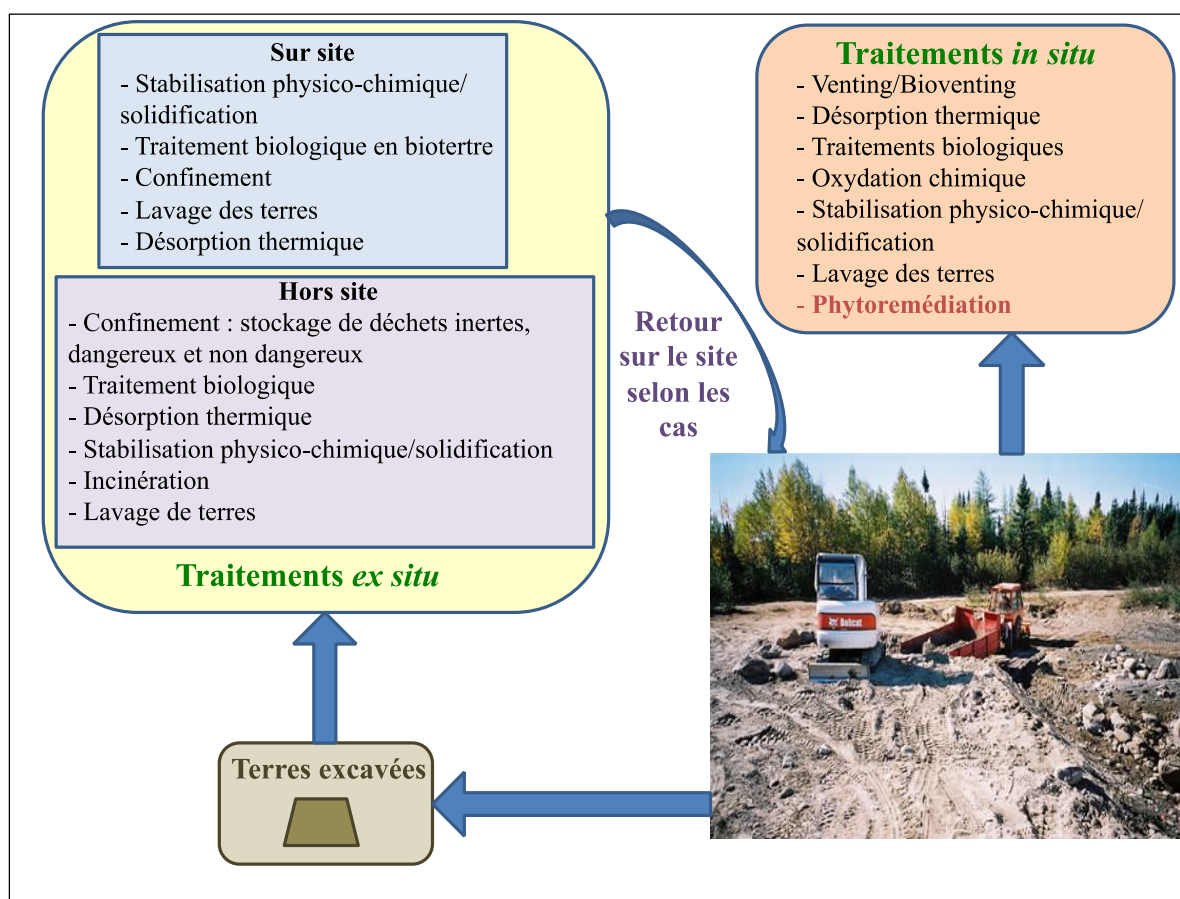
# ANNEXES

## ANNEXE 1

### Techniques de dépollution *ex situ* et *in situ* des sols pollués

Les informations de cette annexe se réfèrent aux sites internet 28 et 29.

Les techniques de dépollutions des sols se distinguent par leur mode de mise en œuvre qui peut être *ex situ* (hors site et sur site) ou *in situ* (figure 75).



**Figure 75.** Différentes techniques de traitement *ex situ* et *in situ* des sols pollués.

**NB :** le biotierre consiste à mettre des sols pollués en tas en vue d'un traitement biologique. Ainsi, les sols pollués font généralement l'objet d'un amendement et les conditions dans le biotierre sont contrôlées (aération, ajouts de nutriments ...).

## I. Les techniques *ex situ*

Les techniques *ex situ* regroupent les procédés traitant les polluants après leur excavation sur le site ou hors du site.

### 1. Dépollution sur site

Certaines techniques peuvent être mises en œuvre sur le site même par l'intermédiaire ou non d'installations temporaires. Ceci permet de s'affranchir du coût occasionné par le transport des sols à dépolluer. Ainsi les terres polluées excavées sont mises de côté puis traitées. Il existe de nombreuses techniques dont :

- ✓ Les traitements biologiques en biotertre. Cette technique consiste en la mise en tas du sol puis en son traitement biologique. Elle a pour objectif la biodégradation des composés organiques présents dans les sols en utilisant des micro-organismes pour dégrader des composés organiques. Cette dégradation est le plus souvent aérobie. On y distingue d'une part la technique de bio-stimulation et d'autre part, celle de bio-augmentation. La bio-stimulation utilise des bactéries indigènes en créant des conditions de milieu favorables à leur croissance (apport d'eau, de nutriments, de chaleur, d'oxygène). La bio-augmentation, quant à elle, consiste à introduire dans le milieu des micro-organismes spécifiquement sélectionnés pour leur aptitude à dégrader le polluant. Dans ce cas, les micro-organismes ajoutés peuvent être étrangers au sol ou indigènes. Lorsqu'ils sont indigènes, les micro-organismes sont extraits du sol, acclimatés au contaminant, cultivés *ex situ* puis réinjectés. Il existe aussi un traitement biologique anaérobie qui favorise les micro-organismes anaérobies capables de dégrader les polluants en éliminant l'oxygène du milieu. Cette technique est employée à l'échelle industrielle et s'avère très intéressante dans le cas de composés de type PCB ou solvants chlorés comme le tétrachloroéthylène ou dans le cas de zones saturées en eau.
- ✓ Le lavage ou « flushing » *ex situ*. Il a pour but de laver le sol excavé à l'aide de solvants de solubilisation (eau, acide, base) permettant le transfert des polluants du sol vers la phase solvant (ou aqueuse) qui sera ensuite traitée. Ce procédé s'adresse majoritairement aux polluants organiques mais peut toutefois être utilisé pour les polluants inorganiques. Le lavage *ex situ* peut être réalisé sur site à l'aide d'une unité mobile de lavage ou dans un centre spécialisé.

- ✓ La solidification / stabilisation physico-chimique. Ces deux techniques permettent de diminuer de façon pérenne et stable le risque de dissémination d'éléments polluants dans le sol en les immobilisant sous une forme moins soluble et/ou moins toxique grâce à des procédés physico-chimiques. La solidification s'opère en mélangeant un liant et de l'eau au sol pollué afin d'obtenir un matériau dur, peu perméable et stable dans le temps, dans lequel le polluant sera piégé. La stabilisation consiste à réduire la mobilité d'un contaminant en lui faisant subir une réaction chimique dont le produit qui en découle est moins soluble que son parent et/ou dispose de propriétés de sorption accrues le rendant donc moins mobilisable. Elle peut aussi consister à mélanger le sol pollué à différents adjuvants afin d'augmenter les capacités de sorption du contaminant sur ces matériaux pour qu'il ne soit plus mobilisable par lixiviation. Les polluants ne sont pas détruits par ces deux techniques mais leur risque de propagation dans l'environnement est diminué. Ce procédé est souvent utilisé sur les polluants non biodégradables comme les ET et quelques polluants organiques.
  
- ✓ La désorption thermique. Elle permet d'extraire les composés volatils du sol pollué par chauffage. Ceci se déroule dans une installation fixe (four) dont la température est comprise entre 150 et 550°C. Le contaminant en phase solide ou liquide qui est adsorbé sur la matrice va passer en phase gazeuse (vaporisation) grâce à l'augmentation de température responsable de l'augmentation des pressions de vapeurs. Les vapeurs ainsi désorbées sont ensuite aspirées et traitées. Cette technique s'effectue à des températures moyennes contrairement à l'incinération. Après traitement, on obtient non pas des cendres mais un sol qui peut être laissé sur place ou intégré à divers matériaux comme des ciments, des matériaux servant à recouvrir les décharges ou de l'asphalte.
  
- ✓ Le confinement des terres polluées sur site. Il consiste à mettre en place une barrière étanche autour du volume de sol pollué pour empêcher la migration des polluants vers les nappes souterraines.



## 2. Dépollution hors site

Les terres excavées sont traitées hors du site dans des centres de traitement fixes. Ces derniers peuvent être des installations de traitements biologiques, de stabilisation / solidification, de lavages de terres ou de désorption thermique. L'incinération consiste à utiliser de hautes températures (> 1000°C) pour détruire les composés organiques et récupérer les métaux concentrés dans les résidus d'épuration des fumées et dans les résidus solides issus de la combustion. Les terres peuvent également être entreposées dans des centres de stockage de déchets dangereux, non dangereux ou inertes. Ce confinement consiste à entreposer les terres dans une alvéole à très faible perméabilité et dont les eaux de ruissellement sont collectées puis traitées.

## II. Les techniques *in situ*

Les techniques *in situ* regroupent les procédés traitant les polluants sans excavation du sol et donc s'opérant directement au sein de celui-ci. Il existe de nombreuses techniques dont :

- ✓ Le Venting. Il permet d'extraire les composés organiques et est basé sur leur volatilisation. Cette technique consiste au renouvellement de l'air dans les pores du sol ayant pour conséquence de modifier des équilibres chimiques entre les différentes phases présentes. Ainsi, au cours de son passage à travers la zone contaminée, l'air se « charge » en contaminants. Ces vapeurs sont récupérées dans les points d'extraction sous vide et éventuellement traitées en surface.
- ✓ Le Bioventing. Il consiste à injecter de l'oxygène dans le sol. Cet apport favorise la biodégradation des polluants *via* les micro-organismes aérobies indigènes du sol. Cette technique est utilisée depuis une vingtaine d'années et reste très employée pour les sites pollués par les hydrocarbures biodégradables. Dans ce cas, la biodégradation joue un rôle plus important que la volatilisation (venting) dans le traitement de la zone contaminée.
- ✓ Le lavage ou flushing *in situ*. Il consiste à faire percoler sur un sol en place une solution (eau ou agents mobilisateurs) permettant d'extraire le polluant. Les efflux sont ensuite récupérés par pompage puis traités.

- ✓ La désorption thermique *in situ*. Il s'agit d'une amélioration du procédé de venting, utilisée lorsque celui-ci atteint ses limites. Le sol en place est chauffé par différents moyens afin d'augmenter la volatilisation des polluants qu'il contient. Cette élévation de température conduit à l'évaporation de l'eau contenue dans le sol. Les polluants ayant une température d'ébullition inférieure à celle de l'eau sont ainsi volatilisés. Le rendement du venting est alors sensiblement amélioré. Cette technique s'applique aux composés volatils et semi-volatils (solvants chlorés, essences ...) ainsi qu'à d'autres composés organiques moins volatils tels que les PCB (polychlorobiphényles).
- ✓ L'oxydation chimique. Elle est fréquemment utilisée pour traiter les polluants organiques et consiste à injecter un oxydant sous forme liquide ou gazeuse. Ce dernier entre en contact direct avec le polluant conduisant à sa destruction ou à sa transformation en un composé moins toxique.
- ✓ La stabilisation physico-chimique / solidification (même principe que précédemment (I.1.)).
- ✓ Traitements biologiques (même principe que précédemment (I.1.)).
- ✓ La phytoremédiation fait appel à des végétaux pour traiter divers polluants organiques et ET.

### III. Coûts associés

En France, en 2012, la quantité de terres polluées traitées ou engagées dans un traitement a été estimée à environ 8 millions de tonnes (Ernst et Young, 2014). Pour chaque technique de traitement ou de gestion, les coûts sont très variables du fait de la diversité des chantiers (taille, localisation, complexité, etc.) rencontrés.

Selon le rapport de Ernst et Young (2014), en 2012 les traitements *in situ* représentaient une part importante du marché (environ 52 % de part en volume de terre) avec notamment le venting - bioventing (plus de 34 %) et la bio-augmentation / bio-stimulation (environ 10%). Les traitements *ex situ* « sur site » et « hors site » représentent aussi une part de marché significative

(environ 48 % de part en volume de terre) avec notamment le traitement biologique de terres sur des plateformes « hors site » (11 %) ou à partir d'installations de biodégradation déployées sur site (7 %). En matière de gestion, les installations de stockage de déchets non dangereux et inertes (ISDND et ISDI) sont le premier devenir des terres excavées issues de sites pollués (parfois après traitement).

## **ANNEXE 2**

### **Les vergers de provenance des mélèzes implantés en Limousin**

Les informations de cette annexe se réfèrent au site internet 26.

Pour les mélèzes implantés en Limousin, le matériel recommandé en premier choix pour le boisement et le reboisement est issu de vergers à graines.

#### **Mélèze hybride**

Dans les régions forestières des plateaux Limousins et de Millevaches, Marches de Combrailles ainsi que dans la Châtaigneraie Limousine, le matériel recommandé est provient des vergers à graines suivants : LEU-VG-001 FH201-Lavercantière PF-VG (matériel qualifié) et LEU-VG-002 Rêve vert PF (matériel testé).

#### **Mélèze d'Europe**

Pour les plateaux Limousins et de Millevaches, les Marches de Combrailles et la Châtaigneraie Limousine, le matériel recommandé est LDE-VG-001 (Sudètes-Le Theil-VG) qui est un verger à graines d'origine qualifiée.

#### **Mélèze du Japon**

Pour le Limousin, il est conseillé d'utiliser les vergers à graines danois en raison de la difficulté à obtenir des informations sur les lieux récoltés dans l'aire naturelle (Ile de Hondo) ou dans les autres zones de production japonaises (Hokkaido). Dans les régions forestières des plateaux Limousins et de Millevaches, Marches de Combrailles ainsi que dans la Châtaigneraie Limousine, le matériel pour le boisement et le reboisement est danois avec les vergers à graines testés VG-FP601 et FP615.



## ANNEXE 3

### Les différents vergers à graines

Les informations de cette annexe se réfèrent aux sites internet 30 et 31.

Un verger à graines est une plantation de clones (ensemble d'individus obtenus par multiplication végétative d'un même individu initial) ou de descendants d'arbres sélectionnés dans des peuplements naturels (côte Ouest des États-Unis pour le Douglas par exemple) pour leurs qualités génétiques. Il est mis en place de façon à éviter la pollinisation par des arbres situés à l'extérieur du verger. Les arbres du verger fournissent alors des graines en quantité abondante et facilement récoltables dont la qualité génétique est améliorée. La sélection des meilleurs plants s'effectue tout d'abord dans l'aire naturelle de l'espèce (adaptation, vigueur, forme) et selon les provenances, les mieux adaptées aux conditions des diverses zones de reboisements envisagées. Ainsi, divers types de vergers à graines ont été créés :

- **Les vergers à graines de familles.** Il s'agit de plantations constituées de descendants d'arbres sélectionnés (obtenus à partir des graines de ces derniers) appartenant à une même « famille ». Ces plantations font l'objet d'éclaircies génétiques périodiques qui permettent de ne conserver que les meilleurs sujets des meilleures « familles ». Ainsi, ces vergers de famille permettent une production en masse de graines et une poursuite du processus de sélection. Ils sont implantés dans un milieu écologiquement voisin de celui auquel sa production est destinée pour éviter le risque de fausser la sélection.
- **Les vergers à graines de clones.** Ce sont des plantations constituées de « copies végétatives » d'arbres sélectionnés (obtenues généralement par greffage ou plus rarement par bouturage) et gérées directement pour la production de graines. C'est une plantation d'individus sélectionnés pour leurs qualités génétiques et destinés à se reproduire par voie sexuée. Certaines espèces (Douglas et mélèzes) font l'objet de traitements destinés à stimuler la maturité des cônes. Tout d'abord, au mois de Mars, une annélation d'écorces consistant en deux incisions semi-circulaires sur le tronc (section de vaisseaux) est effectuée afin d'éviter le retour de la sève élaborée vers les racines. Un traitement hormonal est ensuite réalisé en Mai-Juin par injection de gibbérellines (hormones naturellement présentes dans les arbres) dans des trous forés

dans le tronc. Ces vergers peuvent être implantés dans des régions écologiquement très différentes de celles pour lesquelles leur production de graines est adaptée, en particulier dans des zones favorables à la fécondation et au développement des graines.

- **Les vergers à graines d'hybridation** (cas du mélèze hybride). Dans ce type de verger, les graines hybrides sont obtenues par pollinisation manuelle d'un clone de mélèze d'Europe de provenance autrichienne. Le pollen de nombreux clones bien caractérisés de mélèze du Japon appartenant d'ailleurs à la même famille (verger à graines de famille) est en effet projeté sur les cônes femelles du mélèze d'Europe à l'aide d'un pistolet souffleur. Les graines récoltées ont déjà montré qu'elles donnaient des peuplements homogènes vigoureux et de très bonne forme.

Les récoltes de graines et boutures à des fins forestières sont effectuées sur des matériels de base admis dans un registre national comprenant 4 catégories :

- **testée** : la supériorité du matériel de base par rapport à des témoins a été démontrée sur des critères donnés (vigueur, qualité du bois, branchaison, résistances diverses...) et pour une zone d'utilisation spécifique. Les matériels de base testés sont des peuplements, des vergers à graines ou des cultivars (clones).
- **qualifiée** : les matériels de base sont uniquement des vergers à graines. Leur composition à partir de matériels sélectionnés sur tel ou tel critère est connue mais la supériorité du verger par rapport à des témoins est en cours d'évaluation.
- **sélectionnée** : les matériels de base sont uniquement des peuplements. Leur sélection en forêt s'est fondée sur l'appréciation des qualités extérieures des arbres pour différents critères sylvicoles.
- **identifiée** : la garantie d'information porte sur la provenance, mais les arbres récoltés n'ont fait l'objet d'aucune sélection. Les matériels de base sont des sources de graines constituées par les régions de provenance de l'espèce.

## ANNEXE 4

### Obtention de graines de mélèze hybride au verger de Lavercantière

Les informations de cette annexe se réfèrent à : Riou- Nivert, 2001.

Le verger d'hybridation de Lavercantière fait intervenir une parcelle de 5 ha de mélèzes du Japon (118 clones) pour la production de pollen (verger à graines de famille) et une autre de 5 ha également de mélèzes d'Europe (1 clone) (verger à graines de clones). Pour faciliter la récolte du pollen et la pollinisation, les arbres de ces deux parcelles ont été taillés à environ 3 m de hauteur. La production naturelle de cônes du mélèze d'Europe de ce verger étant faible et irrégulière, 500 arbres (plantés sur 2 ha) ont subi deux traitements pour stimuler cette production (traitements présentés pour les « vergers à graines de clones » de l'annexe 2). Ces traitements ont permis d'augmenter d'un facteur 8 la production de cônes sur ces arbres par rapports aux arbres n'ayant pas reçus ces deux traitements.

Pour la fécondation, les cônes mâles des mélèzes du Japon sont récoltés début Mars puis étalés 3 à 4 jours en laboratoire sur des claies pour libérer leurs grains de pollen. Ces derniers sont ensuite tamisés, séchés et embouteillés pour être conservés en chambre froide jusqu'à la pollinisation. Fin Mars, 368 mélèzes d'Europe sélectionnés pour leur abondance en cônes ont été pollinisés artificiellement par projection du pollen sur les cônes à l'aide d'un pistolet souffleur (figure 76).



**Figure 76.** Cônes femelle de mélèze d'Europe pollinisés artificiellement par pistolet souffleur (d'après Riou-Nivert, 2001).



Ainsi le verger à graines de clones de mélèzes d'Europe devient un verger d'hybridation. Les cônes fécondés sont alors récoltés puis répartis à part égale entre la Sécherie de la Joux et la société Vilmorin (Maine et Loire, France) du groupe Limagrain dans lesquelles les graines sont extraites.

## ANNEXE 5

**Tableau 29.** Liste des produits

Réactifs	N° CAS	Fournisseurs
2-métoxyéthanol (99,5 %)	109-86-4	Sigma
6-benzylaminopurine (BAP)	1214-39-7	Sigma
Acétone	67-64-1	VWR
Acétonitrile (ACN)	75-05-8	Fisher Chemical
Acide 2,4-dichlorophénoxy acétique (2,4D)	94-75-7	Sigma
Acide 5,5'-dithiobis-2-nitro-benzoïque (DNTB)	69-78-3	Sigma
Acide abscissique (ABA)	21293-29-8	Sigma
Acide acétique (99,6 %)	64-19-7	Carlo Alba
Acide ascorbique	62624-30-0	Sigma
Acide Borique (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ) Rectapur (99 %)	10043-35-3	Prolabo
Acide diéthylènetriamine-pentaacétique (DTPA) (99 %)	67-43-6	Fluka BioChemika
Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique (EDTA) (100 %)	60-00-4	Sigma
Acide indole butyrique (AIB).	000133-32-4	Sigma
Acide méthanesulfonique (MSA) (99,5 %)	75-75-2	Sigma
Acide nicotinique (99,5 %)	59-67-6	Duchefa Biochemie
Acide nitrique (68 %)	7697-37-2	VWR
Acide nitrique (minéralisation) Normapur (68 %)	7697-37-2	VWR
Acide sulfonique -4-(2-hydroxyethyl)-piperazine-1-propane (HEPPS) (99,5 %)	16052-06-5	Sigma
Acide sulfurique Normapur (95 %)	7664-93-9	VWR
Acide thiobarbiturique (ATB) (98 %)	504-17-6	Sigma
Acide trichloroacétique (TCA)	76-03-9	Sigma
Acide trifluoroacétique (TFA) (99,5 %)	76-05-1	Fluka BioChemika
Albumine serum Bovin (BSA)	9048-46-8	Sigma
Anthrone	90-44-8	Sigma
Bio-Rad Protein Assay	67-56-1	Bio Rad
BORAX anhydre (99 %)	1330-43-4	Sigma
BSTFA	25561-30-2	Thermo scientific
Charbon actif (100 %)	7440-44-0	Duchefa Biochemie
Chloroforme (99 %)	67-66-3	Carlo Erba
Chlorure de Cadmium (CdCl <sub>2</sub> ) (99 %)	10108-64-2	Acrós Organics
Chlorure de Calcium (CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O) (99 %)	10035-04-8	Duchefa Biochemie
Chlorure de Cobalt (CoCl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O) (97 %)	7791-13-1	Duchefa Biochemie
Chlorure de Potassium (KCl) (99 %)	7447-40-7	Prolabo
Cystéine (98 %)	52-90-4	Alfa Aesar
Diméthylsulfoxyde (DMSO) (99,6 %)	67-68-5	Analytical Reagent
Dithiothréitol (DTT)	03/12/83	Sigma
Eau ultrapure (18,2 M <sub>Ω</sub> .cm)		Milli-Q plus
Ethanol (96 %)	64-17-5	Carlo Erba
Ethylenediaminetetraacetic acid ferric sodium salt	15708-41-5	Sigma
Gelrite	71010-52-1	Duchefa Biochemie
Glucose	50-99-7	Sigma
Glutathion (GSH)	70-18-8	Sigma
Glycine (99 %)	56-40-6	Sigma

Guaiacol	90-05-1	Sigma
HCl Normapur (37 %)	7647-01-0	VWR
Heptane (99.5%)	142-82-5	ACROS Organics
Hydrogénophosphate de Potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) (99,5 %)	04/11/58	Prolabo
Inositol	87-89-8	Sigma
Iodure de Potassium (KI) (99,5 %)	7681-11-0	Prolabo
L-Glutamine (99 %)	56-85-9	Duchefa Biochemie
L-Proline	147-85-3	Sigma
Méthanol	67-56-1	VWR
Méthanol anhydre (Extra Dry)	67-56-1	ACROS Organics
Methanol/HCl	7647-01-0	Supelco
MHDP (85 %)	580-51-8	Sigma
Molybdate de sodium dihydrate (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O)	10102-40-6	Fluka BioChemika
Monobromobimane (mBrB) (95 %)	71418-44-5	Sigma
Myoinositol	87-89-8	Duchefa Biochemie
N-acétyl-cystéine (NAC)	616-91-1	Sigma
Ninhydrine (99 %)	485-47-2	MERCK
Nitrate de potassium (KNO <sub>3</sub> )	7757-79-1	Duchefa Biochemie
Nitrate de Potassium (KNO <sub>3</sub> ) (99 %)	7757-79-1	Duchefa Biochemie
Peroxyde d'hydrogène (30 %)	7722-84-1	VWR
Phénol (99 %)	108-95-2	Alfa Aesar
Phosphate de potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	7778-77-0	Prolabo
Pyridine anhydre (Extra Dry)	110-86-1	ACROS Organics
Pyridoxine-HCl	58-56-0	Sigma
Saccharose	57-50-1	Prolabo
Sulfate de Cadmium (CdSO <sub>4</sub> )	10124-36-4	Sigma
Sulfate de cuivre pentahydrate (CuSO <sub>4</sub> , 5 H <sub>2</sub> O)	7758-99-8	Sigma
Sulfate de Magnésium (MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O) (99 %)	10034-99-8	Duchefa Biochemie
Sulfate de Manganèse (MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O) (98 %)	10034-96-5	Duchefa Biochemie
Sulfate de Zinc (ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O) (99 %)	7733-02-0	Duchefa Biochemie
Thiamine-HCl	67-03-8	Duchefa Biochemie
Thio-urée	62-56-6	Prolabo
Toluène (99,8 %)	108-88-3	Sigma
Triéthanolamine (99 %)	102-71-6	Fluka BioChemika
Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP)	51805-45-9	Sigma

## ANNEXE 6

**Bonet A.,** Lelu-Walter M.A., Faugeron C., Gloaguen V and Saladin G.

« Physiological responses of hybrid larch (*Larix × eurolepis henry*) to cadmium exposure and efficiency of phytoextraction ». *Environmental Science and Pollution Research* (DOI: 10.1007/s11356-016-6094-6).

**Bonet A.,** Pascaud G., Faugeron C., Soubrand M., Joussein E., Gloaguen V and Saladin G.

« Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) plantlets responses to As, Pb and Sb-contaminated soils from former mines». *International Journal of Phytoremediation* (DOI : 10.1080/15226514.2015.1086297).



4 **Physiological responses of the hybrid larch (*Larix × eurolepis***  
5 **Henry) to cadmium exposure and distribution of cadmium**  
6 **in plantlets**

7 **Amandine Bonet<sup>1</sup> · Marie-Anne Lelu-Walter<sup>2</sup> · Céline Faugeron<sup>1</sup> · Vincent Gloaguen<sup>1</sup> ·**  
8 **Gaëlle Saladin<sup>1</sup>**  
9

10 Received: 9 October 2015 / Accepted: 11 January 2016  
11 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

12 **Abstract** Phytoextraction of Cd is a growing biotechnology  
13 although we currently know few Cd hyperaccumulators, i.e.,  
14 plant species able to accumulate at least 0.1 mg Cd g<sup>-1</sup> dry  
15 weight in aerial organs. Owing their deep root system and high  
16 biomass, trees are more and more preferred to herbaceous  
17 species for phytoextraction. Assuming that conifers could be  
18 relevant models under cold climates, we investigated cadmi-  
19 um tolerance of the hybrid larch *Larix × eurolepis* Henry  
20 (*Larix decidua × Larix kaempferi*) and the efficiency of this  
21 species to store this metal. In vitro grown larches were chosen  
22 in order to reduce time of exposure and to more rapidly evalu-  
23 ate their potential efficiency to accumulate Cd. One-month-  
24 old plantlets were exposed for 2 and 4 weeks to 250 and  
25 500 μM Cd. Results showed that they tolerated a 4-week  
26 exposure to 250 μM Cd, whereas the content of photosynthet-  
27 ic pigment strongly dropped in plantlets growing in the pres-  
28 ence of 500 μM Cd. In the presence of 250 μM Cd, shoot  
29 growth slightly decreased but photosynthetic pigment and tot-  
30 al soluble carbohydrate contents were not modified and no  
31 lipid peroxidation was detected. In addition, these plantlets  
32 accumulated proline, particularly in shoots (two to three times  
33 more than control). In roots, Cd concentration in the intracel-  
34 lular fraction was always higher than in the cell wall fraction

contrary to shoots where Cd concentration in the cell wall  
fraction increased with time and Cd concentration in the me-  
dium. In shoots, Cd concentration was lower than in roots with  
a ratio of 0.2 after 4 weeks of exposure but stayed around  
0.2 mg g<sup>-1</sup> dry weight, thus a value higher than the threshold  
requested for Cd hyperaccumulators. Hybrid larch would thus  
be a relevant candidate for field test of Cd phytoextraction.

**Keywords** Gymnosperm · In vitro · Metal ·  
Phytoaccumulation · Phytoextraction · Phytoremediation ·  
Trace element · Somatic seedling

**Introduction**

Trace elements (TEs) released by many human activities pro-  
gressively entered the environment to the point that they are  
considered as a matter of ongoing concern. Contrary to organ-  
ic pollutants such as pesticides, TEs are not biodegradable and  
thus accumulate in soils and waters with subsequent potential  
accumulation and poisoning along the trophic chain (Ali et al.  
2013). TE can be removed from contaminated sites by  
phytoextraction. This ecofriendly technology consists in  
growing selected plant species on polluted sites (Ali et al.  
2013). After plant harvest, the biomass is valorized in various  
sectors to reduce the cost of the process and TE can be con-  
centrated and reused (Vigil et al. 2015). This method is less  
expensive than the conventional one consisting in soil exca-  
vation, remote treatment, and waste management. Efficient  
phytoextraction requires plant species with high growth rate  
and biomass, deep root system, and high TE uptake capacity.  
In addition, these plants must be able to translocate TE to their  
aerial parts which can be eventually harvested and processed.  
Owing to their more developed root system and higher bio-  
mass, trees appear as better candidates than herbaceous

Responsible editor: Elena Maestri

✉ Gaëlle Saladin  
gaelle.saladin@unilim.fr

<sup>1</sup> Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN EA 1069),  
Université de Limoges, Faculté des Sciences et Techniques, 123  
avenue Albert Thomas, 87060 Limoges Cedex, France  
<sup>2</sup> INRA, UR 0588 Unité Amélioration, Génétique et Physiologie  
Forestières, 2163 Avenue de la Pomme de pin CS 4001, Ardon,  
45075 Orléans Cedex 2, France

66 species. Moreover, they can stay on the contaminated site for  
67 3–5 years (short rotation coppice) without new plantings, thus  
68 reducing the cost of phytoextraction (Pulford and Watson  
69 2003; Marmiroli et al. 2011). Among the 550–600 currently  
70 known hyperaccumulators, less than 20 % are woody species  
71 (van der Ent et al. 2012; Saladin 2015).

72 Cadmium is considered as one of the most toxic TE,  
73 and Cd-tolerant plant species are actually hard to find  
74 (Clemens 2006; Amouei et al. 2013). Cadmium concen-  
75 trations ranging from 3 to 10 mg kg<sup>-1</sup> dry weight (DW)  
76 can cause leaf roll, chlorosis, water uptake disturbance,  
77 and stomatal closure (Balsberg Pålsson 1989; Clemens  
78 2006). Cadmium can bind to sulfhydryl groups of proteins  
79 and inactivates thiol-dependent enzymes (DalCorso et al.  
80 2008; Farid et al. 2013). In addition, Cd exhibits chemical  
81 similarities with other divalent cations, leading to mineral  
82 deficiency. Moreover, Cd generates oxidative stress char-  
83 acterized by an increased production of reactive oxygen  
84 species (ROS), particularly H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, that induces cell death  
85 associated with the disruption of membrane integrity  
86 (Gallego et al. 2012; Farid et al. 2013).

87 The term “hyperaccumulator” qualifies plants which accu-  
88 mulate in their aerial parts at least 1 or 10 mg of most TE per  
89 gram of DW (Baker and Brooks 1989). Around 20 Cd  
90 hyperaccumulators are currently known, but the few woody  
91 species of this group grow in tropical areas, thus limiting the  
92 candidates under temperate or cold climate (Saladin 2015). An  
93 emerging and efficient alternative for temperate climates is the  
94 use of non-hyperaccumulator trees with fast growing species  
Q2 95 such as willows or poplars (Fischerová et al. 2006; Zacchini  
96 et al. 2011; He et al. 2013). Despite the fact that these trees are  
97 well adapted to various soil conditions, their growth can be  
98 strongly reduced in cold climates or on very acidic soils in  
99 contrast to conifers. Other tree species should thus be consid-  
100 ered to enlarge the choice in relation to climate and soil  
101 characteristics.

102 The aims of this work are to study the effects of Cd on  
103 the hybrid larch (*Larix × eurolepis*) physiology and to  
104 evaluate the capacity of this tree to uptake Cd and to store  
105 it in aerial organs. Somatic embryos were grown in order  
106 to obtain in vitro clonal plantlets (Moussavou Moudouma  
107 et al. 2013; Lelu-Walter et al. 2015). Indeed, in vitro mod-  
108 el can be an interesting first step to select potential candi-  
109 dates as time and space for culture are reduced compared  
110 to field experiments (Di Lonardo et al. 2011). In addition,  
111 the use of clonal material avoids genetic variation, and the  
112 observed effects are thus only due to the tested factors.  
113 Moreover, in vitro culture allows the testing of  
114 phytoextraction efficiency out of complex interferences  
115 between plants, microorganisms, climatic conditions, and  
116 soil type which influence TE bioavailability (Smykalova  
117 et al. 2010; Marmiroli et al. 2011). Of course, these factors  
118 have to be taken into account to evaluate the actual

efficiency of phytoextraction, but a first in vitro evaluation 119  
can be a fast tool to select plants with a long life cycle. A 120  
previous work showed that 1-month-old hybrid larch 121  
plantlets tolerated a Cd concentration as high as 1.5 mM 122  
in the culture medium during 1 week but plantlets began to 123  
turn yellow after 2 weeks of treatment (Moussavou 124  
Moudouma et al. 2013). In this study, we thus used lower 125  
(but still high) concentrations of 250 and 500 μM Cd, and 126  
we exposed plantlets to Cd for longer time (2 and 4 weeks) 127  
in order to assess the tolerance of hybrid larch to this TE. 128

## 129 Materials and methods

### 130 Plant materials and growth conditions

131 Experiments were conducted at 24 ± 1 °C with the N23 131  
embryogenic line of the hybrid larch *Larix × eurolepis* 132  
(*Larix decidua × Larix kaempferi*) (Lelu-Walter and 133  
Pâques 2009). Embryonal masses were subcultured every 134  
2 weeks in the dark at 25 °C on proliferation medium that 135  
consisted in basal MSG medium (Becwar et al. 1990) 136Q3  
containing 1.45 g L<sup>-1</sup> L-glutamine, supplemented with 137  
9 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2.3 μM 6- 138  
benzylaminopurine, and 60 mM sucrose, and solidified 139  
with 4 g L<sup>-1</sup> gellan gum. Basal MSG medium contained 140  
(per liter) 1.5 g glutamine, 0.44 g CaCl<sub>2</sub>, 2 H<sub>2</sub>O, 0.37 g 141  
MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O, 0.17 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.74 g KCl, 0.1 g KNO<sub>3</sub>, 142  
0.1 g myo-inositol, 37.3 mg Na<sub>2</sub>EDTA, 27.8 mg FeSO<sub>4</sub>, 7 143  
H<sub>2</sub>O, 16.9 mg MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, 8.6 mg ZnSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O, 144  
6.2 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.83 mg KI, 0.5 mg nicotinic acid, 145  
0.5 mg pyridoxin-HCl, 0.25 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 2 H<sub>2</sub>O, 146  
0.1 mg thiamine-HCl, 25 μg CuSO<sub>4</sub>, 5 H<sub>2</sub>O, and 25 μg 147  
CoCl<sub>2</sub>, 6 H<sub>2</sub>O. Maturation of the somatic embryo was 148  
obtained according to Lelu-Walter and Pâques (2009). 149  
Briefly 1 week after subculture on the proliferation medi- 150  
um, embryonal masses were first transferred in the dark to 151  
plant growth regulator-free MSG medium containing 1 % 152  
(w/v) activated charcoal and 0.1 M sucrose and solidified 153  
with 4 g L<sup>-1</sup> gellan gum. Thereafter, embryonal masses 154  
were transferred to the second maturation medium con- 155  
taining 0.2 M sucrose and 60 μM cis-trans (±) abscisic 156  
acid and solidified with 8 g L<sup>-1</sup> gellan gum. Light inten- 157  
sity was set at 20 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. After 8 weeks, cotyle- 158  
donary somatic embryos were removed from the embryo- 159  
nal masses and transferred onto plant growth regulator- 160  
free MSG medium containing 90 mM sucrose and 161  
4 g L<sup>-1</sup> gellan gum. Light intensity was set at 162  
50 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> with a 16-h photoperiod. Somatic em- 163  
bryos germinated within 1 week and then developed into 164  
plantlets (i.e., germinated somatic embryos with aerial 165  
parts). ABA and L-glutamine were filter-sterilized and 166  
added to cooled autoclaved media. 167

168	<b>Cadmium treatment</b>	
169	Four-week-old plantlets were transferred onto germination	214
170	medium supplemented with 0, 250, or 500 $\mu\text{M}$ $\text{CdSO}_4$ accord-	215
171	ing to Moussavou Moudouma et al. (2013). Plantlets were	216
172	harvested after 2 and 4 weeks of Cd treatment. Roots were	217
173	incubated for 20 min in 10 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ to desorb Cd from	218
174	the root surface. Root and shoot fresh biomass was frozen in	219
175	liquid $\text{N}_2$ and stored at $-20^\circ\text{C}$ until analysis. Dry weights	220
176	were measured on samples dried in a ventilated oven at	221
177	$80^\circ\text{C}$ during 24 h.	222
178	<b>Photosynthetic pigment determination</b>	223
179	One hundred milligrams of fresh larch needles were ground at	224
180	$4^\circ\text{C}$ with 2 mL of 80 % (v/v) acetone and 0.5 % (w/v) $\text{MgCO}_3$	225
181	(Saladin et al. 2003a). After centrifugation at $4^\circ\text{C}$ for 15 min	226
182	at $12,000\times g$ , the supernatant was used to measure chloro-	227
183	phylls a and b as well as carotenoids by spectrophotometry	228
184	at wavelengths of 663, 647, and 470 nm, respectively.	229
185	Lichtenthaler equations were used to determine total chloro-	230
186	phyll and carotenoid levels (Lichtenthaler 1987).	231
187	<b>Total soluble carbohydrate and starch determination</b>	232
188	Two hundred milligrams of fresh shoots and roots was ground	233
189	at $4^\circ\text{C}$ with 2 mL of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5). After	234
190	centrifugation at $4^\circ\text{C}$ and $12,000\times g$ for 30 min, the superna-	235
191	tant was used for total soluble carbohydrate (TSC) assay	236
192	whereas the pellet was dissolved at $60^\circ\text{C}$ for 30 min in	237
193	1 mL of a solution containing 8 N dimethyl sulfoxide and	238
194	37 % HCl (4:1 v/v) for starch assay. TSC and starch were	239
195	quantified according to Saladin et al. (2003b and a,	240
196	respectively). TSCs were quantified by spectrophotometry at	241
197	625 nm after incubation at $100^\circ\text{C}$ for 10 min of 0.2 mL	242
198	sample with 1 mL reagent (0.1 % anthrone and 0.1 % thiourea	243
199	in 12.5 N $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), whereas starch was quantified at 600 nm by	244
200	mixing 0.1 mL sample at room temperature with 1 mL dis-	245
201	tilled water and 0.1 mL reagent (0.03 % $\text{I}_2$ and 0.06 % KI in	246
202	0.05 N HCl).	247
203	<b>Total soluble protein, total free amino acid, free proline,</b>	248
204	<b>and non-protein thiol determination</b>	249
205	For total soluble protein assay, 200 mg of fresh shoots or roots	250
206	was ground at $4^\circ\text{C}$ with 2 mL of 0.1 M Tris base buffer (pH 8)	251
207	containing 10 mM $\text{MgCl}_2$ and 5 mM EDTA (Moussavou	252
208	Moudouma et al. 2013). After centrifugation at $4^\circ\text{C}$ and 12,	253
209	$000\times g$ for 30 min, supernatants were concentrated with	254
210	Amicon Ultra-15 centrifugal filters (Millipore Corporation,	255
211	USA). Protein assay was performed on concentrated superna-	256
212	nts according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad	257
213	Protein Assay, Bio-Rad, Germany). For quantification of total	258
	free amino acids (TFAAs), proline, and non-protein thiols	259
	(NPTs), 200 mg of fresh shoots or roots was ground with	260
	2 mL of 10 % (w/v) trichloroacetic acid (TCA) containing	261
	6.3 mM diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA). After	262
	centrifugation at $4^\circ\text{C}$ and $12,000\times g$ for 30 min, the superna-	263
	tant was used for the three assays. TFAA and proline were	264
	quantified according to Saladin et al. (2003b). For TFAA,	265
	200 $\mu\text{L}$ sample was mixed with 100 $\mu\text{L}$ citrate buffer	266
	(0.2 M, pH 4.6) and 200 $\mu\text{L}$ ninhydrin reagent (0.003 % ascor-	267
	bic acid and 0.96 % ninhydrin in ethylene glycol monomethyl	268
	ether). After 20 min at $100^\circ\text{C}$ , 600 $\mu\text{L}$ ethanol (60 %) was	269
	added and absorbance was read at 570 nm. Proline was quan-	270
	tified by mixing 200 $\mu\text{L}$ sample with 800 $\mu\text{L}$ ninhydrin re-	271
	agent (1 % ninhydrin in a 60 % acetic acid solution). After	272
	20 min at $100^\circ\text{C}$ , 1 mL toluene was added and absorbance	273
	was read at 520 nm. NPTs were measured with Ellman's re-	274
	agent: 100 $\mu\text{L}$ of supernatant was mixed at room temperature	275
	with 100 $\mu\text{L}$ triethanolamine (50 % w/v), 800 $\mu\text{L}$ phosphate	276
	buffer (0.1 M, pH 7.5) containing 6.3 mM DTPA, and 50 $\mu\text{L}$	277
	of 10 mM 5,5'-dithiobis-2-nitro-benzoic acid. Absorbance	278
	was read after 5 min at 412 nm, and cysteine was used as a	279
	standard.	280
	<b>Quantification of thiobarbituric acid reactive substances</b>	281
	The supernatant used for the assay was the same than for	282
	TFAA, proline, and NPT assay. Thiobarbituric acid reactive	283
	substances (TBARSs), a by-product of lipid peroxidation,	284
	were quantified by spectrophotometry after incubation at	285
	$95^\circ\text{C}$ for 30 min of 200 $\mu\text{L}$ samples with 800 $\mu\text{L}$ of 20 %	286
	(w/v) TCA containing 0.5 % (w/v) 2-thiobarbituric acid ac-	287
	cording to Saladin et al. (2003b). Absorbance was read at	288
	532 nm and corrected by subtracting the value obtained at	289
	600 nm (non-specific absorbance).	290
	<b>Cd quantification</b>	291
	One hundred milligrams of fresh roots and 200 mg of fresh	292
	shoots were ground with 5 mL deionized water and centri-	293
	fuged at $20^\circ\text{C}$ for 20 min at $8000\times g$ . The supernatant (S1)	294
	was stored, and the pellet was successively suspended in	295
	10 mL of 80 % ethanol for 1 h, 10 mL chloroform/methanol	296
	(2:1 v/v) for 15 min, and 10 mL acetone (twice) for 15 min.	297
	After each mix, samples were centrifuged and the superna-	298
	nts were added to S1. The whole extract corresponded to	299
	the intracellular fraction, which was evaporated in a rotary	300
	evaporator to a final volume of 5 mL. After the last centri-	301
	fication, the pellet was subjected to acetone rinsing and filtra-	302
	tion on nylon mesh filter (pore size 11 $\mu\text{m}$ ). The residue, dried	303
	during 24 h in an oven at $80^\circ\text{C}$ , corresponded to the cell wall	304
	fraction. Cd content was measured for both intracellular and	305
	cell wall fraction according to Moussavou Moudouma et al.	306
	(2013): Samples were mixed with 6 mL of 69 % nitric acid	307



263 and 2 mL of 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and digested under microwave exposure (Multiwave 3000, Anton Paar, France). Cd was then 264 quantified by flame atomic absorbance spectrometer at 265 228.8 nm (SpectrAA 880Z, Varian, France). In addition, we 266 calculated the translocation factor (TF), i.e., the ratio of shoot 267 (needles and stem) Cd concentration to root Cd concentration 268 (Bonet et al. 2015). 269

270 **Statistical analyses**

271 All data are the mean of four independent experiments. 272 Biomass measurements were done on 10 to 20 plants per 273 independent experiment and per condition. Two-way 274 ANOVA test was performed with PAST software (version 275 2.17) to analyze the effect of Cd treatment, the duration of 276 exposure, and the interaction between both factors.

277 **Results**

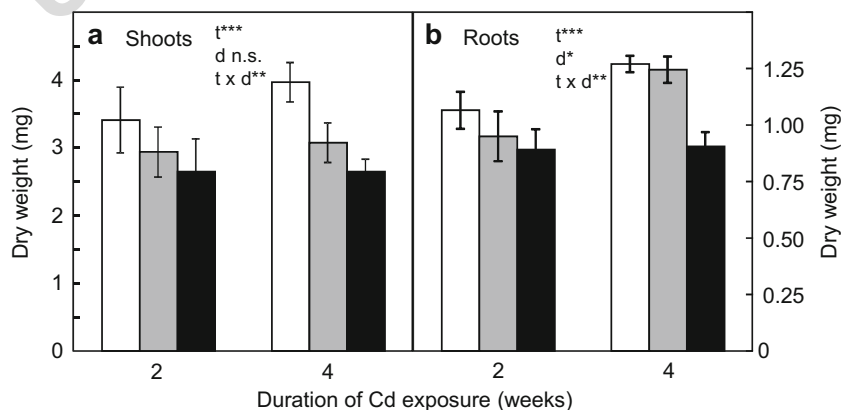
278 **Larch plantlet growth and carbon assimilation**

279 After 2-week exposure to Cd, dry biomass of shoots (Fig. 1a) 280 and roots (Fig. 1b) was not different from those of control 281 plantlets. After 4-week exposure to 250 μM Cd, root biomass 282 was not affected but aerial biomass was significantly reduced 283 by 20 % compared to the control. In the presence of 500 μM 284 Cd, aerial and underground biomasses were reduced by 33 285 and 28 %, respectively, in the same period. In parallel, we 286 found a lower number of needles and shorter roots, but the 287 water content was not modified (data not shown). The mea- 288 surement of total chlorophyll (Fig. 2a) and total carotenoid 289 (Fig. 2b) contents showed that exposure to 250 μM Cd did 290 not modify the concentration of these photosynthetic pigments

in plantlets. A decrease in pigment content was observed after 291 2-week exposure to 500 μM Cd, but the difference was not 292 significant compared to control. However, after 4 weeks, chlo- 293 rophyll and carotenoid concentrations dramatically decreased 294 by 65 and 60 %, respectively, compared to control. This de- 295 crease was easily seen as needles began to turn yellow. Results 296 showed that total soluble carbohydrate (TSC) content was not 297 significantly modified in the presence of Cd regardless to con- 298 centration, time of exposure, or organs (shoots or roots) 299 (Fig. 2c, d). In their aerial parts, plantlets exposed to 300 250 μM Cd had a starch content similar to that of the control 301 whereas starch concentration significantly increased by 53 302 and 59 % after 2 and 4-week exposure to 500 μM Cd, respec- 303 tively (Fig. 2e). In roots, starch content was significantly re- 304 duced by 22–23 % after 2 and 4 weeks in the presence of 305 500 μM Cd (Fig. 2f). Treatment with 250 μM Cd resulted in 306 a transient decrease by 30 % after 2 weeks, but this difference 307 vanished after 4 weeks. 308

309 **Effect of Cd on nitrogen nutrition**

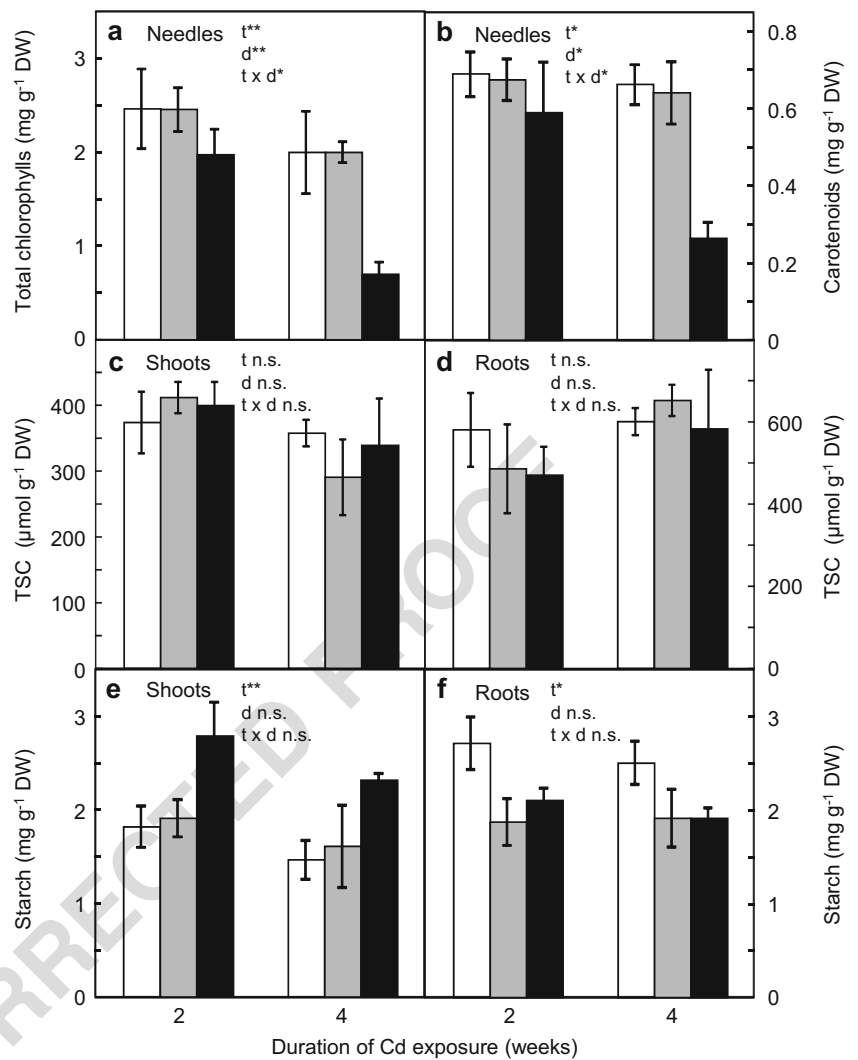
Total soluble protein content was not significantly modified in 310 aerial organs when plantlets were exposed to 250 μM Cd, 311 whereas it decreased by 20 % after exposure to 500 μM Cd 312 during 2 and 4 weeks (Fig. 3a). In roots, the treatment with 313 500 μM Cd reduced the soluble protein concentration by 25 % 314 after 2 and 4 weeks of exposure (Fig. 3b). The 250 μM Cd 315 treatment increased soluble protein concentration by 20 % 316 after 2 weeks, but protein content was 20 % lower than control 317 after 4 weeks of treatment. TFAA concentration was doubled 318 after 2-week exposure to 250 μM Cd and increased by 37 % 319 after 4 weeks, whereas it decreased by 36 % after 4 weeks in 320 the presence of 500 μM Cd (Fig. 3c). In roots, TFAA content 321 was reduced by 47 and 41 % after 2 and 4-week exposure to 322



**Fig. 1** Effect of Cd on shoot (a) and root (b) biomass of hybrid larch after 2 and 4 weeks of treatment. Control plants (i.e., plants not exposed to Cd) and plants treated with 250 and 500 μM Cd correspond to white, gray, and black bars, respectively. Data are mean ± standard error of four independent experiments with 10 to 20 plants per independent

experiment and per condition. Asterisks indicate significant differences (\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001), and *n.s.* indicates no significant differences between treatments (*t*), durations of exposure (*d*), and interaction between both factors (*t* × *d*)

**Fig. 2** Effect of Cd on carbon nutrition of hybrid larch after 2 and 4 weeks of exposure. Total chlorophyll (a) and carotenoid (b) contents were measured in needles. Total soluble carbohydrate (TSC) (c, d) and starch (e, f) contents were assayed on shoots and roots. Control plants and plants treated with 250 and 500  $\mu\text{M}$  Cd correspond to *white, gray, and black bars*, respectively. Data are mean  $\pm$  standard error of four independent experiments. Asterisks indicate significant differences ( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ), and *n.s.* indicates no significant differences between treatments (*t*), durations of exposure (*d*), and interaction between both factors (*t*  $\times$  *d*)



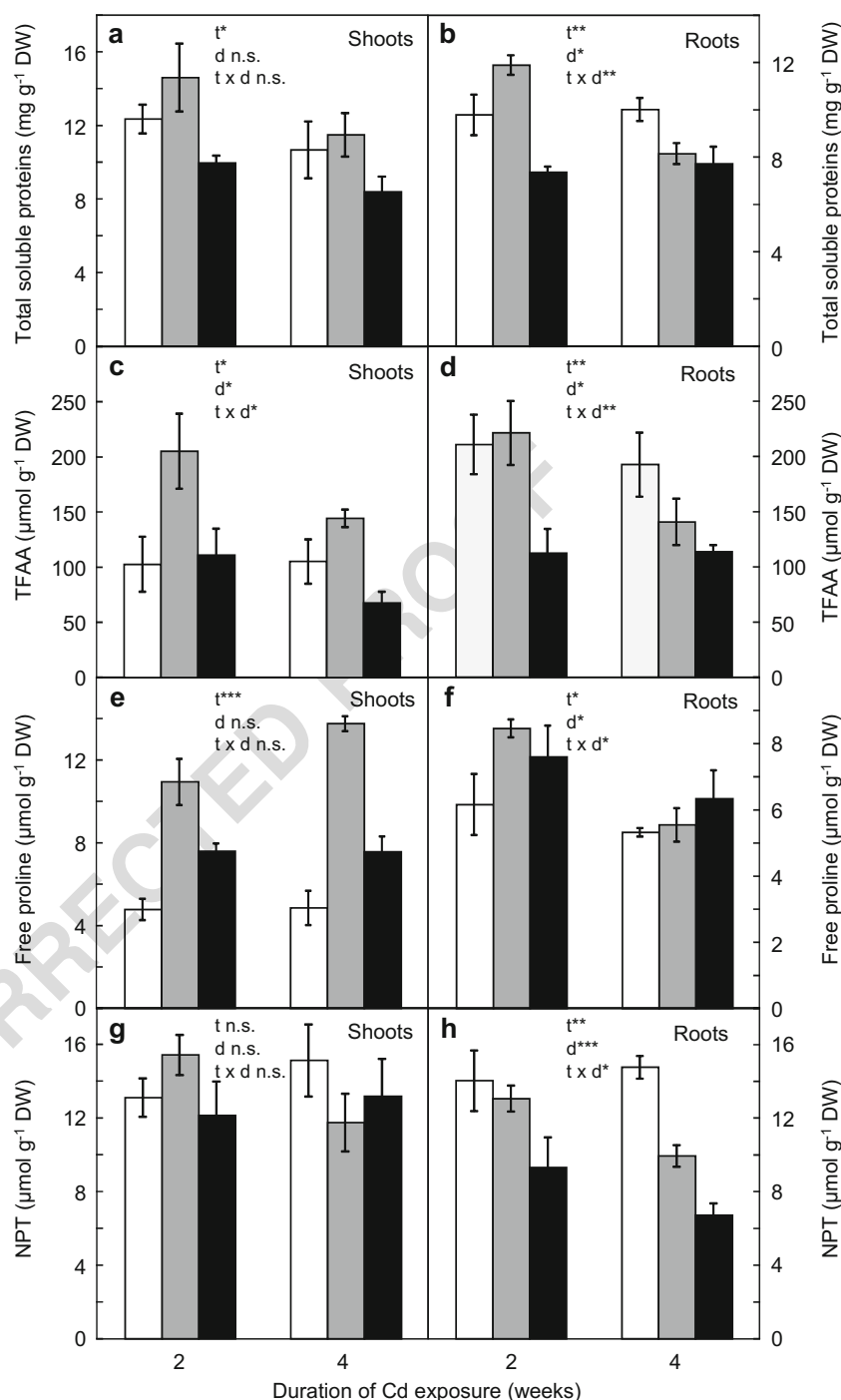
323 500  $\mu\text{M}$  Cd, respectively, whereas no significant difference  
 324 with control was recorded when plantlets were grown in the  
 325 presence of 250  $\mu\text{M}$  Cd (Fig. 3d). Free proline significantly  
 326 accumulated in shoots by factors 2.3 and 2.8 after 2 and  
 327 4-week exposure to 250  $\mu\text{M}$  Cd, respectively (Fig. 3e). This  
 328 accumulation was less important with the 500  $\mu\text{M}$  Cd treat-  
 329 ment as proline concentration increased by a factor 1.6. In  
 330 roots, the only significant difference compared to control  
 331 was a transient 37 % increase after 2 weeks in the presence  
 332 of 250  $\mu\text{M}$  Cd (Fig. 3f). Concerning NPT content, no signif-  
 333 icant difference between control and treated plantlets was ob-  
 334 served in aerial organs (Fig. 3g). In roots, Cd reduced NPT  
 335 concentration by 33 and 54 % after 2 and 4 weeks in the  
 336 presence of 500  $\mu\text{M}$  Cd, respectively, whereas it decreased  
 337 only after 4 weeks (by 33 %) on 250  $\mu\text{M}$  Cd (Fig. 3h).

338 **Peroxidation level and Cd distribution in larch plantlet**

339 Results showed that TBARS content was quite similar in control  
 340 and Cd-exposed plantlets in both aerial and underground

organs (Fig. 4a, b). In shoots, Cd concentration in cell wall  
 341 increased from 0.11 to 0.18  $\text{mg g}^{-1}$  DW between 2 and 4-  
 342 week exposure to 250  $\mu\text{M}$ , whereas in the same time course,  
 343 Cd concentration in the intracellular fraction remained constant  
 344 around 0.2  $\text{mg g}^{-1}$  DW (Fig. 5a). In the presence of  
 345 500  $\mu\text{M}$  Cd, shoot Cd concentration in the cell wall was more  
 346 important than in the intracellular fraction. Indeed, Cd con-  
 347 centrations in cell wall and intracellular fractions were 0.33  
 348 and 0.21  $\text{mg g}^{-1}$  DW, respectively, after 2 weeks and 0.37 and  
 349 0.26  $\text{mg g}^{-1}$  DW after 4 weeks. Cd concentration was higher  
 350 in roots than in shoots and much more important in the intra-  
 351 cellular fraction than in cell wall, irrespective of Cd concen-  
 352 tration or exposure time (Fig. 5b). Cd concentration in the  
 353 intracellular fraction increased from 0.8 to 1.2  $\text{mg g}^{-1}$  DW  
 354 after 2 and 4-week exposure to 250  $\mu\text{M}$  Cd, respectively,  
 355 and from 1.1 to 1.8  $\text{mg g}^{-1}$  DW in the presence of 500  $\mu\text{M}$   
 356 Cd. Cd concentration in cell wall was around 0.14 and  
 357 0.1  $\text{mg g}^{-1}$  DW in the presence of 250 and 500  $\mu\text{M}$  Cd,  
 358 respectively. The TF was around 0.3 for both treatments after  
 359 2 weeks and decreased after 4 weeks: It was 0.20 and 0.24 in  
 360

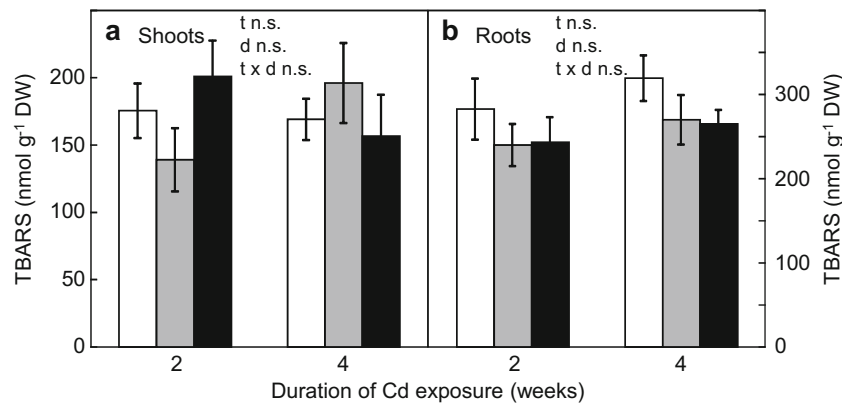
**Fig. 3** Effect of Cd on nitrogen nutrition of hybrid larch after 2 and 4 weeks of exposure. Total soluble protein (a, b), total free amino acid (TFAA) (c, d), free proline (e, f), and non-protein thiol (NPT) (g, h) contents were assayed on shoots and roots. Control plants and plants treated with 250 and 500  $\mu\text{M}$  Cd correspond to white, gray, and black bars, respectively. Data are mean  $\pm$  standard error of four independent experiments. Data are mean  $\pm$  standard error of four independent experiments. Asterisks indicate significant differences ( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ), and *n.s.* indicates no significant differences between treatments (*t*), durations of exposure (*d*), and interaction between both factors (*t*  $\times$  *d*)



361 the presence of 250 and 500  $\mu\text{M}$  Cd, respectively. We estimat-  
 362 ed Cd repartition between shoots and roots and found that  
 363 around 50 % of accumulated Cd was stored in shoots for both  
 364 Cd conditions after 2 weeks. After 4 weeks, the percentage of  
 365 Cd accumulated in shoots decreased as Cd concentration in  
 366 roots increased faster than in shoots. Thus, after 4 weeks, the  
 367 Cd amount in aerial organs corresponded to 30 and 40 % of  
 368 total Cd accumulated in plantlets in the presence of 250 and  
 369 500  $\mu\text{M}$  Cd, respectively.

**Discussion**

Results showed that a high concentration of 500  $\mu\text{M}$  Cd began  
 to slow down plantlet growth after 4 weeks of exposure:  
 Biomass of both shoots and roots was reduced by 30 % com-  
 pared to control, and the photosynthetic pigment content dra-  
 matically decreased. However, TSC content remained close to  
 control, and starch concentration increased in shoots whereas  
 it decreased in roots. This suggests that carbohydrate



**Fig. 4** Effect of Cd on shoot (a) and root (b) thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) content in hybrid larch after 2 and 4 weeks of treatment. Control plants and plants treated with 250 and 500 μM Cd correspond to *white*, *gray*, and *black bars*, respectively. Data are mean

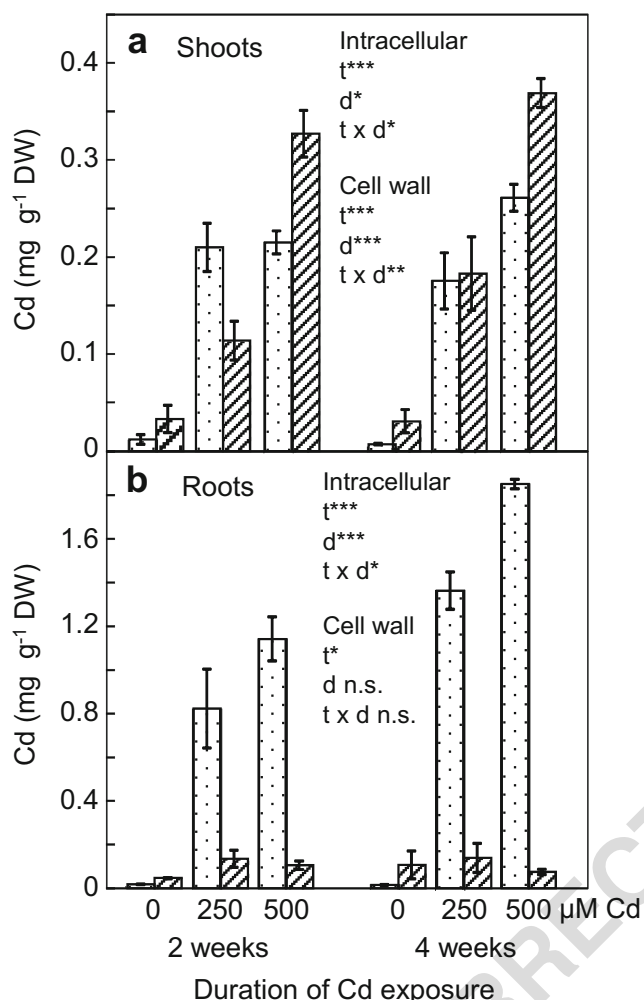
± standard error of four independent experiments. Asterisks indicate significant differences (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ), and *n.s.* indicates no significant differences between treatments (*t*), durations of exposure (*d*), and interaction between both factors (*t × d*)

378 translocation from shoots to roots was slowed down maybe to  
 379 maintain a high level of carbohydrates in aerial organs to  
 380 protect as long as possible the photosynthetic apparatus which  
 381 is more sensitive to Cd (Cho and Seo 2005). Starch accumu-  
 382 lation without perceptible decrease in TSC content has already  
 383 been observed in vitro in grapevine in response to salt stress  
 384 and in apple plantlets infected by pathogenic bacteria  
 385 (Oliveira et al. 2009; Giorno et al. 2013). Moreover, it is possi-  
 386 ble that plantlets absorbed soluble carbohydrates from the  
 387 culture medium to maintain a high pool of carbohydrates as  
 388 previously observed on in vitro grown grapevine exposed to  
 389 flumioxazin, a herbicide altering photosynthesis activity  
 390 (Saladin et al. 2003c). Compared to exposure to 500 μM  
 391 Cd, stress was less obvious when plantlets were exposed to  
 392 250 μM Cd for 4 weeks as only aerial biomass decreased  
 393 whereas photosynthetic pigment, TSC, and shoot starch con-  
 394 centrations remained unchanged. The decrease in root starch  
 395 level may be a first index of reserve hydrolysis to increase  
 396 TSC and counteract the stress generated by Cd.

397 Cd exposure modified nitrogen nutrition in plantlets.  
 398 Soluble protein concentration rapidly decreased when plant-  
 399 lets were grown in the presence of 500 μM Cd in both shoots  
 400 and roots. It has been reported that Cd is involved in protein  
 401 oxidation and cross-linking and inhibits enzyme activities  
 402 (Farid et al. 2013). In the present study, Cd probably generated  
 403 protein degradation and/or slowing down of protein synthesis.  
 404 When plantlets were exposed to 250 μM Cd, protein content  
 405 was not modified in shoot, suggesting that plantlets can toler-  
 406 ate this Cd concentration. Protein level in roots decreased only  
 407 after 4 weeks of exposure, after a 20 % transient increase that  
 408 might indicate an induction of defense mechanisms after  
 409 2 weeks. An increase in total protein content has been ob-  
 410 served in *Sorghum bicolor* exposed to Cd (Muratova et al.  
 411 2015). Several proteins such as heat shock proteins, protein-  
 412 ases, pathogenesis-related proteins, or glutathione-S-  
 413 transferases have been reported to be induced as a response

414 to Cd (Tran and Popova 2013). In addition to potential induc-  
 415 tion of defense proteins, our results showed that in the pres-  
 416 ence of this Cd concentration (250 μM), free proline content  
 417 in roots was higher than control after 2 weeks of treatment and  
 418 close to control after 4 weeks. Proline is not only an  
 419 osmoprotectant but also a free radical and Cd scavenger, sug-  
 420 gesting that roots enhanced defense pathways against oxida-  
 421 tion and stimulated Cd chelation (Rai 2002; Szabados and  
 422 Savouré 2010). In roots of plantlets treated with 500 μM Cd,  
 423 proline concentration remained close to control. Moreover,  
 424 results showed that proline content in shoots was higher than  
 425 in control and that this content was at the highest level when  
 426 plantlets were exposed to 250 μM Cd, indicating that antiox-  
 427 idative defenses and/or Cd scavenging would be more effi-  
 428 cient with this lower Cd concentration. In addition, in the  
 429 presence of this Cd concentration, TFAA content in shoots  
 430 was higher than in the control (without decrease of total pro-  
 431 tein content) contrary to what happened in the presence of  
 432 500 μM Cd, highlighting probably an increased biosynthesis  
 433 of amino acids. It has been reported that a high content in  
 434 foliar amino acids can play an important role in maintaining  
 435 both chlorophyll synthesis and integrity of cell structure and  
 436 can reduce DNA and RNA degradation caused by stress  
 437 (Sadak et al. 2015). According to the present study, it appears  
 438 that the strategy of plantlets to counteract Cd stress was to  
 439 stimulate nitrogen metabolism in order to maintain carbon  
 440 metabolism and thus plant growth.

441 The NPT content mainly corresponds to the oligopeptides  
 442 glutathione, an antioxidant compound, and phytochelatins  
 443 which are molecules able to bind Cd via the sulfhydryl group  
 444 of the cysteine residue (Yadav 2010). Results showed that NPT  
 445 content was not modified in shoots after Cd exposure and that a  
 446 decrease occurred in roots after 2 weeks of exposure to 500 μM  
 447 Cd and after 4 weeks in the presence of 250 μM Cd. This result  
 448 suggests that NPT would not be involved in defense against Cd  
 449 in larch. We previously showed that NPT content as well as the



**Fig. 5** Accumulation of Cd in shoots (a) and roots (b) of hybrid larch after 2 and 4 weeks of treatment. Bars with dots and hatching correspond to Cd concentration in intracellular and cell wall fractions, respectively. Data are mean  $\pm$  standard error of four independent experiments. Asterisks indicate significant differences (\* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001), and n.s. indicates no significant differences between treatments ( $t$ ), durations of exposure ( $d$ ), and interaction between both factors ( $t \times d$ ) for intracellular and cell wall Cd concentrations

450 activity of enzymes involved in glutathione and phytochelatin  
 451 biosynthesis increased in both shoots and roots by a factor 1.5 to  
 452 1.8 when plantlets were exposed during 1 week to 1.5 mM Cd  
 453 (Moussavou Moudouma et al. 2013). It is thus possible that  
 454 NPT synthesis is early and transiently stimulated in larch plant-  
 455 lets in response to Cd, but NPT would not play a prominent role  
 456 in long-term tolerance to this TE. However, Fernández et al.  
 457 (2014a) showed that *Dittrichia viscosa* grown in vitro on a  
 458 nutrient-rich culture medium and exposed to Cd exhibited lower  
 459 NPT content (glutathione and phytochelatin) than plantlets  
 460 grown on this culture medium diluted to 1/2 and to 1/4. The  
 461 authors highlighted that mineral elements in the culture medium  
 462 could interfere with Cd uptake and phytochelatin synthesis  
 463 when their concentration was high. In our previous work  
 464 (Moussavou Moudouma et al. 2013), interferences were maybe

quite low after 1 week of exposure to Cd, but in this present  
 study, it is possible that the high nutrient concentration disturbed  
 NPT synthesis. Furthermore, other molecules can be involved in  
 Cd chelation such as organic acid or polyamines as reported in  
 willow species by Zacchini et al. (2011). In addition, it has been  
 shown that *Noccaea caerulescens*, a Cd/Zn hyperaccumulator,  
 does not stimulate phytochelatin synthesis but enhances the  
 synthesis of antioxidant enzymes (Hernández-Allicia et al.  
 2006; Liu et al. 2008). Our results suggest that larch tolerance  
 can be explained by antioxidant defenses such as, for example,  
 proline synthesis and maybe ligands other than phytochelatin.  
 It has been reported that exogenous proline enhanced the toler-  
 ance to low temperature and NaCl of embryogenic cultures of  
 hybrid larch, sitka spruce, and oak (Gleeson et al. 2004).  
 Moreover, Gleeson et al. (2005) showed that a surexpression  
 of pyrroline 5-carboxylate synthase in hybrid larch enhanced  
 endogenous proline synthesis and resulted in higher tolerance  
 to cold and salinity. This highlights the important role of proline  
 in protecting larch against abiotic stress. In the present work, we  
 showed that no lipid peroxidation occurred (TBARS level  
 remained close to control values) indicating that under our exper-  
 imental conditions, plantlets were able to counteract the Cd-  
 generated oxidative stress.

The quantification of Cd showed that concentration was  
 higher in roots than in shoots, a distribution that has often been  
 observed in herbaceous as well as tree species, even in Cd  
 hyperaccumulators (Fernández et al. 2008; Wang et al. 2008;  
 Liu et al. 2009; Wu et al. 2010; Di Lonardo et al. 2011). In  
 roots, Cd concentration was much higher in the intracellular  
 fraction than in the cell wall that may promote Cd transfer  
 from roots to shoots. Cd which accumulates in the cell wall  
 generally binds to cell wall components such as pectins and  
 hemicellulose (Zhu et al. 2013). Zhu et al. (2013) showed that  
 an increase in hemicellulose content of root cell walls reduced  
 the translocation of Cd from roots to shoots. In aerial organs of  
 the hybrid larch, Cd concentration was always higher in cell  
 wall when plantlets were exposed to 500  $\mu$ M Cd, suggesting  
 that cell wall may be an efficient storage compartment for Cd.  
 Results showed that in the presence of 250  $\mu$ M Cd, Cd con-  
 centration in shoots was first higher in the intracellular fraction  
 (after 2 weeks) and then similar in both fractions (after  
 4 weeks). This confirmed the storage of Cd in cell wall when  
 Cd concentration increased in aerial organs. A study on the Cd  
 hyperaccumulator *Impatiens walleriana* showed similar Cd  
 distribution, i.e., a lower cell wall accumulation of Cd in roots  
 (compared to intracellular fraction) and a higher storage in this  
 compartment in shoots (Lai 2015). However, in other plants,  
 cell wall is the main accumulation compartment for Cd in both  
 roots and shoots from 50 to 60 % in rice (non-  
 hyperaccumulator) (He et al. 2008; Liu et al. 2014) and  
*Bechmeria nivea* (Cd hyperaccumulator) (Wang et al. 2008)  
 up to 95 % in the Cd hyperaccumulator *D. viscosa* (Fernández  
 et al. 2014b). Cd distribution between cell wall and

518 intracellular fraction would thus depend not only on the Cd  
519 concentration in soil but also on the plant species regardless of  
520 its level of Cd tolerance.

521 Whatever the time of exposure and the Cd concentration in  
522 culture medium, Cd concentration in aerial organs of larch  
523 plantlets (0.2 to 0.3 mg g<sup>-1</sup> DW) was higher than the threshold  
524 of 0.1 g kg<sup>-1</sup> DW requested for Cd hyperaccumulators (Baker  
525 and Brooks 1989). In a previous work, we showed that the  
526 growth of hybrid larch plantlets exposed to 1.5 mM Cd for  
527 1 week was not modified (compared to control) and that plant-  
528 lets exhibited a shoot Cd concentration of 0.21 mg g<sup>-1</sup> DW  
529 (Moussavou Moudouma et al. 2013). As plantlets began to  
530 turn yellow a couple of days later in response to this Cd ex-  
531 posure, Cd concentration probably increased in shoots and  
532 this concentration was toxic for plantlets. As growth was re-  
533 duced and photosynthetic pigment content strongly decreased  
534 after 4 weeks on 500 μM Cd (but without increase in TBARS  
535 content), the beginning of toxicity caused by Cd could corre-  
536 spond to a Cd concentration in shoots slightly higher than  
537 0.3 mg g<sup>-1</sup> DW. The Cd concentrations we measured were  
538 within the same range as other values detected in tree species  
539 grown *in vitro*. Indeed, several clones of *Betula celtiberica*  
540 and *Populus alba* exhibited a Cd concentration in shoots be-  
541 tween 0.3–0.4 and 0.3–0.6 mg Cd g<sup>-1</sup> DW, respectively  
542 (Fernández et al. 2008; Di Lonardo et al. 2011). Our results  
543 indicated that larch was able to translocate Cd to shoots.  
544 However, TF was around 0.3 after 2 weeks of treatment and  
545 0.2–0.24 after 4 weeks, indicating a slowdown of transloca-  
546 tion. As a result, 50 % of total absorbed Cd accumulated in  
547 shoots after 2 weeks of exposure and 30 to 40 % after 4 weeks.  
548 A similar decrease in Cd translocation was observed by Wang  
549 et al. (2008) in *B. nivea*, and the authors suggested that this  
550 modification was related to internal barriers to protect aerial  
551 organs. In many hyperaccumulators, TF is equal to 1 or higher  
552 (Liu et al. 2009), but this was not currently the case for the  
553 larch plantlets. However, as previously mentioned, Cd con-  
554 centration is often higher in roots than shoots, even for some  
555 Cd hyperaccumulators. For example, *in vitro* grown *Prosopis*  
556 *laevigata* seedlings exposed for 50 days to 0.3 and 0.65 mM  
557 Cd showed TF around 0.4 although this species is considered  
558 as a potential Cd hyperaccumulator (Buendía-González et al.  
559 2010).

560 **Conclusion**

561 We showed that hybrid larch plantlets were able to tolerate a  
562 high Cd concentration for at least 4 weeks and that proline  
563 may play an important role in this tolerance as antioxidant  
564 and/or Cd-chelating compound. Moreover, Cd concentration  
565 in roots was much higher in the intracellular fraction than in  
566 the cell wall, promoting a Cd translocation to shoots. In  
567 shoots, Cd concentration exceeded the threshold of Cd

hyperaccumulators, indicating that hybrid larch may be a 568  
promising candidate for phytoextraction (despite the low TF 569  
compared with several Cd hyperaccumulators). However, Cd 570  
was freely bioavailable in the culture medium; thus, field tests 571  
are required to establish whether hybrid larch can be recom- 572  
mended for Cd phytoextraction. Indeed, there are complex 573  
interactions in field between root systems, microorganisms, 574  
soil, and climatic conditions. However, assisted 575  
phytoextraction with synthetic or natural amendments can be 576  
a good strategy to improve bioavailability of TE as well as 577  
nutrients and arbuscular mycorrhizal fungi. 578

**Acknowledgments** Amandine Bonet was supported by a PhD grant 579  
from the Region Limousin (France). The authors thank Nafissa Dorinhié 580  
for her work during her first year of Master's Degree and Pr. Michel 581  
Guilloton for help in manuscript editing. 582

**References** 583

Ali H, Khan E, Sajad MA (2013) Phytoremediation of heavy metals— 585  
concepts and applications. *Chemosphere* 91:869–881 586

Amouei AI, Amooey AA, Asgharzadeh F (2013) Cadmium removal 587  
from aqueous solution by canola residues: adsorption equilibrium 588  
and kinetics. *Iran J Chem Eng* 10:39–50 589

Baker AJM, Brooks RR (1989) Terrestrial higher plants which 590  
hyperaccumulate metallic elements: a review of their distribution, 591  
ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1:81–126 592

Balsberg Pålsson AM (1989) Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) 593  
to vascular plants. *Water Air Soil Poll* 47:287–319 594

Becwar MR, Nagmani R, Wann SR (1990) Initiation of embryogenic 595  
cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus* 596  
*taeda*). *Can J For Res* 20:810–817 597

Bonet A, Pascaud G, Faugeton C, Soubrand M, Joussein E, Gloaguen V, 598  
Saladin G (2015) Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) plantlets re- 599  
sponses to As, Pb, and Sb-contaminated soils from former mines. *Int* 600  
*J Phytoremed*. doi:10.1080/15226514.2015.1086297 601

Buendía-González L, Orozco-Villafuerte J, Cruz-Sosa F, Barrera-Díaz 602  
CE, Vernon-Carter EJ (2010) *Prosopis laevigata* a potential chromi- 603  
um (VI) and cadmium (II) hyperaccumulator desert plant. *Bioresour* 604  
*Technol* 101:5862.5867 605

Cho UH, Seo NH (2005) Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* ex- 606  
posed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant* 607  
*Sci* 168:113–120 608

Clemens S (2006) Toxic metal accumulation, responses to exposure and 609  
mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88:1707–1719 610

DalCorso G, Farinati S, Maistri S, Furini A (2008) How plants cope with 611  
cadmium: staking all on metabolism and gene expression. *J Integr* 612  
*Plant Biol* 50:1268–1280 613

Di Lonardo S, Capuana M, Ametoli M, Gabbrielli R, Gonnelli C (2011) 614  
Exploring the metal phytoremediation potential of three *Populus* 615  
*alba* L. clones using an *in vitro* screening. *Environ Sci Pollut Res* 616  
18:82–90 617

Farid M, Shakoor MB, Ehsan S, Ali S, Zubair M, Hanif MA (2013) 618  
Morphological, physiological and biochemical responses of differ- 619  
ent plant species to Cd stress. *Int J Chem Biochem Sci* 3:53–60 620

Fernández R, Bertrand A, Casares A, García R, González A, Tamés RS 621  
(2008) Cadmium accumulation and its effect on the *in vitro* growth 622  
of woody fleabane and mycorrhized white birch. *Environ Pollut* 623  
152:522–529 624

625 Fernández R, Fernández-Fuego D, Rodríguez-González P, García Alonso  
626 JI, Bertrand A, González A (2014a) Cd-induced phytochelatin syn-  
627 thesis in *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter is determined by the dilution  
628 of the culture medium. *Environ Sci Pollut Res* 21:1133–1145

629 Fernández R, Fernández-Fuego D, Bertrand A, González A (2014b)  
630 Strategies for Cd accumulation in *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter:  
631 role of the cell wall, non-protein thiols and organic acids. *Plant*  
632 *Physiol Biochem* 78:63–70

633 Fischerová Z, Tlustoš P, Száková J, Šichorová K (2006) A comparison of  
634 phytoremediation capability of selected plant species for given trace  
635 elements. *Environ Pollut* 144:93–100

636 Gallego SM, Pena LB, Barcia RA, Azpilicueta CE, Iannone MF, Rosales  
637 EP, Zawoznik MS, Groppa MD, Benavides MP (2012) Unravelling  
638 cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory  
639 mechanisms. *Environ Exp Bot* 83:33–46

640 Giomo F, Guerriero G, Biagetti M, Ciccotti AM, Baric S (2013) Gene  
641 expression and biochemical changes of carbohydrate metabolism in  
642 *in vitro* micro-propagated apple plantlets infected by ‘*Candidatus*  
643 *Phytoplasma mali*’. *Plant Physiol Biochem* 70:311–317

644 Gleeson D, Lelu-Walter MA, Parkinson M (2004) Influence of exoge-  
645 nous L-proline on embryogenic cultures of larch (*Larix*  
646 *leptoeuropaea* Dengler), sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.)  
647 Carr.) and oak (*Quercus robur* L.) subjected to cold and salt stress.  
648 *Ann For Sci* 61:125–128

649 Gleeson D, Lelu-Walter MA, Parkinson M (2005) Overproduction of  
650 proline in transgenic hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*  
651 (*Dengler*)) cultures renders them tolerant to cold, salt and frost.  
652 *Mol Breed* 15:21–29

653 He JY, Zhu C, Ren YF, Yan YP, Cheng C, Jiang DA, Sun ZX (2008)  
654 Uptake, subcellular distribution, and chemical forms of cadmium in  
655 wild-type and mutant rice. *Pedosphere* 18:371–377

656 He J, Ma C, Ma Y, Li H, Kang J, Liu T, Polle A, Peng C, Luo ZB (2013)  
657 Cadmium tolerance in six poplar species. *Environ Sci Pollut Res* 20:  
658 163–174

659 Hernández-Allicia J, Garbisu C, Becerril JM, Barrutia O, García-Plazaola  
660 JI, Zhao FJ, McGrath SP (2006) Synthesis of low molecular weight  
661 thiols in response to Cd exposure in *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell*  
662 *Environ* 29:1422–1429

663 Lai HY (2015) Subcellular distribution and chemical forms of cadmium  
664 in *Impatiens walleriana* in relation to its phytoextraction potential.  
665 *Chemosphere* 138:370–376

666 Lelu-Walter MA, Pâques LE (2009) Simplified and improved somatic  
667 embryogenesis of hybrid larches (*Larix x eurolepis* and *Larix x*  
668 *marschlinii*). Perspectives for breeding. *Ann For Sci* 66:104

669 Lelu-Walter MA, Teyssier C, Guérin V, Pâques LE (2015). Vegetative  
670 propagation of larch species: somatic embryogenesis improvement  
671 towards its integration in breeding programs. In: Park YS, Bonga  
672 JM, Moon HK (eds). *Vegetative Propagation of Forest Trees*.  
673 National Institute of Forest Science. Seoul, Korea, in press.

674 Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of pho-  
675 tosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol* 148:350–382

676 Liu MQ, Yanai J, Jiang RF, Zhang F, McGrath SP, Zhao FJ (2008) Does  
677 cadmium play a physiological role in the hyperaccumulator *Thlaspi*  
678 *caerulescens*? *Chemosphere* 71:1276–1283

679 Liu Z, He X, Chen W, Yuan F, Yan K, Tao D (2009) Accumulation and  
680 tolerance characteristics of cadmium in a potential  
681 hyperaccumulator—*Lonicera japonica* Thunb. *J Hazard Mater*  
682 169:170–175

683 Liu JG, Qu P, Zhang W, Dong Y, Li L, Wang MX (2014) Variations  
684 among rice cultivars in subcellular distribution of Cd: the relation-  
685 ship between translocation and grain accumulation. *Environ Exp*  
686 *Bot* 107:25–31

687 Marmiroli M, Pietrini F, Maestri E, Zacchini M, Marmiroli N, Massacci A  
688 (2011) Growth, physiological and molecular traits in Salicaceae  
689 trees investigated for phytoremediation of heavy metals and org-  
690 anics. *Tree Physiol* 31:1319–1334

Moussavou Moudouma CF, Riou C, Goaguen V, Saladin G (2013)  
691 Hybrid larch (*Larix x eurolepis* Henry): a good candidate for cad-  
692 mium phytoremediation? *Environ Sci Pollut Res* 20:1889–1894 693

Muratova A, Lyubun Y, German K, Turkovskaya O (2015) Effect of  
694 cadmium stress and inoculation with a heavy-metal-resistant bacte-  
695 rium on the growth and enzyme activity of *Sorghum bicolor*.  
696 *Environ Sci Pollut Res* 22:16098–16109 697

Oliveira H, Barros AS, Delgadillo I, Coimbra MA, Santos C (2009)  
698 Effects of fungus inoculation and salt stress on physiology and bio-  
699 chemistry of *in vitro* grapevines: emphasis on sugar composition  
700 changes by FT-IR analyses. *Environ Exp Bot* 65:1–10 701

Pulford ID, Watson C (2003) Phytoremediation of heavy metal-  
702 contaminated land by trees—a review. *Environ Int* 29:529–540 703

Rai VK (2002) Role of amino acids in plant responses to stresses. *Biol*  
704 *Plantarum* 45:481–487 705

Sadak MSH, Abdelhamid MT, Schmidhalter U (2015) Effect of foliar  
706 application of amino acids on plant yield and some physiological  
707 parameters in bean plants irrigated with seawater. *Acta Biol Colomb*  
708 20:141–152 709

Saladin G (2015) Phytoextraction of heavy metals: the potential efficien-  
710 cy of conifers. In: Sherameti I, Varma A (eds) *Heavy metal contam-*  
711 *ination of soils: monitoring and remediation*, vol 44, *Soil Biology*.  
712 Springer, Switzerland, pp 333–353 713

Saladin G, Magné C, Clément C (2003a) Effects of flumioxazin herbicide on  
714 carbon nutrition of *Vitis vinifera* L. *J Agric Food Chem* 51:4017–4022 715

Saladin G, Magné C, Clément C (2003b) Stress effects of flumioxazin  
716 herbicide on grapevine (*Vitis vinifera* L.) grown *in vitro*. *Plant Cell*  
717 *Rep* 21:1221–1227 718

Saladin G, Magné C, Clément C (2003c) Impact of flumioxazin herbicide  
719 on growth and carbohydrate physiology in *Vitis vinifera* L. *Plant*  
720 *Cell Rep* 21:821–827 721

Smykalova I, Vrbova M, Tejklova E, Vetrovcova M, Griga M (2010)  
722 Large scale screening of heavy metal tolerance in flax / linseed  
723 (*Linum usitatissimum* L.) tested *in vitro*. *Ind Crop Prod* 32:527–533 724

Szabados L, Savouré A (2010) Proline: a multifunctional amino acid.  
725 *Trends Plant Sci* 15:89–97 726

Tran TA, Popova LP (2013) Functions and toxicity of cadmium in plants:  
727 recent advances and future prospects. *Turk J Bot* 37:1–13 728

Van der Ent A, Baker AJM, Reeves RD, Pollard AJ, Schat H (2012)  
729 Hyperaccumulators of metal and metalloids trace elements: facts  
730 and fiction. *Plant Soil* 362:319–334 731

Vigil M, Marey-Pérez MF, Martínez Huerta G, Álvarez Cabal V (2015) Is  
732 phytoremediation without biomass valorization sustainable?—com-  
733 parative LCA of landfilling vs. anaerobic co-digestion. *Sci Tot*  
734 *Environ* 505:844–850 735

Wang X, Liu Y, Zeng G, Chai L, Song X, Min Z, Xiao X (2008)  
736 Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in  
737 *Bechmeria nivea* (L.) Gaud. *Environ Exp Bot* 62:389–395 738

Wu F, Yang W, Zhang J, Zhou L (2010) Cadmium accumulation and  
739 growth responses of a poplar (*Populus deltoides* x *Populus nigra*)  
740 in cadmium contaminated purple soil and alluvial soil. *J Hazard*  
741 *Mater* 177:268–273 742

Yadav SK (2010) Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role  
743 of glutathione and phytochelatin in heavy metal stress tolerance of  
744 plants. *S Afr J Bot* 76:167–179 745

Zacchini M, Iori V, Scarascia Mugnozza G, Pietrini F, Massacci A (2011)  
746 Cadmium accumulation and tolerance in *Populus nigra* and *Salix*  
747 *alba*. *Biol Plantarum* 55:383–386 748

Zhu XF, Wang ZW, Dong F, Lei GJ, Shi YZ, Li GX, Zheng SJ (2013)  
749 Exogenous auxin alleviates cadmium toxicity in *Arabidopsis*  
750 *thaliana* by stimulating synthesis of hemicellulose 1 and increasing  
751 the cadmium fixation capacity of root cell walls. *J Hazard Mater*  
752 263:398–403 753

## Douglas fir (*pseudotsuga menziesii*) plantlets responses to as, Pb, and sb-contaminated soils from former mines

Amandine Bonet<sup>a</sup>, Grégoire Pascaud<sup>b</sup>, Céline Faugeron<sup>a</sup>, Marilyne Soubrand<sup>b</sup>, Emmanuel Joussein<sup>b</sup>, Vincent Gloaguen<sup>a</sup>, and Gaëlle Saladin<sup>a</sup>

5 <sup>a</sup>Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN EA), Université de Limoges, Faculté des Sciences et Techniques, avenue Albert Thomas, Limoges Cedex (France); <sup>b</sup>Groupement de Recherche Eau Sol Environnement (GRESE EA), Université de Limoges, Faculté des Sciences et Techniques, avenue Albert Thomas, Limoges Cedex (France)

### ABSTRACT

10 Phytoremediation of metalloids by conifers is not widely studied although they may be relevant for several contaminated sites, especially those located in cold areas and sometimes under dry climates. Here, seeds of Douglas fir were sown in greenhouse on three soils collected in two French former mines: a gold mine (soils L1 and L2) and a lead and silver mine (soil P). These soils are highly contaminated by Pb, As, and Sb at different concentrations. Plants were harvested after ten weeks. Growth parameters, primary metabolite content, and shoot and root ionomes were determined. Douglas firs grown on the soils L1 and P had a lower biomass than controls and a higher oxidation status whereas those grown on the soil L2 exhibited a more developed root system and only slight modifications of carbon and nitrogen nutrition. Based on trace element (TE) concentrations in shoots and roots and their translocation factor (TF), Douglas fir could be a relevant candidate for As phytoextraction (0.8 g. kg<sup>-1</sup> dry weight in shoots and a TF of 1.1) and may be used to phytostabilize Pb and Sb (8.8 g and 127 mg. kg<sup>-1</sup> in roots for Pb and Sb, respectively, and TF lower than 0.1).

### KEYWORDS

conifer; gymnosperm; phytoremediation

### Introduction

25 The most common technique to clean soils contaminated with TE is soil excavation with subsequent soil treatment outside the site and waste management. However, this process is expensive, harmful for microfauna, and causes a long-term disturbance of ecosystems (Dermont *et al.* 2008). Phytoremediation of TE in contaminated soils may be more ecological. It is divided into several methods with different purposes depending on selected plant species: i) phytoextraction (or phytoaccumulation) is based on TE uptake from contaminated substrate (soil or water) and translocation to aboveground organs, these organs being then harvested, ii) phytostabilization corresponds to the capacity of plants to reduce TE mobility and availability in soil in order to limit leaching, iii) phytovolatilization is the uptake of TE from soil followed by a conversion into volatile form but this method is controversial because it displaces the pollution from soil to atmosphere (Ali, Khan, and Sajad 2013). Among these methods, phytoextraction can valorize harvested biomass and thus reduce the cost. Indeed aboveground organs can be used in the energy sector, biofermentation and biocatalysis process and ashes can be recycled (minerals for additional fertilization and TE for various sectors) (Pan and Eberhard 2011; Nzihou and Stanmore 2013; Willscher *et al.* 2013; Escande *et al.* 2014).

45 There are actually 550-600 plant species able to store in their aerial parts much more TE than the average plants without

lethal effects (van der Ent *et al.* 2012). The minimum TE levels in the aerial parts for these hyperaccumulators is set at 10 g. kg<sup>-1</sup> dry weight (DW) for Fe, Mn, and Zn, 1 g for Al, As, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb, and Se, 0.1 g for Cd and 0.001 g for Hg (Baker and Brooks 1989; Feng *et al.* 2013). Trees could be more interesting candidates than herbaceous species for TE phytoextraction since they have a more developed root system and a higher aerial biomass. Moreover, new plantings are not required each year (trees such as poplars and willows can be managed as short rotation coppice), reducing the cost of this process (Pulford and Watson 2003). However, the number of hyperaccumulators among woody species is between 130 and 140 (approximately 20% of hyperaccumulators), found mainly in tropics, and 75% are only Ni-hyperaccumulators (Saladin 2015). Consequently, there is a limited choice for the extraction of other TE in the conditions of temperate or cold climates.

Several tree species are able to store as much or more TE (mainly Cd and Zn) than herbaceous hyperaccumulators, especially fast-growing trees such as poplars or willows (Fisherova *et al.* 2006; Di Lonardo *et al.* 2011; Zacchini *et al.* 2011; He *et al.* 2013). Poplars and willows can adapt to many soils but are more sensitive than conifers to low temperatures and freeze-thaw embolism (Carnicer *et al.* 2013). Until now, conifers are not widely studied for TE phytoextraction but they may be good models for pollutions localized in cold areas



(Orlandi *et al.* 2002; Kiikkilä 2003). Moreover, dry soils may be another constraint for TE phytoextraction and several conifer species may be tolerant to drought. For example, pine species are more tolerant than aspen to water deficit and conifers in the Iberian Peninsula are more resistant than angiosperms to cavitation caused by drought (Hamanishi and Campbell 2011; Carnicer *et al.* 2013). The higher tolerance of conifers to water deficit is not so easy to establish because of intraspecific genetic variation: for example, Douglas firs (*Pseudotsuga menziesii*) and loblolly pines (*Pinus taeda*) exhibit various levels of drought-tolerance according to their geographical origin (Hamanishi and Campbell 2011).

This work aimed at determining the tolerance level of Douglas fir to various TE (As, Pb, and Sb) and its capacity to store them in plant parts. Douglas fir is native to North America but this species is widely used in France, particularly for reforestation because it has a fast growth rate compared to most other conifers and for its interesting properties as structural lumber. This study was performed with plantlets grown for ten weeks in greenhouse on soils sampled at two former mines from the center of France and exhibiting different levels of As, Pb, and Sb.

## Materials and methods

### Soil sampling, plant material, and culture conditions

The site of Pontgibaud (P) is a former Pb and Ag mine located in the French Massif Central region. The site of La Petite Faye (L) is a former Au mine located 60 km North-East of Limoges (Limousin region nearby French Massif Central). For both sites, soils were directly developed from highly contaminated tailings. Previous work with around 30 soil samples showed that TE concentration was quite homogeneous on the P site (Pascaud *et al.* 2014). According to Wanat *et al.* (2014) who tested 35 soil samples on the L site, two zones (L1 and L2) were separated due to different TE concentrations. Soil samples (the first 15–20 cm) were collected in 2014 and air dried in the laboratory before being sieved to 2 mm and stored at ambient temperature in polyethylene containers. The soil pH was measured in water respecting a soil:solution ratio of 1:5. The cation exchange capacity (CEC) was determined by the 0.05 N cobalt hexamine method at the soil pH. The Organic Matter (OM) content was determined by the loss ignition method.  $\text{CaCl}_2$ -extractable (potentially available fraction) of As, Pb, and Sb has been assessed by 0.01 M  $\text{CaCl}_2$  with a solid/liquid ratio of 1/10 (Novozamsky, Lexmond, and Houba 1993).

Seeds of Douglas fir were purchased from “Semences Du Puy SARL” (Le Puy-en-Velay, France) and were stored for 2 months at 4°C in plastic bags containing sterile moist sand for stratification. They were then sown in greenhouse in pots (15 cm height, 18 cm diameter) containing contaminated soil. Each soil was previously watered up to its water holding capacity. A control culture substrate (75% compost and 25% sand) without TE was prepared to compare plant growth and development under contaminated and non-contaminated substrates. TE concentrations in control culture substrate are below or close to background level in French soils with 19, 22, and 1.7 mg. kg<sup>-1</sup> for As, Pb, and Sb, respectively (Wanat *et al.* 2013). TE background concentrations were reported in the

**Table 1.** Physicochemical characteristics of both composite soils in the selected zones L1, L2 and P. The background values correspond to TE ubiquitous concentrations in French soils, *i.e.* TE concentrations in soils distant from sources of pollution (environmental background). These values in France are reported by the National Institute for Industrial Environment and Risks (INERIS 2003, 2007, 2010).

	Units	Background value in France	L1	L2	P
As <sub>total</sub>	mg. kg <sup>-1</sup>	< 40	89253	1846	1153
Pb <sub>total</sub>	mg. kg <sup>-1</sup>	< 110	15156	341	14431
Sb <sub>total</sub>	mg. kg <sup>-1</sup>	< 1	886	40	118
As- $\text{CaCl}_2$ extractable	mg. kg <sup>-1</sup>		6.2	14.8	< DL
Pb- $\text{CaCl}_2$ extractable	mg. kg <sup>-1</sup>		3.3	< DL	588
Sb- $\text{CaCl}_2$ extractable	mg. kg <sup>-1</sup>		0.8	0.2	0.04
pH <sub>water</sub>			3.8	5.4	4.2
OM	g. kg <sup>-1</sup>		77	97	43
CEC	cmol. kg <sup>-1</sup>		2.6	17.9	4.2
Texture			Silt loam	Silty clay loam	Sandy loam

OM: Organic Matter; CEC: Cation Exchange Capacity; DL: detection limit. The limits of detection for total soil As, Pb, and Sb are 3, 5, and 34 mg. kg<sup>-1</sup>, respectively. The limits of detection for As-, Pb-, and Sb- $\text{CaCl}_2$  extractable are 2, 2, and 0.2 µg. kg<sup>-1</sup>, respectively.

**Table 1.** For each condition (C, L1, L2, and P), 3 independent experiments were performed with 3 pots for each experiment, bringing the total to 9 pots per condition. After seed sowing, pots were watered twice a week with demineralized water (soils were not fertilized) for 10 weeks, taking care not to cause TE leaching. Photoperiod in greenhouse corresponded to “natural” sunlight (no artificial light was used) from March to June and was between 12 and 14 h light. Temperature varied from March to June from 15 to 25°C with an automatic opening of windows when temperature was higher in greenhouse. Plants were harvested (10 weeks after sowing) and roots were gently rinsed with water (to remove substrate) before to be placed for 1 h in 20 mM EDTA at ambient temperature to remove TE adsorbed on root surface. They were then rinsed with demineralized water before measurements (stem height and main root length) and separation of plant organs (roots, stem and needles). Samples were weighted and separated into two “categories”: one was stored at -20°C (after freezing in liquid N) until biochemical analyses and the other was dried in an oven at 80°C for 2 days to obtain DW and samples for TE quantification.

### Biochemical analyses

Needles were ground at 4°C with 80% (v/v) acetone and 0.5% (w/v)  $\text{MgCO}_3$  to measure the content of photosynthetic pigments (Saladin, Magné, and Clément 2003a). For the other biochemical parameters, quantifications were performed in both roots and needles. Total soluble carbohydrates were extracted in a 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) and quantified with an anthrone-containing reagent and glucose as standard (Saladin, Magné, and Clément 2003b). Starch remained in the pellet after soluble carbohydrate extraction was resuspended in a solution containing 8 N dimethyl sulfoxide and 37% HCl (4:1 v/v) and was then quantified with an iodine-HCl reagent (Saladin, Magné, and Clément 2003a).

For total soluble protein assay, samples were ground at 4°C with 0.1 M Tris-Base buffer (pH 8) containing 10 mM  $\text{MgCl}_2$  and 5 mM EDTA (Moussavou Moudouma *et al.* 2013). Supernatants were concentrated using Amicon Ultra-15 centrifugal

filters (Millipore Corporation, USA) and used for total protein content assay according to manufacturer's instructions (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, Munich, Germany).

For quantification of total free amino acid, total free proline, total non-protein thiols (NPT) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS, a product of lipid peroxidation used to estimate the level of oxidation), the extraction was performed with a solution of 10% (w/v) trichloroacetic acid containing 6.3 mM diethylenetriaminepentaacetic acid. Total amino acid and proline were quantified with reagents containing ninhydrin according to Saladin, Magné, and Clément (2003b) with leucine and proline as standards for amino acid and proline content assays, respectively. NPT were assayed with a reagent containing 5,5'-dithiobis-(2-nitro-benzoic acid) according to Gorinova *et al.* (2007) with cysteine as a standard. TBARS were quantified with a reagent containing 2-thiobarbituric acid according to Saladin, Magné, and Clément (2003b).

### TE quantification

Total soil As, Pb, and Sb were determined by X-ray fluorescence analyses (XRF) using a XMET 5100 device commercialized by OXFORD Instruments. Acquisitions were generated from pressed pellets at times varying from 60 to 180 s, for major and trace elements, respectively (Pascaud *et al.* 2014). For Douglas firs, dry samples (50 mg) were mixed with 2 mL nitric acid (68%) and incubated for 9 h at ambient temperature and then for 48 h at 80°C in an oven. A volume of 2 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) was added and samples remained for 9 h at ambient temperature. The final volume was adjusted to 5 mL with demineralized water and samples were then filtrated on PTFE syringe filters (pore diameter 0.45 μm, Millipore Corporation, USA). The concentration of As, Pb and Sb was determined by graphite furnace atomic absorption spectrometry using a Varian SpectraAA 880 Z with a Zeeman background correction system.

We estimated translocation and bioconcentration factors for each TE. Translocation factor (TF) corresponds to the ratio between shoot (needles and stem) and root concentrations whereas the bioaccumulation factor (BF) corresponds to the ratio between shoot and soil concentrations.

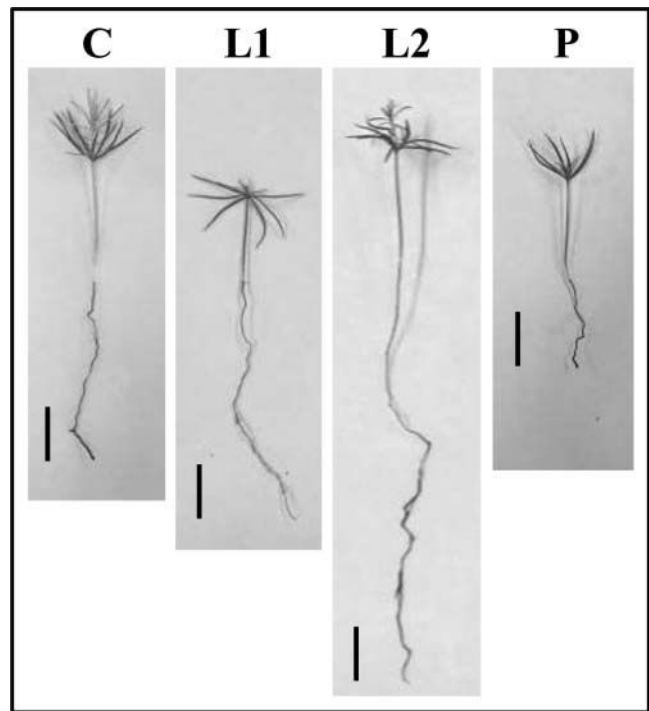
### Statistical analysis

Results were the mean of 3 independent experiments. For plant growth parameters, 30 plants per independent experiment and per condition (control and TE-exposed plants) were used. Statistical analysis consisted of one-way ANOVA test performed with the PAST software (version 2.17) to compare each set of plants with respect to the measured parameter. When significant difference was found ( $P < 0.05$ ), Tukey's test was carried out.

## Results

### TE concentration in soils and effect on plant growth and development

Soils of both sites (L and P) were highly contaminated as compared to background TE concentrations in French soils (Table 1).



**Figure 1.** Effect of TE on Douglas fir phenotype. Seeds were sown on control soil (C) containing compost and sand (3v:1v) or on TE-contaminated soils L1, L2 and P. Plantlets were harvested ten weeks later for phenotype analysis. Bar scales correspond to 2 cm.

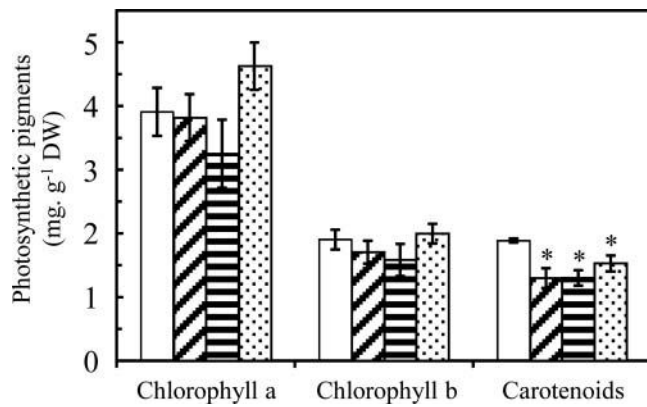
Total soil As, Pb and Sb concentrations were higher for L1 than L2 and P. L2 had the lowest Pb and Sb concentrations but As concentration was higher than in P. According to TE concentrations (even if it is difficult to really sum As, Pb and Sb concentrations), soils may be classified as follows: L1 (highest As, Pb and Sb concentrations) > P > L2 (lower Pb and Sb concentrations compared with P). As-, Pb- and Sb- extractions with CaCl<sub>2</sub> showed that the P soil exhibited a high level of Pb phytoavailability (588 mg·kg<sup>-1</sup>) and a very low level of As and Sb phytoavailability (Table 1). The L1 and P soils had a pH around 4 and a low CEC of 2.6 and 4.2 cmol·kg<sup>-1</sup>, respectively, and the P soil exhibited a low organic matter content (43 g·kg<sup>-1</sup>).

The three soils did not modify the percentage of seed germination compared to the control soil (around 70%) but had different impacts on Douglas fir growth (Figure 1 and Table 2).

**Table 2.** Effect of TE on Douglas fir growth. Seeds were transferred on soils from L1, L2, and P and plantlets were harvested ten weeks later. Control corresponds to a culture substrate containing compost and sand (3v:1v).

	Stem height(cm)	Main root length(cm)	DW (mg)		
			Needles	Stem	Roots
Control	6.1 ± 0.6 a	6.8 ± 0.7 a	12.8 ± 1.6 a	4.7 ± 0.4 a	2.0 ± 0.3 a
L1	3.3 ± 0.4 b	7.8 ± 1.1 b	4.8 ± 0.5 b	2.4 ± 0.1 b	2.1 ± 0.3 a
L2	4.6 ± 0.7 c	11.9 ± 1.7 c	9.4 ± 0.4 c	3.7 ± 0.3 a	2.9 ± 0.1 b
P	3.6 ± 0.5 b	2.8 ± 0.4 d	3.8 ± 0.5 b	2.8 ± 0.1 b	1.5 ± 0.1 c

Results are the mean ± SE of 3 independent experiments with 30 plants per independent experiment and per condition. For each growth parameter (*i.e.*, each column), different letters between two means (± SE) correspond to significant differences ( $P < 0.05$ ).



**Figure 2.** Content of photosynthetic pigments in needles of Douglas firs after ten weeks on control soil (white bars) or TE-contaminated soils from L1 (hatched lines), L2 (horizontal lines) or P (dots). Results are the mean of 3 independent experiments. Asterisks correspond to a significant difference compared to control ( $P < 0.05$ ).

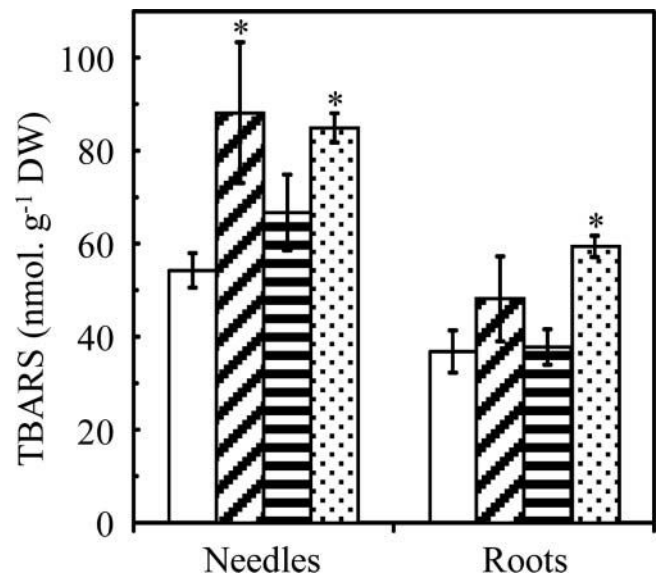
P soil strongly altered needle, stem and root biomass by 70, 40, and 25%, respectively. Moreover, plantlets were smaller with a stem height of 3.6 cm (6.1 for control plantlets) and a reduction of the main root close to 60%. When grown on L1 soil, plantlets showed a decrease of aerial organ growth with a needle and stem biomass reduced by 62 and 48%, respectively. Moreover, stem height was 47% lower than control. However, root biomass was not significantly modified and the main root was even longer with an increase by 15% compared to control. A quite similar observation was recorded for plantlets on L2 soil: aerial biomass and stem height were lower than control (but higher than plantlets on L1 soil) and the main root was longer than control with an increase by 75%. Moreover, for plantlets on L2 soil, root biomass was 50% higher than control.

For photosynthetic pigments, chlorophyll a and b contents were not significantly modified compared to control, whatever the TE-contaminated soil (Figure 2). However, carotenoid content decreased by 20–30% in needles of plantlets grown on L or P soils. The oxidation level of plant parts, represented by TBARS accumulation, increased for the P trees in both roots and needles whereas it increased only in needles for the L1 trees and was not modified for the L2 trees, whatever the organ (Figure 3).

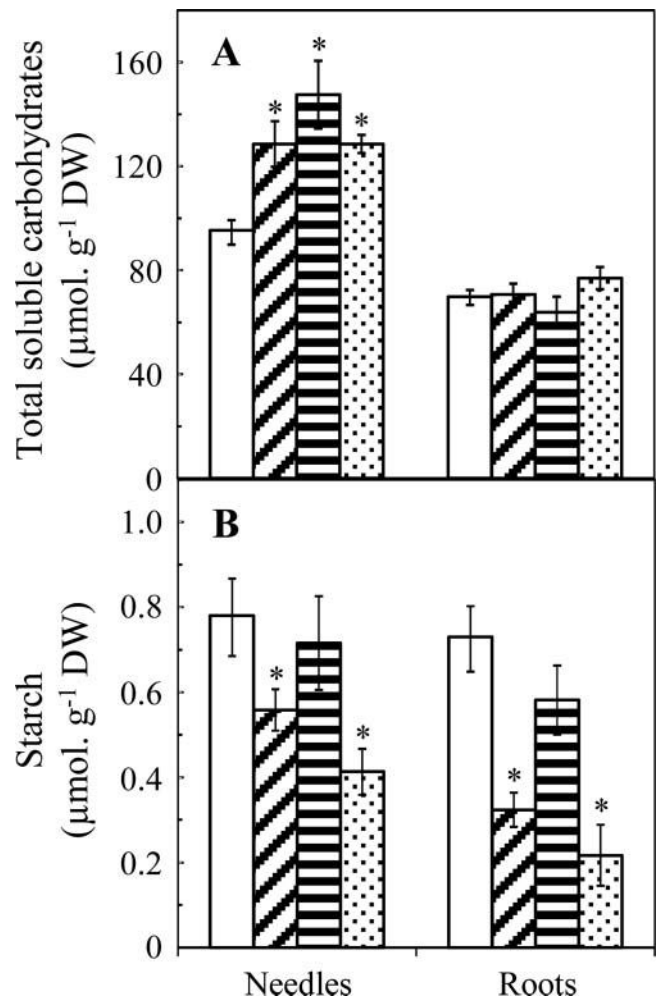
#### Effect of TE on carbon and nitrogen nutrition

Total soluble carbohydrate content was not significantly modified in roots of plantlets exposed to TE whereas an increase of 35–55% was observed in needles compared to the control (Figure 4A). In parallel, a significant decrease of starch concentration was recorded in both roots and needles for plantlets grown on L1 and P soils but not for plantlets grown on L2 soil (Figure 4B). This decrease was higher for the P trees with a decrease by 50 and 70% in needles and roots, respectively, whereas the percentage of reduction was 30 and 55 for the L1 trees.

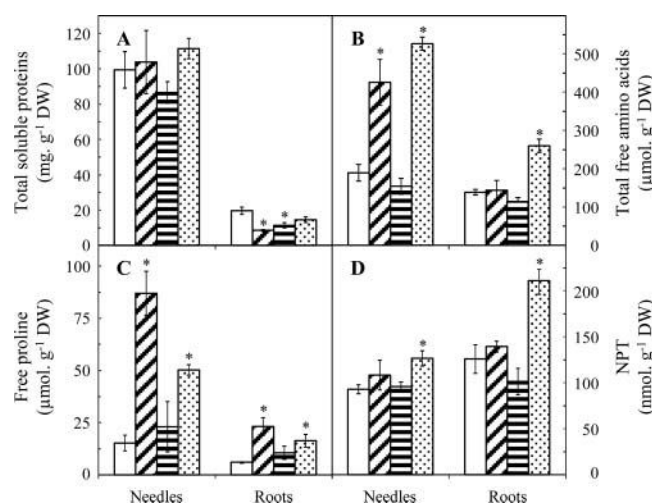
When compared to control, the L2 trees did not exhibit strong modification of nitrogen nutrition. The only variation was a decrease in root total protein concentration



**Figure 3.** TBARS content in needles and roots of Douglas firs after ten weeks on control soil (white bars) or TE-contaminated soils from L1 (hatched lines), L2 (horizontal lines), or P (dots). Results are the mean of 3 independent experiments. Asterisks correspond to a significant difference compared to control ( $P < 0.05$ ).



**Figure 4.** Total soluble carbohydrate (A) and starch (B) contents in needles and roots of Douglas firs after ten weeks on control soil (white bars) or TE-contaminated soils from L1 (hatched lines), L2 (horizontal lines) or P (dots). Results are the mean of 3 independent experiments. Asterisks correspond to a significant difference compared to control ( $P < 0.05$ ).



**Figure 5.** Contents of total soluble proteins (A), total free amino acids (B), free proline (C) and NPT (D) in needles and roots of Douglas firs after ten weeks on control soil (white bars) or TE-contaminated soils from L1 (hatched lines), L2 (horizontal lines) or P (dots). Results are the mean of 3 independent experiments. Asterisks correspond to a significant difference compared to control ( $P < 0.05$ ).

(Figure 5A) whereas differences were not significant compared to control for total amino acid and free proline contents in both needles and roots (Figures 5B and 5C). For the L1 trees, total amino acids accumulated in needles by a factor 2.2 and free proline concentration increased in both needles and roots by a factor 5.7 and 4, respectively. Concerning total soluble protein content, no modification was observed in needles for the L1 trees whereas the content in roots decreased by 55%. For the P trees, total protein concentration was not significantly modified whereas total free amino acids (including proline) accumulated in both needles and roots. The NPT assay showed that only the P trees accumulated more NPT than control (in needles and roots) whereas the concentration remained close to control for the L1 and L2 trees (Figure 5D).

### TE accumulation in plants

As was accumulated by Douglas fir plantlets (Table 3). Plantlets grown on L1 soil accumulated more As in both shoots (compared with L2 and P) and roots with a shoot As concentration higher than  $1 \text{ g. kg}^{-1} \text{ DW}$  (threshold for hyperaccumulators). The As concentration was lower for plantlets on L2 soil but

close to the threshold with a shoot content of  $0.83 \text{ g. kg}^{-1} \text{ DW}$ . Moreover, TF was more interesting for the condition L2 with a factor higher than 1 (index corresponding to hyperaccumulators) whereas it was only 0.2 for the L1 treatment. When calculating the percentage of As accumulated in shoots, we recorded 83% for L2 and only 40% for L1. Plantlets grown on P soil exhibited a lower shoot concentration ( $0.39 \text{ g. kg}^{-1} \text{ DW}$ ) although TF and percentage of As stored in shoots were quite interesting (0.79 and 76, respectively). Concerning Pb and Sb accumulation, shoot concentrations and TF were low whatever the soil (L or P).

### Discussion

#### Is Douglas Fir Able to Grow Correctly on the L and P Contaminated Soils?

Here P soil reduced the growth of Douglas fir plantlets since they were smaller than controls (stem height and root length were roughly reduced by a factor 2) and had a lower biomass of needles and roots. Chlorophyll and total soluble protein contents remained close to control and plantlets accumulated more free amino acids (including proline) and NPT. These results may be considered as defense responses since proline and NPT can play a role against oxidation caused by TE and can be involved in TE scavenging depending on TE and tree species (Szabados and Savouré 2010; Zacchini *et al.* 2011; Ivanov, Savochkin, and Kuznetsov 2012). Moreover, the accumulation of soluble carbohydrates in needles may be due to starch hydrolysis. These carbohydrates may be involved in membrane protection to limit oxidation and thus to maintain photosynthetic activity (Van den Ende and Valluru 2009). However, carbohydrate mobilization for defenses reduced the quantity of carbon compounds required for an optimal growth. Furthermore, plantlets exhibited in parallel a significant increase of TBARS content and a decrease of carotenoid concentration, suggesting that defense responses were not sufficient to counteract the oxidative stress caused by excessive TE exposure in P soil.

Douglas firs grown on L1 exhibited a reduction of aerial organ growth (stem height and needle biomass) but root elongation increased (roughly 15% compared to control). This elongation was more obvious on plantlets grown on L2 soil since root length was 75% higher than control (and root biomass increased by 50%). The development of root system (elongation

**Table 3.** Accumulation and distribution of As, Pb, and Sb in Douglas firs. Seeds were sown on soils from L1, L2, and P and plantlets were harvested ten weeks later. TE concentration in organs was expressed in  $\text{mg. kg}^{-1} \text{ DW}$  and total amount in organs was expressed in  $\mu\text{g}$  (for As and Pb) or  $\text{ng}$  (for Sb) per plantlet. The percentage of TE in shoots was calculated as a function of TE total amounts in shoots and roots.

	As			Pb			Sb		
	L1	L2	P	L1	L2	P	L1	L2	P
Shoot concentration	$1527 \pm 77$	$833 \pm 12$	$391 \pm 41$	$135 \pm 20$	$5 \pm 0.2$	$150 \pm 40$	$6.97 \pm 1.02$	$1.03 \pm 0.52$	$0.60 \pm 0.05$
Root concentration	$7897 \pm 263$	$768 \pm 46$	$484 \pm 10$	$1476 \pm 156$	$9 \pm 1$	$8849 \pm 208$	$127.5 \pm 8.4$	$4.9 \pm 0.7$	$7.8 \pm 0.7$
TF	0.20	1.10	0.79	0.10	0.64	0.01	0.05	0.18	0.11
BF	0.03	0.44	0.33	0.03	0.02	0.09	0.04	0.04	0.01
Shoot total amount	$10.99 \pm 0.52$	$10.94 \pm 0.17$	$2.54 \pm 0.25$	$0.97 \pm 0.11$	$0.21 \pm 0.10$	$1.02 \pm 0.029$	$50 \pm 7$	$0.21 \pm 0.10$	$1.02 \pm 0.029$
Root total amount	$16.81 \pm 0.79$	$2.27 \pm 0.17$	$0.70 \pm 0.03$	$3.01 \pm 0.22$	$0.03 \pm 0.003$	$12.81 \pm 0.04$	$270 \pm 16$	$14 \pm 2$	$11 \pm 1$
Percentage in shoots	40	83	76	24	82	6	16	47	26

Results are the mean  $\pm$  SE of 3 independent experiments. The limits of TE detection are 2, 2, and  $0.2 \mu\text{g. kg}^{-1}$  for As, Pb, and Sb, respectively.

of the main root or development of more lateral roots) as a response to TE excess was reported as a stress-induced morphogenesis response (SIMR) (Potters *et al.* 2007; 2009). SIMR is interpreted as an acclimation to mild chronic stress to find better growth conditions, *i.e.*, a soil containing less toxic elements (TE or salts for example) or in contrast a soil with higher nutrient content. SIMR is regulated by several pathways involving at least a gradient of reactive oxygen species and a redistribution of growth factors (such as auxin and ethylene) that modify growth orientation. However, Hopff, Wienkoop, and Lüthje (2013) showed on maize roots exposed to various Fe concentrations that SIMR was reduced when Fe concentration was too high. SIMR was more efficient for plantlets grown on L2 than L1 soil, probably because of the lower TE concentrations in L2 soil (and the lower Pb phytoavailability) and the subsequent lower TE concentration in roots. As a result, TBARS level and starch content were not significantly modified in L2 trees whereas oxidation level increased and starch reserves decreased in L1 trees. This indicates that L1 trees may not be able to counteract stress for additional months or weeks. Thus, among the three tested soils, Douglas fir plantlets had a correct growth rate (as compared to the control) only on L2 soil.

### 355 ***Is douglas fir efficient to accumulate as recorded in L and P?***

L2 soil is highly contaminated by As since its concentration was approximately 45 times the background value in France. Nevertheless, plant growth was not strongly modified after 10 weeks on this soil (Table 2). Shoot As concentration was close to the minimal level for hyperaccumulating species (*i.e.*, 1 g. kg<sup>-1</sup> DW) and TF (higher than 1) indicated a high rate of translocation from roots to shoots. When calculating the total amount of As accumulated per plantlet, 83% of As was stored in shoots, which is interesting for phytoextraction. Currently, no conifer species is considered as a hyperaccumulator, as TE are mostly stored in their root system (Fuentes *et al.* 2007a, 2007b; Ivanov, Savochkin, and Kuznetsov 2011; Moussavou Moudouma *et al.* 2013). A study using 3-year-old Douglas firs exposed to Cd for 9 months confirmed this tendency (Astier, Gloaguen, and Faugeron 2014). However, Bergqvist and Greger (2012) compared As distribution of several plant species (including conifers) and showed that *Picea abies* accumulated more As in shoots by contrast to *Pinus sylvestris* which accumulated more As in roots. Pratas *et al.* (2005) compared *Pinus pinaster* and two *Quercus* species growing on former mines contaminated with several TE including As. They showed that pine needles accumulated more As than oak with concentrations of 10 and 30 mg. kg<sup>-1</sup> DW in young and old needles, respectively. These values were under the threshold for hyperaccumulators but total soil As concentration was not very high (76 mg. kg<sup>-1</sup> DW). Another study showed that *Pinus pinaster* needles could accumulate up to 140–150 mg As. kg<sup>-1</sup> DW but needles exhibited visible injuries (maybe partly due to a Mn deficiency) (Mench *et al.* 2006). Since TE phytoremediation may depend on the TE, its concentration in soil (and its phytoavailability) as well as the conifer species, Douglas firs may be a promising tool for As phytoextraction. However, we have to keep in mind that experiments

were performed with plantlets and that high shoot concentration and TF we registered may decrease with aged trees.

For plantlets grown on L1 soil, shoot As concentration was twice higher than that for the L2 plantlets but As accumulated more in roots with a TF of 0.2. The low pH and CEC of L1 soil facilitate TE mobility and probably root uptake. It is possible that the growth rate reduction of aerial biomass for L1 trees slows down the translocation rate from roots to shoots. In the P trees, As TF remained close to the TF calculated for the L2 trees but As shoot concentration was 50% lower than in the L2 trees. It can be explained not only by the lower As concentration in P soil compared to L2 soil but also by the higher Pb availability and Pb concentration in roots which may decrease As uptake in the P trees. Thus, As phytoextraction by Douglas fir may be efficient if As concentration in soils is under a threshold which has to be determined (As content in L1 soil is 50 times higher than the concentration in L2 soil) and if the soil concentration and phytoavailability of other TE is not too much important (Pb and Sb concentrations in P soil are 40 and 3 times higher than in L2 soil, respectively).

### ***Are douglas fir plantlets efficient to accumulate Pb and Sb present in L and P?***

Total soil Pb is high in L1 and P soils but shoot Pb concentrations were relatively low (130–150 mg. kg<sup>-1</sup> DW) compared to Pb hyperaccumulators (the minimal concentration for Pb hyperaccumulators is 1 g. kg<sup>-1</sup> DW in shoots). Similar low Pb concentrations in shoots were found in other non-hyperaccumulating species growing on highly Pb-contaminated sites (Rotkittikhun *et al.* 2006). We showed that Pb was stored preferentially in roots, resulting in a TF of 0.1 and 0.01 for plantlets grown on L1 and P soils, respectively. This confirmed previous findings on preferential Pb accumulation in roots even for Pb hyperaccumulating trees such as *Sesbania drummondii* or *Populus x canescens* (Sahi *et al.* 2002; Dai *et al.* 2012). TF was higher for plantlets grown on L2 soil (0.64) but shoot and root Pb concentrations were negligible, corresponding to less than 10 mg. kg<sup>-1</sup> DW. Similar low concentrations were found in roots and leaves of several crops (maize, barley, white cabbage, common bean...) growing on slightly Pb-contaminated soils, confirming the lack of efficiency of the L2 plantlets for Pb phytoextraction (Şekara *et al.* 2005). According to our results, Douglas fir would not be interesting for Pb phytoextraction on soils highly or moderately Pb-contaminated but may be relevant for phytostabilization.

Concerning Sb, shoot and roots concentrations found in plantlets were too low to consider Douglas fir as an interesting model for Sb phytoextraction. Indeed, shoot Sb concentrations were between 0.6 and 7 mg. kg<sup>-1</sup> DW whereas the lowest Sb concentration for Sb hyperaccumulators is 1 g. kg<sup>-1</sup> DW. Similar results were reported for *Pinus pinaster* grown on a soil with a Sb concentration of 663 mg. kg<sup>-1</sup> DW, thus between the L1 and P soils: Sb concentrations were only 1.4 and 1.8 mg. kg<sup>-1</sup> DW in young and old needles, respectively (Pratas *et al.* 2005). Feng *et al.* (2013) reported only around 10 Sb herbaceous hyperaccumulators but no woody species. For conifers, Sb concentration peaked at 10–15 mg. kg<sup>-1</sup> DW in shoots of *Pinus* species and 120–130 mg. kg<sup>-1</sup> DW for *Juniperus* species

445 (Levresse *et al.* 2012). Based on our data, Douglas fir would not be a relevant candidate for Sb phytoaccumulation.

It is likely that 2–3-year-old trees could be more resistant than plantlets to the high total soil As, Pb, and Sb present in the L and P soils. In previous findings, 3-year-old Douglas firs and 2-year-old larch species (*L. x eurolepis* and *L. decidua*) exposed for 9 months to 25 mg Cd. g<sup>-1</sup> DW did not exhibit significant changes in growth and development (Astier, Gloaguen, and Faugeron 2014; Bonet *et al.* 2014). Thus, it would be interesting to test the efficiency of As, Pb, and Sb phytoextraction with 2–3-year-old Douglas firs and to improve the process by testing various fertilizations to stimulate tree growth and / or soil conditioners to increase soil TE solubility and subsequent absorption by roots (Do Nascimento, Amarasiriwardena, and Xing 2006). Mycorrhization could be another alternative to increase TE uptake and accumulation by Douglas fir but studies related to several other conifer species did not always show positive results for TE phytoextraction as reported by Saladin (2015).

## Conclusion

465 Two topsoils, L1 collected at a former Au mine and P sampled at a former Pb / Ag mine were toxic for Douglas fir plantlets since their growth was reduced and oxidation level increased in both shoots and roots. In contrast, the stress was moderate for plantlets grown on L2 soil sampled at the Au mine. For Douglas fir grown on this L2 soil, shoot biomass was slightly reduced, the oxidation level was close to control and carbon and nitrogen metabolisms were not strongly modified. Moreover, the L2 plants had a higher root DW yield than the control plants with a longer main root. For TE accumulation, Douglas fir plants could be relevant for As phytoextraction, particularly for the L2 soil, with a TF higher than 1. However, we have to keep in mind that poplars or willows have a higher growth rate and that As phytoextraction by conifers such as Douglas fir could take a longer time. The higher efficiency of As phytoextraction on L2 soil compared to L1 and P soils may be explained by the soil texture (silty / clay / loam with a higher OM content), the higher CEC and probably the lower Pb mobility. Pb and Sb phytoextraction by Douglas firs was low, indicating that this conifer species may be use for phytostabilization of these TE. Additional work will be carried out to improve Douglas fir growth and As, Pb, and Sb phytoextraction by testing various amendments

## References

- Ali H, Khan E, Sajad MA. 2013. Phytoremediation of heavy metals – concepts and applications. *Chemosphere* 91:869–881.
- 490 Astier C, Gloaguen V, Faugeron C. 2014. Phytoremediation of cadmium-contaminated soils by young Douglas fir trees: effects of cadmium exposure on cell wall composition. *Int J Phytoremediat* 16:790–803.
- Baker AJM, Brooks RR. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements: A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1:81–126.
- 495 Bergqvist C, Greger M. 2012. Arsenic accumulation and speciation in plants from different habitats. *Appl Geochem* 27:615–622.
- Bonet A, Saladin G, Gloaguen V, Faugeron C. 2014. Efficiency of Cadmium accumulation in European and hybrid larch for use in phytoremediation. 11th International Phytotechnologies Conference. In: Kalogerakis N, Manios T, editors. Thessaloniki, (Greece): Grafima Publ. p. 162.
- 500 Carnicer J, Barbata A, Sperlich D, Coll M, Peñuelas J. 2013. Contrasting trait syndromes in angiosperms and conifers areas associated with different responses of tree growth to temperature on a large scale. *Front Plant Sci* 4(409):1–19.
- Dai HP, Wei Y, Zhang YZ, Wei AZ, Yang TX. 2012. Subcellular localization of cadmium in hyperaccumulator *Populus × canescens*. *Afr J Biotechnol* 11(16):3779–3787.
- 505 Dermont G, Bergeron M, Mercier G, Richer-Lafèche M. 2008. Soil washing for metal removal: A review of physical/chemical technologies and field applications. *J Hazard Mater* 152:1–31.
- 510 Di Lonardo S, Capuana M, Arnetoli M, Gabbriellini R, Gonnelli C. 2011. Exploring the metal phytoremediation potential of three *Populus alba* L. clones using an *in vitro* screening. *Environ Sci Pollut Res* 18:82–90.
- Do Nascimento CWA, Amarasiriwardena D, Xing B. 2006. Comparison of natural organic acids and synthetic chelates at enhancing phytoextraction of metals from a multi-metal contaminated soil. *Environ Pollut* 140:114–123.
- 515 Escande V, Garoux L, Grison C, Thillier Y, Debart F, Vasseur JJ, Boulanger C, Grison C. 2014. Ecological catalysis and phytoextraction: Symbiosis for future. *Appl Catal B* 146:279–288.
- Feng R, Wei C, Tu S, Ding Y, Wang R, Guo J. 2013. The uptake and detoxification of antimony by plants: A review. *Environ Exp Bot* 96:28–34.
- Fischerova Z, Tlustos P, Szakova J, Sichorova K. 2006. A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. *Environ Pollut* 144:93–100.
- 525 Fuentes D, Disante KB, Valdecantos A, Cortina J, Vallejo VR. 2007a. Sensitivity of Mediterranean woody seedlings to copper, nickel and zinc. *Chemosphere* 66:412–420.
- Fuentes D, Disante KB, Valdecantos A, Cortina J, Vallejo VR. 2007b. Response of *Pinus halepensis* Mill. seedlings to biosolids enriched with Cu, Ni and Zn in three Mediterranean forest soils. *Environ Pollut* 145:316–323.
- 530 Gorinova N, Nedkovska M, Todorovska E, Simova-Stoilova L, Stoyanova Z, Georgieva K, Demirevska-Kepova K, Atanassov A, Herzig R. 2007. Improved phytoaccumulation of cadmium by genetically modified tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). Physiological and biochemical response of the transformants to cadmium toxicity. *Environ Pollut* 145:161–170.
- 535 Hamanishi ET, Campbell MM. 2011. Genome-wide responses to drought in forest trees. *Forestry* 84(3):273–283.
- 540 He J, Ma C, Ma Y, Li H, Kang J, Liu T, Polle A, Peng C, Luo ZB. 2013. Cadmium tolerance in six poplar species. *Environ Sci Pollut Res Int* 20(1):165–174.
- Hopff D, Wienkoop S, Lühje S. 2013. The plasma membrane proteome of maize roots grown under low and high iron conditions. *J Proteomics* 91:605–618.
- 545 INERIS. 2003. Plomb et ses dérivés. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. INERIS-DRC-01-25590-ETSC-API/SD –N°00df257.
- INERIS. 2007. Antimoine et ses dérivés. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. INERIS-DRC-03-47020-03DD050.
- 550 INERIS. 2010. Arsenic et ses dérivés inorganiques. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. INERIS-DRC-09-103112-11453A.
- 555 Ivanov YV, Savochkin YV, Kuznetsov VIV. 2011. Scots pine as a model plant for studying the mechanisms of conifers adaptation to heavy metal action: 1. Effects of continuous zinc presence on morphometric and physiological characteristics of developing pine seedlings. *Russ J Plant Physiol* 58(5):871–878.
- 560 Ivanov YV, Savochkin YV, Kuznetsov VIV. 2012. Scots pine as a model plant for studying the mechanisms of conifers adaptation to heavy metal action: 2. Functioning of antioxidant enzymes in pine seedlings under chronic zinc action. *Russ J Plant Physiol* 59(1):50–58.
- 565 Kiikkilä O. 2003. Heavy-metal pollution and remediation of forest soil around the Harja valta Cu-Ni smelter, in SW Finland. *Silva Fennica* 37(3):399–415.
- Levresse G, Lopez G, Tritlla J, López EC, Chavez AC, Salvador EM, Soler A, Corbella M, Sandoval LGH, Corona-Esquivel R. 2012. Phytoavailability of antimony and heavy metals in arid regions: the case of the

- 570 Wadley Sb dis-trict (San Luis, Potosí Mexico). *Sci Total Environ* 427W22;428:115–125.
- Mench M, Vangronsveld J, Lepp N, Bleeker P, Ruttens A, Gebelein W. 2006. Phytostabilisation of metal-contaminated sites. In: Morel JM, Echevarria G, Goncharova N, editors. *Phytoremediation of metal-contaminated soils*. (Dordrecht) Netherlands: Springer. p. 109–190.
- 575 Moussavou Moudouma CF, Riou C, Gloaguen V, Saladin G. 2013. Hybrid larch (*Larix x eurolepis* Henry): a good candidate for cadmium phytoremediation? *Environ Sci Pollut Res* 20(3):1889–1894.
- Novozamsky I, Lexmond THM, Houba VJG. 1993. A single extraction procedure of soil for evaluation of uptake of some heavy metals by plants. *Int J Environ An Ch* 51:47–58.
- 580 Nzihou A, Stanmore B. 2013. The fate of heavy metals during combustion and gasification of contaminated biomass - A brief review. *J Hazard Mater* 256W22;257:56–66.
- 585 Orlandi M, Pelfini M, Pavan M, Santilli M, Colombini MP. 2002. Heavy metals variations in some conifers in Valle d'Aosta (Western Italian Alps) from 1930 to 2000. *Microchem J* 73:237–244.
- Pan H, Eberhard TL. 2011. Characterization of fly ash from the gasification of wood and assessment for its application as a soil amendment. *BioResources* 6(4):3987–4004.
- 590 Pascaud P, Leveque T, Soubrand M, Boussen S, Joussein E, Dumat C. 2014. Environmental and health risk assessment of Pb, Zn, As and Sb in soccer field soils and sediments from mine tailings: solid speciation and bioaccessibility. *Environ Sci Pollut Res* 21:4254–4264.
- 595 Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MAK. 2007. Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends Plant Sci* 12(3):98–105.
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Jansen MAK. 2009. Different stresses, similar morphogenic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant Cell Environ* 32:158–169.
- 600 Pratas J, Prasad MNV, Freitas H, Conde L. 2005. Plants growing in abandoned mines of Portugal are useful for biogeochemical exploration of arsenic, antimony, tungsten and mine reclamation. *J Geochem Explor* 85:99–107.
- 605 Pulford ID, Watson C. 2003. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees - a review. *Environ Int* 29:529–540.
- Rotkittikhun P, Kruatrachue M, Chaiyarat R, Ngernsarsaruay C, Pokethituyook P, Pajitprapaporn A, Baker AJM. 2006. Uptake and accumulation of lead by plants from the Bo Ngam lead mine area in Thailand. *Environ Pollut* 144:681–688.
- Sahi SV, Bryant NL, Sharma NC, Singh SR. 2002. Characterization of a Lead hyperaccumulator shrub, *Sesbania drummondii*. *Environ Sci Technol* 36:4676–4680.
- Saladin G, Magné C, Clément C. 2003a. Effects of Flumioxazin herbicide on carbon nutrition of *Vitis vinifera* L. *J Agric Food Chem* 51:4017–4022. 615
- Saladin G, Magné C, Clément C. 2003b. Stress effects of Flumioxazin herbicide on grapevine (*Vitis vinifera* L.) grown *in vitro*. *Plant Cell Rep* 21:1221–1227.
- Saladin G. 2015. Phytoextraction of heavy metals: the potential efficiency of conifers. In: Sherameti I, Varma A, editors. *Heavy metal contamination of soils: monitoring and remediation*. Switzerland: Springer. p. 333–353. 620
- Sękara A, Poniedziałek M, Ciura J, Jędrszczyk E. 2005. Cadmium and lead accumulation and distribution in the organs of nine crops: implications for phytoremediation. *Pol J Environ Stud* 14(4):509–516. 625
- Szabados L, Savouré A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci* 15:89–97.
- Van den Ende W, Valluru R. 2009. Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging? *J Exp Bot* 60(1):9–18. 630
- Van der Ent A, Baker AJM, Reeves RD, Pollard AJ, Schat H. 2012. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: facts and fiction. *Plant Soil* 362:319–334.
- Wanat N, Austruy A, Joussein E, Soubrand M, Hitmi A, Gauthier-Mousard C, Lenain JF, Vernay P, Munch JC, Pichon M. 2013. Potentials of *Miscanthus × giganteus* grown on highly contaminated Technosols. *J Geochem Explor* 126W22;127:78–84. 635
- Wanat N, Joussein E, Soubrand M, Lenain JF. 2014. Arsenic (As), antimony (Sb), and lead (Pb) availability from Au-mine Technosols: a case study of transfer to natural vegetation cover in temperate climates. *Environ Geochem Health* 36:783–795. 640
- Willscher S, Mirgorodsky D, Jablonski L, Ollivier D, Merten D, Büchel G, Wittig J, Werner P. 2013. Field scale phytoremediation experiments on a heavy metal and uranium contaminated site, and further utilization of the plant residues. *Hydrometallurgy* 131–132:46–53. 645
- Zacchini M, Iori V, Scarascia Mugnozza G, Pietrini F, Massacci A. 2011. Cadmium accumulation and tolerance in *Populus nigra* and *Salix alba*. *Biol Plantarum* 55:383–386. 650





## Résumé

Face à la toxicité des éléments traces métalliques (ET) dans l'environnement, les plantes ont développé différentes stratégies aujourd'hui exploitées en phytoremédiation. Les arbres paraissent plus efficaces que les herbacées pour la phytoextraction de par leur importante biomasse et leur système racinaire plus profond. Ces travaux ont donc été menés sur des espèces ligneuses largement répandues dans la région Limousin, plus particulièrement des conifères: le Douglas, le mélèze hybride et ses deux parents, le mélèze d'Europe et le mélèze du Japon. Plusieurs modèles de culture ont été utilisés pour permettre, par des approches complémentaires, une meilleure appréhension des réponses de ces conifères aux ET : des plantules cultivées *in vitro* et des germinations ou des arbres âgés de 2 ans cultivés sous serre. Les conifères ont été exposés soit à un seul ET, le Cadmium (Cd), soit à plusieurs ET (As, Pb, Sb) présents dans des sols collectés sur deux anciens sites miniers. Les résultats ont montré que, parmi les espèces étudiées, le Douglas présentait le taux d'accumulation le plus élevé en Cd. Cependant, la quantité stockée dans la biomasse aérienne est restée faible par rapport à d'autres espèces d'arbres déjà utilisées en phytoextraction. Par ailleurs, la caractérisation chimique des pectines de la paroi a mis en évidence des modifications quantitatives et qualitatives suggérant un processus d'exclusion du Cd. Au niveau intracellulaire, les résultats ont montré que les polyamines et les oligopeptides riches en thiols ne semblaient pas impliqués dans la compartimentation du Cd. En revanche, une accumulation de proline a été observée en réponse au Cd et à d'autres ET, suggérant une implication de la proline comme molécule antioxydante et / ou chélatrice d'ET. L'ensemble des résultats a mis en évidence la nécessité d'optimiser la croissance des conifères et la phytodisponibilité des ET du sol avant de pouvoir proposer ces conifères, et notamment le Douglas, pour la phytoextraction d'ET.

**Mots clés :** cadmium, conifère, éléments traces, Gymnospermes, *Larix*, mélèze, pectines, phytoextraction, *Pseudotsuga*, sapin de Douglas.

## Abstract

Given the toxicity of trace elements (TE) in the environment, plants developed various strategies used currently for phytoremediation. Trees appear more efficient than herbaceous species for phytoextraction as they have a larger biomass and a deeper root system. The work was thus performed on woody species widespread in Limousin region, particularly conifers: Douglas fir, hybrid larch and its two parents, European larch and Japanese larch. Several culture models were used to allow, through complementary approaches, a better understanding of the response of these conifers to TE: *in vitro* grown plantlets and seedlings or 2-year-old trees grown in greenhouse. Conifers were exposed to a single TE, cadmium (Cd), or to several TE (As, Pb, Sb) present in soils collected from two former mining sites. Among investigated species, results showed that Douglas exhibited the highest rate of Cd accumulation. However, the amount stored in aboveground biomass remained low compared to other tree species already used in phytoextraction. Furthermore, the chemical characterization of cell wall pectins highlighted quantitative and qualitative modifications suggesting a Cd exclusion process. At the intracellular level, results showed that polyamines and thiol-rich oligopeptides did not appear to be involved in Cd compartmentation. However, a proline accumulation was observed in response to Cd and other TE, suggesting an involvement of proline as antioxidant molecule and / or TE scavenger. Overall, results highlighted the need to optimize conifer growth and soil TE phytoavailability before to propose these conifers, particularly Douglas, for the phytoextraction of TE.

**Keywords:** cadmium, conifer, trace elements, Gymnosperms, *Larix*, larch, pectins, phytoextraction, *Pseudotsuga*, Douglas fir.