



HAL
open science

Transfert des éléments traces métalliques vers les végétaux : mécanismes et évaluations des risques dans des environnements exposés à des activités anthropiques

Mohamad Assad

► To cite this version:

Mohamad Assad. Transfert des éléments traces métalliques vers les végétaux : mécanismes et évaluations des risques dans des environnements exposés à des activités anthropiques. Sciences agricoles. Université Bourgogne Franche-Comté, 2017. Français. NNT : 2017UBFCD006 . tel-01787667

HAL Id: tel-01787667

<https://theses.hal.science/tel-01787667v1>

Submitted on 7 May 2018

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 BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ
ÉCOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT-SANTÉ
LABORATOIRE CHRONO-ENVIRONNEMENT

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Bourgogne Franche-Comté

Spécialité : Sciences de la Vie et de l'Environnement

(Sous-spécialités : Sciences agronomiques et Biochimie)

**Transfert des éléments traces métalliques vers les végétaux :
mécanismes et évaluation des risques dans des environnements
exposés à des activités anthropiques**

par **Mohamad ASSAD**

Soutenance publique le 16 février 2017

Membres du jury :

Camille DUMAT (Professeure, ENSAT)	Rapporteur
Claudia COSIO (Chargée de Recherches, Université de Genève)	Rapporteur
Daniel WIPF (Professeur, INRA Dijon)	Examineur
David CAZAUX (Responsable Service Environnement, INOVYN)	Invité
Julien PARELLE (Maître de conférences, Chrono-Environnement)	Co-encadrant
Fabienne TATIN-FROUX (Maître de conférences, Chrono-Environnement)	Co-encadrant
Michel CHALOT (Professeur, Chrono-Environnement)	Directeur de thèse

Dédicace

Ce travail est d'abord dédié à la personne qui m'a encouragé à venir en France, qui m'a soutenu et aidé à surmonter les obstacles auxquels nous avons été confrontés tout au long de ce long chemin non pavé, à mon amie avant d'être mon épouse, à mon amour *Boushra*,

Ainsi qu'à mon père *Kais*, à ma mère *Mirta*, à mon frère *Ali* et à ma sœur *Mariyam*, sans vos encouragements au cours de ma licence, je n'aurais pas été en mesure d'atteindre l'excellence et d'obtenir cette bourse pour venir en France. Malgré la distance et mon éloignement, vos tendresses, votre confiance et votre amour me portent et me guident tous les jours depuis toujours.

À ma joie absolue, à mon cœur, à mes anges qui m'offrent le bonheur d'un enfant, puis d'un second, faisant de moi un père, merci à dieu pour ce don « mon fils *Ahmad* et ma fille *Maria* ».

À mon ami proche, mon frère de l'âme *obaïy* qui m'a surtout soutenu au début de mon arrivée en France.

À l'âme de mon oncle *Ahmad* qui nous a quitté très tôt au début de ma thèse

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier chaleureusement Michel CHALOT, mon directeur de thèse, pour sa grande disponibilité à n'importe quel moment et même pendant les week-ends, pour ses nombreux conseils, sa confiance et sa gentillesse. Certains vous diront qu'on arrive au bout d'une thèse lorsque l'on commence à détester son directeur, je suis ravi d'avoir eu la chance de vivre cette rare exception.

Un immense merci vient ensuite à Julien PARELLE et Fabienne TATIN-FROUX co-encadrants de ce travail, je ne les remercierai jamais assez pour tout ce qu'ils m'ont apporté. Merci d'avoir cru en moi, de vous être battu pour que je réalise cette thèse, pour tous vos conseils vos nombreuses remarques, pour votre enthousiasme et vos encouragements.

Je souhaite également remercier Daniel GILBERT pour son accueil au sein du laboratoire Chrono-Environnement et plus particulièrement toute l'équipe de Montbéliard. Un énorme Merci aux boute-en-train du labo, pour sa bonne humeur et son soutien moral, merci à toi Geneviève. Un profond Merci à la personne qui était toujours présente en cas de besoin, aussi bien pour me former à l'HPLC que pour me fournir une solution immédiate pour tous les problèmes techniques, merci à toi Marie Laure. Je remercie également Philippe, Coralie, Régine, Pierre Emmanuel pour leur bonne humeur et leur gentillesse.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de pilotage de thèse Michel MENCH, Daniel WIPF, Geneviève CHIAPUSIO qui m'ont conseillé et apporté un avis extérieur sur mon travail.

Je tiens à remercier Prof. Camille DUMAT et Dr. Claudia COSIO d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Je remercie également Prof. Daniel WIPF, Dr. David CAZAUX, d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Un grand Merci aux Dr Nadia CRINI et Caroline AMIOT pour leur temps passé à analyser des milliers d'échantillons par ICP-AES.

Je remercie profondément le ministère de l'enseignement supérieur en Syrie pour m'avoir financé cette bourse d'étude. Je remercie également les partenaires du projet PROLIPHYT ainsi que le pays de Montbéliard Agglomération (PMA) pour leur soutien financier qui nous ont permis de convertir des idées scientifiques en projets appliqués.

Je tiens à remercier les nombreuses personnes qui, de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

J'adresse enfin un énorme merci à tous mes collègues: *Julie, Battle, François, Olivier, Cyril, Alexis, Loïc, Phonetipe, Vanessa, Guillaume* avec qui j'ai vécu cette belle aventure et passé des bons moments.

Résumé

Les décharges de résidus riches en éléments traces métalliques (ETMs) issus des activités industrielles représentent un risque potentiel de pollution de l'environnement. Ces décharges de résidus exigent une stabilisation des ETMs pour limiter leur dispersion par l'air, le sol, et les cours d'eau, et *in fine* leur transport vers des zones initialement non contaminées. Cette stabilisation peut être obtenue par un couvert végétal adéquat. Ce travail de thèse a porté sur 3 sites expérimentaux, qui ont comme point commun d'être des zones de stockage de sédiments contaminés ou d'effluents industriels chargés en ETMs. **L'objectif général de ce travail de thèse était d'étudier les modes de transfert et de stockage d'ETMs vers les parties aériennes de végétaux cultivés sur les sols issus de ces sites expérimentaux.** Le premier objectif concernait une décharge d'effluents (Inovyn), issus de l'activité électrolytique de l'usine Solvay (Tavaux) et enrichi en Hg. Le Hg, en raison de son faible point d'ébullition est facilement transféré des sédiments vers l'atmosphère sous forme de composés volatiles. Ainsi, la couverture végétale de cette lagune est exposée par sa biomasse aérienne aux composés volatiles de Hg, mais également par la rhizosphère aux composés du Hg présents dans le substrat. Dans ce travail de thèse plusieurs espèces végétales de la famille des Salicacées (peuplier) et des Solanacées (poivron, tomate, aubergine, et tabac) ont été exposées au Hg, dans des expériences en pot, avec simple exposition à une atmosphère enrichie en Hg, ou double exposition à un sol et à une atmosphère enrichis en Hg. Dans tous les cas de figure, le transfert de Hg dans les feuilles ne se produit que par voie aérienne, et l'accumulation augmente significativement avec l'âge des feuilles. Nous avons également mis en évidence que les teneurs en Hg des fruits des Solanacées étaient environ 100 fois plus faibles que celles des feuilles, limitant ainsi le risque d'exposition au Hg par leur consommation. Nous avons par ailleurs démontré qu'une faible proportion (7%) du Hg est sous forme méthylHg dans les feuilles de peuplier, et que 16 à 26% du Hg accumulé dans les feuilles de poivron ou peuplier étaient liés à des protéines solubles. Le deuxième objectif concerne les sites de Thann (Cristal) et Fresnes sur Escaut (VNF), pour lesquels nous avons étudiés le transfert d'ETMs vers des espèces potagères, afin de mimer l'impact de ces contaminants sur les cultures en jardins potagers. Le peuplier a également été utilisé comme espèce de référence. Les quantités de masse fraîche des parties comestibles à ingérer pour atteindre la dose journalière ont été calculées pour chaque ETM. Seuls le Cd (Fresnes) et le Cr (Thann) présentaient un risque potentiel, puisqu'ils s'accumulent dans les parties consommables de ces végétaux à des teneurs élevées. Il faut toutefois noter que ces expériences ont été réalisées dans des scénarios où les conditions d'exposition étaient maximisées. Le transfert des ETMs (notamment le Cd et le Zn) vers le peuplier a confirmé des études précédentes, ce qui souligne l'importance d'une gestion adaptée de la biomasse produite sur de tels sites. **D'un point de vue écologique les travaux de cette thèse confirment l'importance et la nécessité de la végétalisation des sites contaminés par des ETMs afin de limiter la dispersion des poussières, et en conséquence les ETMs aux alentours. D'un point de vue sanitaire, les travaux soulignent l'importance d'estimer le risque spécifique lié à l'ingestion d'espèces végétales d'intérêt alimentaires cultivées régulièrement par les habitants aux alentours des sites potentiellement émetteurs d'ETMs, en générant un lien entre espèce et ETMs accumulés. Ce travail apporte donc un certain nombre d'éléments pour la compréhension du devenir d'ETMs et notamment le Hg dans le système sol/plante et les risques associés à l'ingestion des parties comestibles des végétaux cultivés potentiellement contaminés.**

Abstract

Landfills enriched in metal trace elements (MTEs) from industrial activities represent a potential risk of pollution of the environment. These residual discharges require stabilization of MTEs to limit their dispersion by air, soil, and watercourses, and ultimately their transport to areas that are initially uncontaminated. This stabilization can be achieved by suitable vegetation cover. This Ph-D work focused on 3 experimental sites, which have the common feature of being storage areas for contaminated sediments or industrial effluents loaded with ETMs. **The general objective of this Ph-D was to study the modes of transfer and storage of ETMs to the aerial parts of plants grown on soils from these experimental sites.** The first objective was to study a discharge of effluents (Inovyn) from the electrolytic activity of the Solvay (Tavaux) plant enriched in Hg. Hg, because of its low boiling point, is easily transferred from the sediments to the atmosphere in the form of volatile compounds. Thus, the vegetation cover of this lagoon is exposed by its aerial biomass to the volatile compounds of Hg, but also by the rhizosphere to the Hg compounds present in the substrate. In this Ph-D work, several plant species of the Salicaceae family (poplar) and Solanaceae family (pepper, tomato, eggplant, and tobacco) were exposed to Hg in pot experiments with simple exposure to an Hg-enriched atmosphere, or double exposure to Hg-enriched soil and atmosphere. In all cases, transfer of Hg into leaves occurs only by air, and accumulation increases significantly with leaf age. We also found that the Hg levels of Solanaceae fruits were about 100 times lower than those of the leaves, thus limiting the risk of exposure to Hg by their consumption. We have also shown that a small proportion (7%) of the Hg is in the form of methylHg in poplar leaves, and that 16 to 26% of the Hg accumulated in pepper leaves are bound to soluble proteins. The second objective concerns the sites of Thann (Cristal) and Fresnes sur Escaut (VNF), for which we have studied the transfer of MTEs to vegetable species in order to mimic the impact of these contaminants on vegetable garden crops. Poplar has also been used as a reference species. The amounts of fresh mass of edible parts to be ingested to reach the daily dose were calculated for each MTE. Only Cd (Fresnes) and Cr (Thann) present a potential risk, since they accumulate in consumable parts of these plants at high levels. It should be noted, however, that these experiments have been carried out in scenarios where exposure conditions are maximized. The transfer of MTEs (especially Cd and Zn) to poplar has confirmed previous studies, which underlines the importance of proper management of the biomass produced at such sites. **From an ecological point of view, the Ph-D work confirms the importance and the necessity of the vegetation of the sites contaminated by MTEs in order to limit the dispersion of the dust, and consequently the MTEs in the surroundings. From the point of view of health, the work stresses the importance of estimating the specific risk linked to the ingestion of food plant species of interest regularly cultivated by the inhabitants around the sites potentially emitting MTEs, generating a link between species and accumulated MTEs. This work therefore provides a number of elements for understanding the fate of MTEs and in particular Hg in the soil / plant system and the risks associated with the ingestion of edible parts of potentially contaminated cultivated plants.**

Table des matières

1. INTRODUCTION GENERALE.....	21
1.1 Définitions et généralités	23
1.1.1 Les éléments traces métalliques.....	23
1.1.2 Pollution et contamination métalliques.....	25
1.1.3 Les voies de dépollution / réhabilitation.....	27
1.2 Cadre général et approches globales du projet de thèse	31
2. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	37
2.1 Origines naturelle et anthropique des ETM s.....	39
2.1.1 Généralités.....	39
2.1.2 Cas particulier du Hg.....	43
2.1.2.1 Origine du Hg.....	43
2.1.2.2 Utilisations industrielles du Hg.....	45
2.1.2.3 Cycle biogéochimique du Hg.....	47
2.1.3 Caractéristique chimique des métaux et leur comportement au milieu vivant	47
2.1.3.1 Caractéristiques chimiques générales des ETM s Cd, Cr, Mn, Pb, Ti et Zn.....	49
2.1.3.2 Caractéristiques chimiques du mercure.....	51
2.2 Transfert de métaux chez les végétaux.....	61
2.2.1 Anatomie et fonctionnement foliaire	61
2.2.1.1 Caractéristiques anatomiques.....	61
2.2.1.2 Epiderme.....	61
2.2.1.3 Structure et fonctionnement des cellules stomatiques.....	63
2.2.1.4 Densité des stomates foliaires.....	63
2.2.1.5 Translocation de photoassimilats, les concepts de source et puits.....	65
2.2.2 Forme et mobilité des ETM s dans le sol et leur transfert vers les parties aériennes des plantes	65
2.2.2.1 Considérations générales.....	65
2.2.2.2 Transfert de Cd, Cr, Mn, Pb, Ti, Zn.....	71
2.2.2.3 Cas particulier du transfert de Hg.....	75
2.3 Effets toxiques des ETM s et risque sanitaire.....	79
2.3.1 Effets toxiques des ETM s chez les végétaux.....	79
2.3.1.1 Réponses doses-effets et stratégies d'adaptation.....	83
2.3.1.2 Réponses cellulaires aux ETM s chez les végétaux.....	83
2.3.1.3 Symptômes de toxicité du Cd, Cr, Hg, Mn, Pb, Ti et Zn.....	87
2.3.2 Exposition humaine et risque sanitaire	93
2.3.2.1 Aspects réglementaires.....	93
2.3.2.2 Evaluation du risque de toxicité des métaux sur l'être humain.....	93
2.3.2.3 Cas particulier du Hg.....	95
3. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....	97
4. MATERIELS ET METHODES.....	103

4.1	Description des sites d'étude et caractérisation des sols.....	105
4.1.1	Le site de Tavaux.....	105
4.1.2	Le site de Thann.....	105
4.1.3	Le site de Fresnes.....	107
4.1.4	Caractéristiques physico-chimiques des sols.....	107
4.2	Matériel végétal et dispositifs expérimentaux.....	111
4.2.1	Matériel végétal.....	111
4.2.1.1	Peuplier (Populus trichocarpa X Populus maximowiczii/ var Skado).....	111
4.2.1.2	Plantes d'intérêt agronomique.....	111
4.2.2	Dispositifs expérimentaux pour l'étude du transfert de Hg (Tavaux).....	111
4.2.2.1	Culture en pot en condition d'exposition naturelle.....	111
4.2.2.2	Expériences réalisées en phytotron.....	115
4.2.3	Dispositifs expérimentaux pour l'étude de la phytotoxicité et du transfert des éléments traces (substrats de Thann et Fresnes).....	117
4.3	Méthodes Biochimiques.....	119
4.3.1	Extraction de la fraction acides aminés.....	119
4.3.2	Extraction et dosage des protéines solubles.....	119
4.3.3	Essais de relargage du Hg lié aux protéines par le DTT.....	121
4.4	Méthodes analytiques.....	121
4.4.1	Analyse des formes de Hg.....	121
4.4.1.1	Mesure du Hg total par l'analyseur AMA254.....	121
4.4.1.2	Mesure du MeHg par éthylation, séparation GC et AFS.....	123
4.4.2	Analyse d'ETMs.....	125
4.4.2.1	Préparation du matériel végétal et des sols.....	125
4.4.2.2	Spectromètre d'émission atomique couplée à un plasma inductif (ICP-AES).....	127
4.5	Analyses statistiques.....	127
5.	RESULTATS ET DISCUSSION.....	129
5.1	Chapitre 1 : Étudier les modes de transfert et de stockage du Hg vers les parties aériennes de végétaux cultivés sur sols enrichi en Hg.....	131
5.1.1	Préambule.....	132
5.1.2	Absorption du Hg par le peuplier.....	134
5.1.3	Evaluation dendrochimique de l'émission de Hg sur un site industriel chlore-alcali.....	142
5.1.4	Transfer du Hg dans les parties comestibles d'espèces de la famille des Solanacées.....	148
5.1.5	Conclusions.....	165
5.2	Chapitre 2 : Mettre en évidence le transfert d'ETMs à partir de sols contaminés chez des espèces d'intérêt agronomique.....	167
5.2.1	Préambule.....	168
5.2.2	Accumulation d'ETMs chez des espèces végétales comestibles et chez le peuplier cultivés sur substrat issu d'un site de dépôt de déchets industriels.....	169
5.2.3	Accumulation d'ETMs chez des espèces végétales comestibles cultivées sur substrat issu d'un site de dépôt de sédiments.....	183
5.2.4	Conclusion.....	197
6.	CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....	199

Liste des Figures

Figure 1: Tableau périodique des éléments de Mendeleïev	24
Figure 2: Schéma du cycle des ETMs dans les sols (modifié d'après Baize, 1997).	38
Figure 3: Part des différentes sources de contamination dans l'estimation des quantités totales d'ETMs entrant sur les sols agricoles en France.	42
Figure 4: Principales sources anthropiques d'émission de Hg en 2010	42
Figure 5: Production, consommation et émissions de Hg au cours des 5 derniers siècles	44
Figure 6: Consommation estimée de Hg dans le monde en 2003.....	44
Figure 7: Les processus biogéochimiques de transformation du Hg.....	46
Figure 8: Cartographie des teneurs en Hg mesurées dans les sols (a) et dans l'atmosphère (b) autour d'une usine chlore-alcali (Esbrí et al., 2014).....	46
Figure 9: Schéma représentant la mobilité des ions métalliques en fonction du pH du sol.....	48
Figure 10: Représentation schématique d'une feuille mésomorphe typique (<i>Acer sp.</i>) en coupe transversale	60
Figure 11: Teneurs en Hg mesurées dans les feuilles de différentes espèces végétales d'intérêt agronomique..	78
Figure 12: Système d'étude du transfert de Hg par voie racinaire.	80
Figure 13: Système d'étude de transfert du Hg par voie atmosphérique.	80
Figure 14: Origine des différents radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées par les ETMs et leurs actions sur les biomolécules	82
Figure 15: Courbes de réponses « dose-effet biologique »	82
Figure 16: Différentes réponses des plantes à l'accroissement de la quantité des ETMs.....	84
Figure 17: Principales molécules impliquées dans la complexation intracellulaire des ETMs	84
Figure 18: Bioconcentration et bioamplification du Hg dans les réseaux trophiques aquatiques. ...	94
Figure 19: Vue aérienne de l'étang et de la décharge de résidus situés à Saint-Symphorien-sur-Saône (21) en Bourgogne Franche Comté.	104
Figure 20: Vue aérienne de l'usine de traitement des effluents et de la décharge de résidus contenant le gypse rouge (site de l'Ochsenfeld), issus de l'usine Cristal située à Thann (68).	104
Figure 21: Vue aérienne du site expérimental situé à Fresnes-sur-Escaut (59)	106
Figure 22: Les substrats issus de trois sites : Tavaux, Fresnes et Thann.	106
Figure 23: Dispositif de Tavaux	108
Figure 24: Dispositif expérimental de culture de boutures de peuplier exposées à l'atmosphère enrichie au Hg sur le site de Tavaux et à l'atmosphère ambiante sur le site de Montbéliard	112
Figure 25: Appareil de mesure de la teneur en chlorophylle, <i>Chlorophyl content meter</i> (CCM)..	113
Figure 26: La récolte de peupliers cultivés sur les sites de Tavaux (atmosphère contaminée par Hg) et Montbéliard (atmosphère ambiante)	113
Figure 27: Deux phytotrons, a) le premier contient des boutures de peuplier implantées uniquement sur le substrat contrôle et exposées à une atmosphère ambiante. b) le deuxième contient des boutures de peuplier implantées soit sur le substrat de Tavaux enrichi en Hg (1 ^{er} étage du phytotron) soit sur le substrat contrôle (2 ^{ème} étage du phytotron).....	114

Figure 28: Des plantules de la famille des Solanacées (poivron, tomate, aubergine et tabac) implantées soit sur substrat contrôle soit sur substrat de Tavaux.	116
Figure 29: Un piège de charbon d'iode conçu précisément pour capturer le Hg atmosphérique ...	116
Figure 30: Un piège de charbon d'iode lié à une pompe avec un débit de 6l/min.	116
Figure 31: Cinq espèces végétales (peuplier, laitue, chou, poivron et concombre), et 12 individus de chaque espèce ont été cultivés en pots de 0,5 L contenant l'un des 4 substrats (substrat de Thann, les deux sols de Fresnes et le substrat contrôle).	118
Figure 32: Mécanisme de réduction des ponts disulfure par le DTT (d'après Cleland, 1964).....	120
Figure 33: Analyseur de Hg total AMA (<i>Advanced mercury analyser</i>).	120
Figure 34: Schéma de l'appareillage de GC-CVAFS et de ses différents composants.....	124
Figure 35: Les 4 étapes de la formation des ions dans le plasma.	126
Figure 36: Schéma explicatif de l'objectif général de la thèse, des sites d'études et leur problématique, et des faits marquants de l'ensemble de ces travaux.	200
Figure 37: Schéma représentatif des principaux résultats liés au 1 ^{er} objectif de thèse.....	202

Liste des Tableaux

Tableau 1: Concentrations moyennes de quelques ETMs dans les sols et les plantes en mg/kg.....	38
Tableau 2: Propriétés physico-chimiques générales de Hg (Qvarnström, 2003 ; INRS, 2016).....	52
Tableau 3: Les différentes formes de Hg dans l'air, et leur durée de vie dans l'atmosphère.....	56
Tableau 4: Les interactions antagonistes et synergiques entre les éléments majeurs et les ETMs dans les plantes d'après (Kabata-Pendias, c2011).	72
Tableau 5: Vue d'ensemble des voies d'entrée du Hg dans la biomasse végétale influencée par des espèces végétales.	74
Tableau 6: Données bibliographiques concernant les concentrations en Hg mesurées dans les parties comestibles d'espèces végétales (légume-feuilles ou légume-fruits), en fonction de l'environnement local (teneur en Hg dans le sol et l'air)	76
Tableau 7: La moyenne \pm écart type (n = 3-5) de concentrations en Hg (en $\mu\text{g/g MS}$) dans les feuilles et racines de six espèces végétales.....	78
Tableau 8: Concentrations de Hg dans l'air en sortie de la chambre de transpiration.....	78
Tableau 9: Dose journalière tolérée des éléments en mg pour un adulte de 60 kg.	92
Tableau 10: Distribution granulométrique et caractéristiques physico-chimiques des substrats...	108
Tableau 11: Caractéristiques chimiques principales des substrats.....	109
Tableau 12: Caractéristiques des différentes espèces végétales utilisées.	110
Tableau 13: Conditions environnementales pour la culture des végétaux dans les phytotrons.....	114

Abréviations

ADEME: Agence de l'environnement et de la Maîtrise de l'énergie

AMA254: *Advanced Mercury Analyzer*

ANR: Agence Nationale de la Recherche

ATSDR: *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*

BASOL: Base de données sur les sites et sols pollués

CMR: Concentration maximale réglementaire

CMREC: Concentration mesurée / concentration maximale recommandée

CSHPF: Conseil supérieur d'hygiène publique de France

DCM: Dichlorométhane CH_2Cl_2

DJT: Dose journalière tolérée

DTT: Dithiothréitol

ETMs: Éléments traces métalliques

FeRB: *Iron reducing bacteria*

INERIS: Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*

MMHg: *mono-methyl Mercury*

PVC: Polychlorure de vinyle

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

ROS: *Reactive oxygen species*

SADEF: Société Alsacienne pour Développement et l'Etude de la Fertilité

SRB: *Sulfate reducing bacteria*

TCA: *Tri chloro acetic acid*

TDI: *Tolerate daily intake*

TGM: *Total gaseous mercury*

Tris: Tris hydroxyméthyl aminométhane $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}$

TMs: *Trace metals*

VNF : Voies Navigables de France

WHO: *World Health Organization*

Valorisation scientifique

Publications à comité de lecture

Manuscrit et statut	Référence
Manuscrit 1. Publié.	Assad M , Parelle J, Cazaux D, Gimbert F, Chalot M., Tatin-Froux F (2016) Mercury uptake into poplar leaves. <i>Chemosphere</i> , 146:1-7 (IF 2015 : 3,7).
Manuscrit 2. Publié.	Maillard F, Girardclos O, Assad M , Zappellini C, Jung L, Guyeux C, Chrétien S, Bigham G, Cosio C, Chalot M (2016) Dendrochemical assessment of mercury releases from a pond and dredged-sediment landfill impacted by a chlor-alkali plant. <i>Environmental Research</i> 148: 122-12 (IF 2015 : 3,1).
Manuscrit 3. En préparation.	Assad M , Chalot M. (-).Mercury transfer in Solanaceae species. A soumettre au journal : <i>Ecotoxicology and Environmental Safety</i> (IF 2015 : 3,1).
Manuscrit 4. Publié.	Assad M , Tatin-Froux F, Chalot M., Parelle J, (2017) Accumulation of trace elements in edible crops and poplar grown on a titanium ore landfill. <i>Environmental Science and Pollution Research</i> . Sous presse (IF 2015 : 2,8).
Manuscrit 5. En préparation.	Assad M , Parelle J, Chalot M., Tatin-Froux F (2016) Biomonitoring of the risk of element accumulation in edible crops growing on a sediment sludge. A soumettre au journal : <i>Ecotoxicology and Environmental Safety</i> (IF 2015 : 3,1).

Communications scientifiques

Communication	Référence
ICHMET Gand-Belgique	Mohamad Assad , Julien Parelle, Frédéric Gimbert, Michel Chalot, et Fabienne Tatin-Froux. Mercury uptake into poplar leaves, 12-15 september 2016, (poster).
FJC Besançon	Mohamad Assad , Julien Parelle, David Cazaux, Frédéric Gimbert, Michel Chalot, et Fabienne Tatin-Froux, L'absorption de mercure via les feuilles de peuplier, 16-17 juin 2016.
ADEME Paris	Mohamad Assad , Julien Parelle, Michel Chalot, et Fabienne Tatin-Froux, Mercure foliaire de peupliers cultivés sur le sol d'un site contaminé : absorption foliaire ou racinaire, colloque national ADEME, 18-19 novembre 2014, (poster).

1. Introduction générale

Le développement d'un organisme vivant est en grande partie régit par les substances qu'il puise dans son environnement. Leur présence et leur disponibilité sont corrélées aux cycles biogéochimiques établis au cours des lentes évolutions que la Terre a connues au fil des âges. Cependant, l'augmentation des activités humaines depuis les premières révolutions industrielles a perturbé ces équilibres par des rejets massifs de contaminants, tels que des composés organiques et des éléments traces métalliques, ou ETMs. Il est donc primordial de pouvoir étudier et élucider les mécanismes qui régissent leur comportement pour pleinement appréhender les risques qui leur sont associés.

1.1 Définitions et généralités

1.1.1 Les éléments traces métalliques

Les métaux sont des éléments chimiques possédant des propriétés de conduction de chaleur et d'électricité. Ils participent aux réactions chimiques sous forme de cations. Leurs différents effets sur les organismes permettent de les subdiviser en deux classes : les métaux essentiels et les métaux toxiques. Les métaux essentiels sont indispensables pour de nombreux processus cellulaires et se trouvent en proportion très faible dans les tissus biologiques. Tous les métaux (essentiels ou non) exercent une toxicité, quand ils sont présents sous des formes biodisponibles (Gadd et al., 2012), au-dessus d'un certain seuil. Cette valeur est dépendante de l'organisme, du tissu et de la nature de l'élément.

Le terme de métaux lourds est souvent utilisé dans la littérature. Les métaux « lourds » sont des éléments chimiques toxiques dont la masse volumique dépasse 5 g.cm^{-3} , de numéro atomique supérieur à 20 et formant des précipités insolubles avec les sulfures (Wang et Chen, 2006). C'est le cas, par exemple, du zinc, du cuivre, du plomb, du mercure, du chrome, du manganèse, du cobalt, de l'argent, du nickel et du cadmium. Mais ce terme « métaux lourds » est discuté car imprécis et mal défini. En effet, sous ce terme sont également regroupés d'autres éléments toxiques appartenant aux metalloïdes tels que l'arsenic et le sélénium ou encore des éléments qui ne sont pas « lourds » tels que l'aluminium ou le béryllium. De plus, le terme « métaux lourds » est synonyme d'une certaine toxicité. Cependant, certains de ces éléments sont indispensables à de nombreux processus biologiques et sont ainsi appelés oligoéléments ; c'est le cas par exemple du zinc ou du cuivre. D'autres n'ont aucun rôle biologique connu et sont donc toxiques, comme le mercure. La classification en métaux lourds est souvent discutée, car certains métaux toxiques ne sont pas particulièrement « lourds » (le zinc par exemple), tandis que certains éléments toxiques ne sont pas tous des métaux (l'arsenic notamment). Pour ces différentes raisons, la plupart des scientifiques préfèrent à l'appellation « métaux lourds », l'appellation « éléments traces métalliques » ou ETMs.

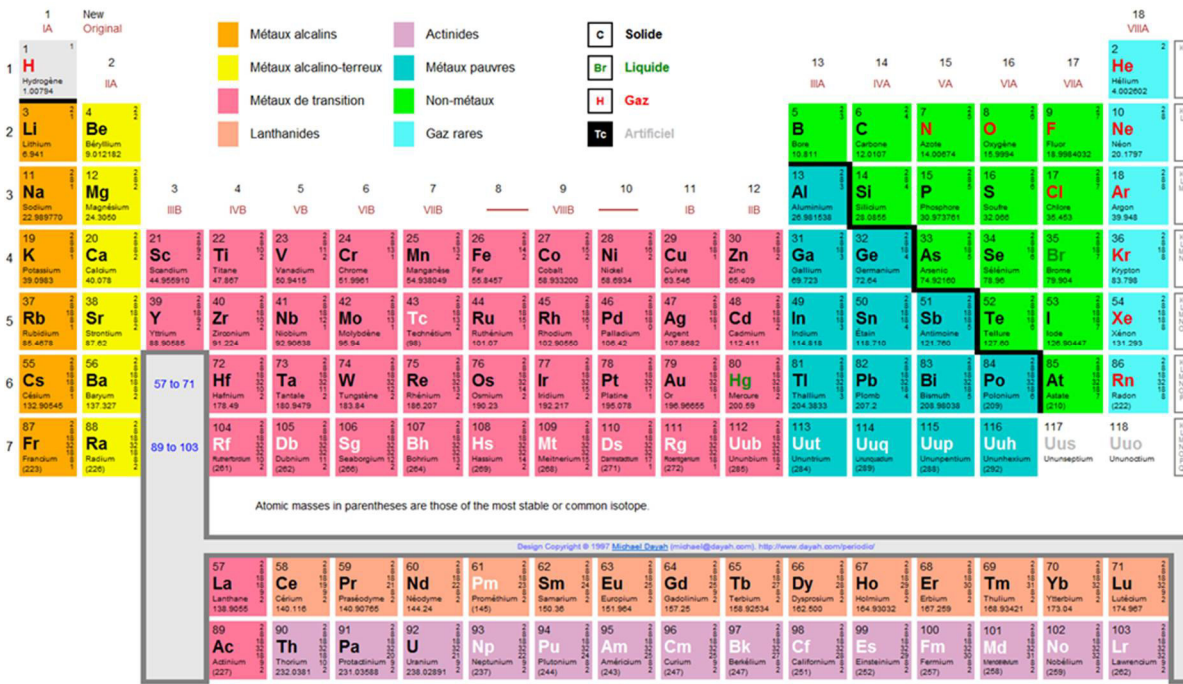


Figure 1: Tableau périodique des éléments de Mendeleïev (<http://www.ptable.com/?lang=fr>). Le trait noir sépare les métaux des métalloïdes et non métaux.

L'adjectif « trace » traduisant le fait que les métaux lourds sont présents dans tous les compartiments de l'environnement mais dans des quantités très faibles. Dans ce cas, l'appellation éléments traces métalliques ou ETMs est souvent utilisée par de nombreux auteurs. Ce terme regroupe des éléments métalliques naturels trouvés à l'état de traces dans l'environnement. Dans les sols, on admet généralement que les éléments traces sont ceux dont la concentration moyenne dans la croûte terrestre est inférieure à 0,1 %. Ils représentent ainsi 0,6 % du total, alors que les 12 éléments majeurs (Si, Al, Fe, Ca, Na, Mg, K, Ti, P, Mn, S et Ba) interviennent pour 99,4 % (Baize, 1997). La majorité des ETMs présents dans les sols appartiennent à la famille chimique des métaux et métalloïdes, mais seulement une partie d'entre eux présente un intérêt écologique, biologique ou économique. Bien que le terme « éléments traces métalliques » (ETMs) reste vague, il sera employé dans ce manuscrit car il est couramment admis dans la communauté scientifique et reste plus précis que son prédécesseur « métaux lourds ». Dans le cadre de cette étude, l'aluminium, le fer et le manganèse, non considérés comme « traces », seront également considérés comme des éléments dangereux, car ils sont également toxiques pour les plantes ou les micro-organismes à fortes doses (Figure 1).

1.1.2 Pollution et contamination métalliques

Lors des deux dernières décennies du XX^{ème} siècle, 22 000 tonnes de cadmium, 939 000 tonnes de cuivre, 783 000 tonnes de plomb et 1 350 000 tonnes de zinc (Singh et al., 2003) ont été relarguées dans l'environnement. Ces éléments traces peuvent avoir deux origines différentes : la lithosphère ou une origine anthropogénique.

Un sol est considéré comme contaminé par les ETMs lorsque la teneur en un élément donné est significativement supérieure à sa concentration naturelle dans le sol étudié, *i.e.* le fond pédogéochimique local. Les horizons supérieurs des sols étant généralement contaminés par des apports d'origine diffuse, le fond pédogéochimique local est évalué à partir des horizons profonds (King et al., 2008). Lorsque la contamination d'un sol par les ETMs a pour conséquence une perturbation du milieu ou de l'usage qui en est fait habituellement, le site est considéré comme pollué. Selon le site du Ministère en charge de l'écologie et du développement durable, un site pollué est donc un site qui « du fait d'anciens dépôts de déchets ou d'infiltration de substances polluantes, présente une pollution susceptible de provoquer une nuisance ou un risque pérenne pour les personnes ou l'environnement. Ces situations sont souvent dues à d'anciennes pratiques sommaires d'élimination des déchets, mais aussi à des fuites ou à des épandages de produits chimiques, accidentels ou pas.

Certains sites présentent donc des zones de pollutions aigües, comme les sites de stockage de sédiments ou d'effluents industriels, des décharges ou encore d'anciens sites miniers (teneurs souvent élevées et sur une surface réduite de quelques dizaines d'hectares au maximum), d'autres des pollutions plus diffuses, sur plusieurs centaines d'hectares, dues à des rejets atmosphériques accumulés au cours des années voire des décennies.

En France, les sites pollués sont répertoriés et font l'objet d'un suivi détaillé. Deux bases de données ont été créées afin d'en réaliser l'inventaire :

- Basol¹ qui répertorie les sites pollués ou potentiellement pollués appelant une action des pouvoirs publics à titre préventif ou curatif. Actuellement, environ 4350 sites sont enregistrés dans cette base ;
- Basias² qui a pour objectifs de recenser, de façon large et systématique, tous les sites industriels abandonnés ou non, susceptibles d'engendrer une pollution de l'environnement ; de conserver la mémoire de ces sites ; et de fournir des informations utiles aux acteurs de l'urbanisme, du foncier et de la protection de l'environnement. Actuellement, environ 350000 sites y sont répertoriés.

1.1.3 Les voies de dépollution / réhabilitation

Selon le site de l'ADEME³, les techniques de réhabilitation des sites pollués sont généralement classées en quatre grandes catégories : les procédés physicochimiques (lavages chimiques ou par agents tensio-actifs, stabilisation physico-chimique), thermiques (désorption thermique, incinération) et biologiques (bio lixiviation, bio-immobilisation, bioremédiation) ainsi que le confinement. Elles se distinguent par leur mode de mise en œuvre : techniques *ex situ* pour lesquelles le sol pollué est excavé puis traité hors site ou sur le site; ou techniques *in situ* où la pollution est traitée directement dans le milieu naturel.

Dans un contexte de pression foncière importante les sites pollués représentent des zones non exploitables d'un point de vue économique, social et écologique. De plus ces sites restent des réservoirs de contaminants potentiellement dangereux. Depuis les années 1980, les techniques biologiques dites de phytoremédiation, moins coûteuses et plus respectueuses de l'environnement, sont étudiées. La phytoremédiation représenterait une alternative durable permettant de réhabiliter les sols pollués et, regroupe l'ensemble des procédés utilisant les organismes végétaux pour la bio-dépollution : phytoextraction, phytostabilisation, phytovolatilisation (ADEME, 2009).

¹ <http://basol.ecologie.gouv.fr>

² <http://basias.brgm.fr>

³ <http://www.ademe.fr>

Dans le cas des ETMs, non dégradables, sont envisagées deux techniques. La phytostabilisation consiste à immobiliser le polluant dans la rhizosphère en vue de limiter son transfert vers les autres compartiments des écosystèmes. Un des avantages de la phytostabilisation est qu'elle s'accompagne de la production de biomasse végétale potentiellement valorisable. La phytoextraction, quant à elle, est basée sur l'utilisation de plantes accumulatrices en mesure de prélever le polluant du sol, de le transporter et, de le stocker dans les parties aériennes en concentration élevée (Capuana, 2011). **Dans le cas particulier d'ETMs présents sous forme gazeuse (Hg et sélénium), une dépollution par phytovolatilisation pourrait être envisagée. C'est pourquoi il est important de connaître les modalités d'absorption, de transfert et de transformation des espèces métalliques volatiles, avant de considérer le potentiel des espèces accumulatrices dans le domaine des phytotechnologies.**

Le temps estimé pour la phytoextraction des ETMs dans les sols varie de deux ans à plusieurs décennies en fonction de l'élément concerné, de sa spéciation dans le sol et de la plante choisie (Sheoran et al., 2011). Ce temps est d'autant réduit que la biomasse produite est importante. Or la plupart des plantes hyperaccumulatrices ont une production de biomasse assez réduite comme c'est le cas pour *Thlaspi caerulescens* par exemple. Une solution alternative est alors d'utiliser des plantes dites « accumulatrices » qui stockent les ETMs dans leurs parties aériennes en quantité moindre par rapport aux plantes hyperaccumulatrices mais qui ont une production de biomasse aérienne plus importante. L'intérêt s'est porté notamment sur l'utilisation d'arbres de la famille des Salicacées (peupliers ou saules) pour la phytoextraction (Bert et al., 2009). En effet, plusieurs études montrent que les saules ou les peupliers sont capables d'extraire de grandes quantités d'ETMs grâce à leur rapide et importante production de biomasse (Meers et al., 2007b; Migeon et al., 2009; Migeon et al., 2012). Par exemple, certains géotypes de saules peuvent extraire jusqu'à 216 g.ha⁻¹.an⁻¹ de cadmium contre 35 g.ha⁻¹.an⁻¹ pour *Thlaspi caerulescens* (Migeon et al., 2009a). De plus, l'utilisation de peupliers ou de saules présente un intérêt économique car la biomasse produite peut être valorisée pour la production de bioénergie. Ainsi, même si la phytoextraction à l'aide de peupliers ou saules nécessite un traitement de plusieurs années, la valorisation énergétique de la biomasse offre une bonne alternative pour les exploitants des sites contaminés. Le transfert des polluants contenu dans les biomasses issues des phytotechnologies nécessite cependant d'être évalué, en raison de la dispersion potentielle, et notamment par voie atmosphérique, des ETMs.

Ce transfert a été évalué récemment (Chalot et al., 2012; Delplanque et al., 2013) et d'autres voies de valorisations sont testées au travers des programmes nationaux ou européens (Greenland, LORVER, BIOFILTREE).

1.2 Cadre général et approches globales du projet de thèse

Ce travail de thèse vise à mieux comprendre le transfert d'ETMs entre les différents compartiments que constituent les sols, le couvert végétal et l'atmosphère, dans des environnements exposés à des activités anthropiques génératrices d'ETMs.

Dans le cadre de cette thèse, le Hg tient une place privilégiée car il constitue le principal élément lié à l'activité chlore-alcali du partenaire industriel impliqué dans les projets soutenant ce projet de thèse et rappelés ci-dessous. Nous nous sommes cependant également intéressés au transfert d'autres ETMs, qui constituent des contaminants majeurs sur d'autres sites sur lesquels portent les projets BIOFILTREE et PROLIPHYT.

- Le projet BIOFILTREE (Financement ANR, 2011- 2013) avait pour objectif **d'étudier la biofiltration ainsi que la dendrochimie sur quatre sites pollués par des ETMs (Al, Cu, Hg, Zn...)** suite à des activités industrielles ou agricoles, générant des risques environnementaux et sanitaires. De manière globale, ce projet s'est proposé de démontrer l'utilité et la faisabilité de la bioremédiation à grande échelle dans le contrôle du flux des ETMs dans les parties aériennes de plantes ligneuses, consistant en la co-culture d'aulnes et de peupliers en mode taillis à courte rotation, associée à des microorganismes rhizosphériques symbiotiques (biofiltration). La biomasse produite a également été étudiée dans le but d'une valorisation énergétique. Des parcelles de démonstration ont été installées sur 2 sites d'étude (Tavaux et Fresnes sur Escaut) qui seront décrits plus loin, avec le peuplier comme plante ligneuse modèle. Le transfert de Hg dans la biomasse du peuplier est au cœur des préoccupations scientifiques sur le site de Tavaux.
- Le projet PROLIPHYT (Financement ADEME , 2012- 2015) vise à **accroître le panel d'espèces ligneuses** potentiellement utilisables dans le domaine des phytotechnologies: le fait d'identifier de nouveaux genres ou variétés susceptibles d'être utilisés en phytoremédiation permettra d'offrir une plus large gamme de végétaux et d'ainsi favoriser la biodiversité nécessaire à la restauration des écosystèmes. Ainsi une vingtaine d'espèces ligneuses ont été implantées sur deux des sites étudiés (Tavaux et Thann) dans le cadre de ce projet de thèse, et sélectionnées en fonction des conditions pédogéochimiques et climatiques, ainsi que des espèces déjà présentes sur les sites.

Dans la présente étude, nous avons combiné les approches de terrain et de laboratoire pour déterminer les voies de transfert des ETMs dans les biomasses aériennes d'espèces ligneuses et d'espèces d'intérêt agronomique. En plus de cette **introduction générale** qui constitue la première partie, **ce manuscrit est composé de cinq autres parties** qui abordent la problématique, les objectifs, les expériences mises en place, et les résultats qui répondent à cette problématique :

- L'objet de la 2^{ème} partie est de dresser **une synthèse des principales connaissances** concernant les propriétés physico-chimiques des éléments traces étudiés, leur origine dans l'environnement, la chimie, la mobilité, le transfert vers le couvert végétal et la toxicité de ces éléments traces. Une attention particulière sera portée au Hg.
- **Les objectifs spécifiques** de ce travail de thèse sont présentés dans une 3^{ème} partie
- Les **méthodes analytiques et les différents dispositifs expérimentaux** mis en place dans le cadre du projet de thèse sont décrits dans la 4^{ème} partie.
- **Les résultats sont présentés et discutés** dans la 5^{ème} partie qui comprend deux chapitres :

→ Dans le premier chapitre, trois manuscrits rédigés en anglais sont présentés, **le premier manuscrit comprend le transfert de Hg dans la biomasse foliaire du peuplier et est étudié plus en détail**. Les modèles d'accumulation liée à l'âge des feuilles et les voies de transfert du Hg sont discutés en détail et comparés avec la littérature scientifique. Ce travail a été publié dans le journal « Chemosphere ». Le deuxième manuscrit montre les différentes formes de Hg détectées dans les feuilles de peuplier après avoir été absorbées. Ce travail a été publié dans le journal « Environmental Research ». le troisième manuscrit décrit **le transfert de Hg dans la biomasse aérienne d'espèces d'intérêt agronomique de la famille des Solanacées**. Dans ce manuscrit, les variations d'accumulation de Hg dans les différents organes (feuille et fruit) sont discutées en détail. Le risque associé à la consommation des parties comestibles sur la santé humaine a été également évalué par les teneurs accumulées dans les tissus comestibles et par comparaison aux doses journalières tolérées. L'utilisation de ces espèces comme bio indicateur d'une contamination en Hg atmosphérique est discutée. Ce chapitre décrit également **la réponse biochimique des végétaux au Hg** et examine la voie métabolique suivie pour l'entrée du Hg dans les cellules du système foliaire et le rôle des protéines hydrosolubles dans la chélation et la séquestration du Hg dans les feuilles d'une espèce modèle. Ce travail fait l'objet d'un manuscrit en préparation.

→ Le deuxième chapitre comprend deux manuscrits rédigés en anglais, qui décrivent **le transfert d'ETMs dans des espèces d'intérêt agronomique, ainsi que le risque associé à leur consommation lorsqu'ils sont susceptibles d'être** cultivés dans les jardins urbains proches des sites d'étude. Le travail concernant le site de Thann a été publié dans le journal « Environmental Science and Pollution Research » et le travail concernant le site de Fresnes fait l'objet d'un manuscrit en préparation.

- La 6^{ème} partie est consacrée à la **discussion générale des résultats et aux perspectives** qui découlent de ce travail de thèse.

2. Synthèse bibliographique

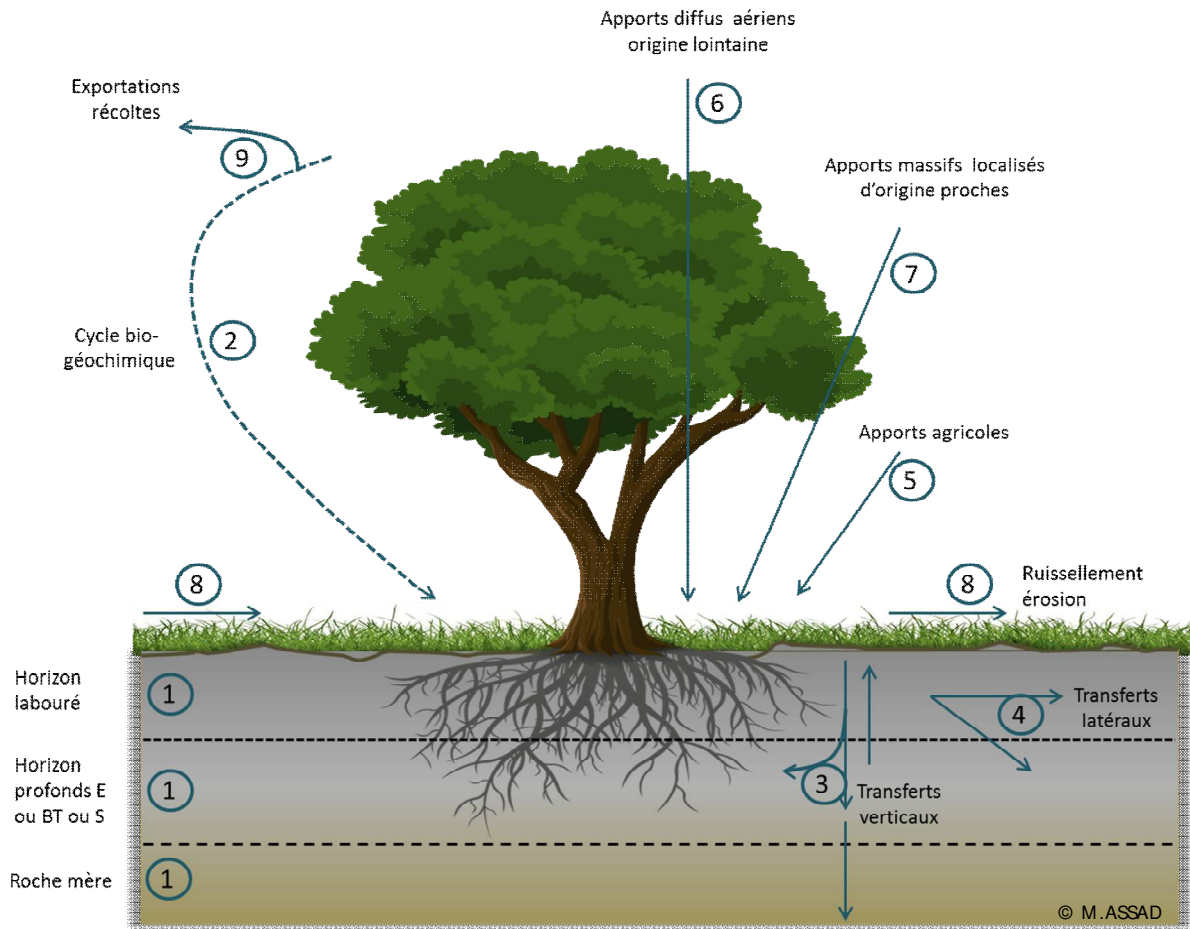


Figure 2: Schéma du cycle des ETMs dans les sols (modifié d'après Baize, 1997).

Tableau 1: Concentrations moyennes de quelques ETMs dans les sols et les plantes en mg/kg. Etendue des moyennes observées dans la bibliographie par Gardea-Torresdey et al. (2005).

ETM (mg/ kg)	sols non métallifères	sols métallifères	dans les plantes sur sols non métallifères
Cadmium	0,01 - 2	10 - 320	0,1 - 3
Chrome	5 - 1500	50 - 8450	0,2 - 5
Cuivre	2 - 250	52 - 50900	5 - 25
Mercure	0,01 - 0,5	100 - 400	0,1 - 9,5
Nickel	2 - 750	20 - 11250	1 - 10
Plomb	2 - 300	3850 - 49900	0,1 - 5
Zinc	1 - 900	110 - 70450	2 - 400

2.1 Origines naturelle et anthropique des ETMs

2.1.1 Généralités

La première origine de la présence d'ETMs dans un sol provient de l'altération de la roche-mère qui le constitue ; elle est donc naturelle. Selon la composition chimique initiale de la roche, un sol sera plus ou moins enrichi en oligo-éléments et/ou en ETM (**Figure 2①**). En France, les roches sont très variées à la fois par leur faciès lithologique (granites, gneiss, grès, craies...) et par leur composition chimique. Par exemple, les sols argileux et riches en fer sont particulièrement riches en nickel ; c'est notamment le cas dans les Vosges et le Jura où les teneurs en nickel peuvent dépasser 150 mg.kg^{-1} ($< 25 \text{ mg.kg}^{-1}$ dans les autres régions). De même, pour le plomb, de plus fortes teneurs ($> 100 \text{ mg.kg}^{-1}$ contre $< 30 \text{ mg.kg}^{-1}$ habituellement) sont présentes dans les horizons profonds situés dans les zones de contact entre les bassins sédimentaires et les massifs cristallins, notamment dans le Morvan et certaines zones du Massif central. Les ETMs peuvent aussi être apportés par le vent ou la pluie sous forme de poussières ou d'aérosols provenant d'activités volcaniques, d'embruns maritimes ou de la volatilisation de météorites lorsqu'elles pénètrent dans l'atmosphère (**Figure 2②**). Les transferts pédologiques latéraux peuvent aussi apporter, par exemple via l'érosion d'un sol en amont, des particules chargées en ETMs. Certains ETMs passent sous une forme soluble à des pH acides ($\text{pH} < 5$) et peuvent ainsi être apportés par les eaux de ruissellement (**Figure 2④**). Les concentrations moyennes en ETMs rencontrées dans les sols se trouvent dans une gamme allant de moins de 0,01 à plus de 1 500 mg par kg de sol mais peuvent dépasser 50 à 70 g/kg dans les sols métallifères (Gardea-Torresdey et al., 2005). Ces quantités sont variables selon le type de métal comme indiqué dans le **Tableau 1**. Il en résulte des concentrations variables dans les plantes qualifiées de sensibles. Les éléments métalliques issus de cet héritage lithosphérique constituent le fond pédogéochimique, qui correspond aux teneurs en éléments, résultant de phénomènes géologiques et pédogénétiques (différenciation d'horizons) en l'absence de toutes contaminations liées à l'activité humaine (Baize, 1997). La composition d'un sol en ETMs peut aussi varier entre les différents horizons. Ainsi, un cycle biogéochimique se met en place entre les sols et les plantes. Ces dernières absorbent les ETMs via les racines et les redistribuent dans leurs différents organes (**Figure 2②**). Ils retourneront ensuite dans les sols, soit directement (décomposition des racines), soit indirectement (enrichissement des horizons supérieurs par décomposition des parties aériennes), sous des formes plus mobiles et plus biodisponibles (**Figure 2③**).

L'exportation des récoltes rompt ce cycle puisqu'elle provoque le départ des ETMs contenus dans les feuilles, les tubercules et/ou les graines des végétaux et entrent ainsi dans la chaîne alimentaire humaine (**Figure 2⑨**).

Enfin, les précipitations annuelles de nos climats tempérés sont responsables de transferts pédologiques verticaux ou latéraux (**Figure 2**^{③④}) car les plantes n'ont pas une évapotranspiration suffisante pour compenser les phénomènes d'érosion ou d'infiltration dus à la pluie.

La seconde source de présence d'ETMs dans l'environnement est d'**origine anthropique** qui résulte en deux types de contamination engendrée par ces apports:

- **les contaminations locales ou aigües**, qui touchent une aire relativement faible et sont dues à une ou plusieurs source(s) bien identifiée(s) et souvent très proches(s) (quelques mètres à quelques kilomètres). Il s'agit généralement d'apports massifs, souvent associés aux exploitations minières, aux installations industrielles et à d'autres installations, tant en cours d'exploitation qu'après leur fermeture (Adriano et al., 2004; Baize, 1997). Les zones minières ou de stockage de déchets miniers constituent un cas particulier, les concentrations en ETMs étant localement très élevées. Les contaminations en provenance de stations d'épuration, le dragage des sédiments des canaux et des ports qui peut remettre en suspension des éléments métalliques, sont d'autres exemples de contaminations localement très élevées. Les concentrations en ETMs des sédiments du Nord Pas-de-Calais issus des canaux et des rivières en sont un bon exemple (Baize, 1997).

- **les contaminations diffuses**, qui affectent tous les sols, plus ou moins faiblement mais de manière généralisée. Ce type de contamination résulte principalement de dépôts atmosphériques qui ne peuvent pas être liés à une ou plusieurs source(s) ponctuelle(s) identifiable(s) et des pratiques agricoles et horticoles (épandage d'engrais, traitements phytosanitaires, etc.). Le vent et la pluie peuvent en effet véhiculer des particules, poussières ou aérosols provenant des chauffages, des activités industrielles ou des automobiles qui constituent des apports diffus aériens d'origine lointaine (**Figure 2**^⑥). Plus localement, des apports massifs d'origine proche, dus à une source de pollution importante dans un site très proche du sol étudié, (**Figure 2**^⑦) sont aussi possibles. Ce type de contamination ne peut être totalement évité : elle est la conséquence d'apports involontaires (émissions atmosphériques industrielles, rejets atmosphériques générés par les incinérateurs, par l'industrie sidérurgique par exemple) ou d'impuretés indésirables dans les apports volontaires (ETMs dans les engrais minéraux, par exemple) (Baize, 1997). Certaines pratiques agricoles sont une première cause de pollution d'un sol par les ETMs due aux activités humaines (**Figure 2**^⑤). En effet, certains engrais, surtout ceux d'origine organique (engrais phosphatés, lisiers, boues d'épuration) peuvent contenir des quantités non négligeables d'ETMs. Par ailleurs, une norme française mise en place en 1985, la norme AFNOR NF U 44-041 réglemente les teneurs en ETMs autorisées dans les boues d'épuration destinées à l'épandage agricole ainsi que les quantités possibles à épandre par hectare.

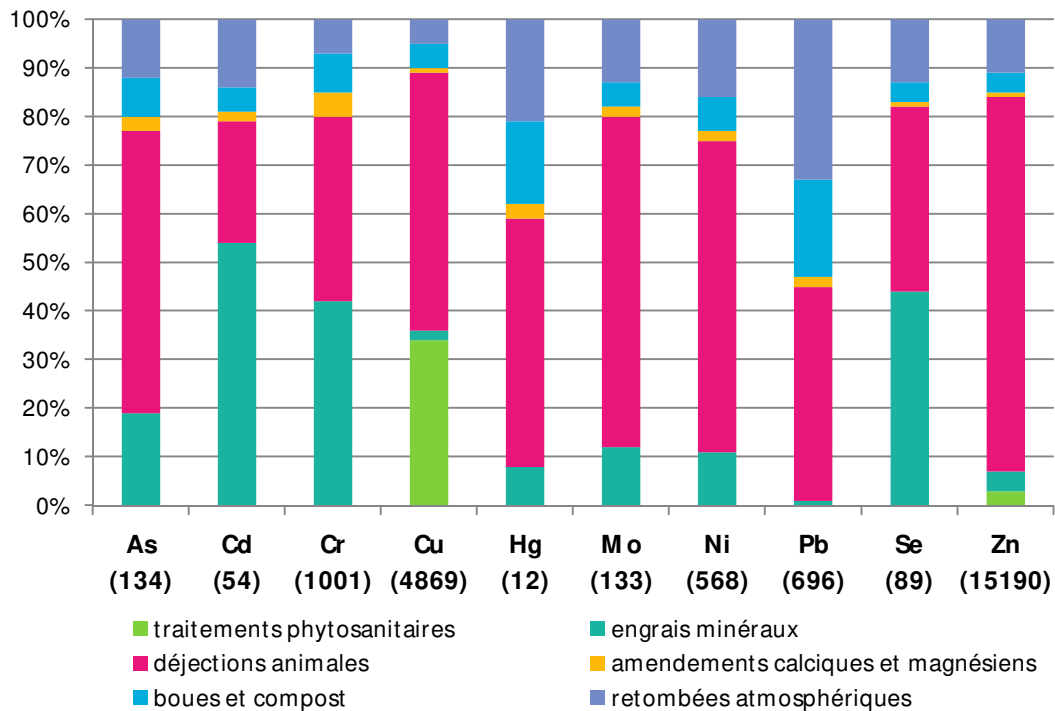


Figure 3: Part des différentes sources de contamination dans l'estimation des quantités totales d'ETMs entrant sur les sols agricoles en France (d'après [Sogreah, 2007](#)). Les données entre parenthèses correspondent aux quantités totales estimées d'ETMs, exprimées en tonnes, entrant sur les sols agricoles en France par an.

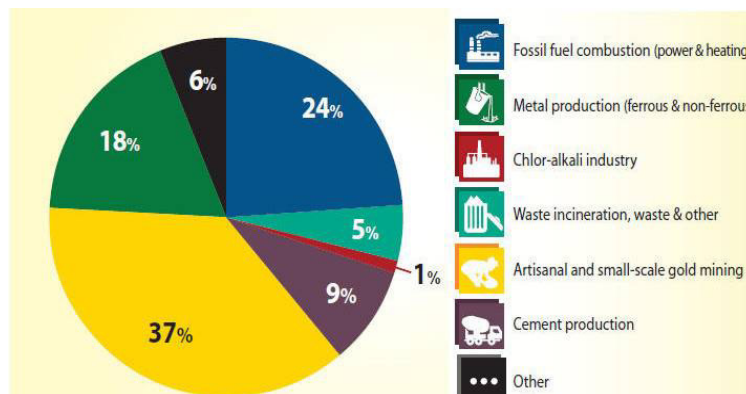


Figure 4: Principales sources anthropiques d'émission de Hg en 2010 ([UNEP, 2013](#)). Les petites exploitations minières d'or et la combustion du charbon contribuent à 61% du total des émissions anthropiques annuelles dans l'air. D'autres grands contributeurs comprennent la production de métaux ferreux et non ferreux et la production de ciment, ainsi responsables de 27% ([UNEP, 2013](#)).

Certains produits de traitement phytosanitaire peuvent aussi contenir des ETMs (sels de cuivre, arséniate de plomb...).

En France, une étude réalisée par la société Sogreah à la demande de l'ADEME a permis d'identifier les sources de contamination et d'évaluer les quantités d'ETMs entrant sur les sols agricoles (Sogreah, 2007). Les principales sources de contamination mises en évidence par cette étude sont par ordre croissant de contribution : les traitements phytosanitaires (sauf pour le cuivre et le zinc), les amendements calciques, les boues et composts, les retombées atmosphériques, les engrais minéraux et les déjections animales (**Figure 3**).

2.1.2 Cas particulier du Hg

Ce chapitre propose de faire un bilan des connaissances concernant la mobilité et les caractéristiques chimiques des différentes formes de Hg dans l'environnement et chez les êtres vivants.

2.1.2.1 Origine du Hg

Les deux sources principales de Hg sont d'origines naturelle et anthropique (Selin, 2009) :

- **les processus naturels** tels que l'altération des roches, les événements volcaniques et l'activité géothermique (Selin, 2009 pour une revue). Généralement, la concentration initiale de Hg dans le sol varie de 0,03 à 0,1 mg kg⁻¹ avec une concentration moyenne de 0,06 mg kg⁻¹.
- **les activités anthropiques**, qui incluent la combustion du charbon (Feng et al., 2002; Hassett et al., 2004), l'incinération des déchets (Mukherjee et al., 2004), l'affinage des métaux et de la fabrication (Feng et al., 2004; Wu et al., 2006), la production de chlore-alcali (Southworth et al., 2004; Landis et al., 2004), qui rejettent toutes une grande quantité de Hg dans l'environnement (**Figure 4**). Plus de 95% du Hg atmosphérique existe sous forme de Hg⁰ en raison de la pression élevée de sa vapeur et de la vitesse de dépôt relativement faible dans les conditions ambiantes (Liu et al., 2011). Actuellement, les concentrations basales de Hg gazeux total Hg⁰ mesurées à des endroits éloignés des sources anthropiques immédiates sont dans une gamme de 1 à 4 ng/m³, avec un gradient de concentration de l'hémisphère Nord à l'hémisphère Sud (Liu et al., 2011). La **Figure 5** montre la production et la consommation globales (Mg/an), ainsi que les émissions de Hg au cours des cinq derniers siècles. Cette étude est une analyse de métadonnées réalisée par Amos et al., (2015), et qui souligne la corrélation positive entre production, consommation, et émissions de Hg depuis le milieu du 19^{ème} siècle.

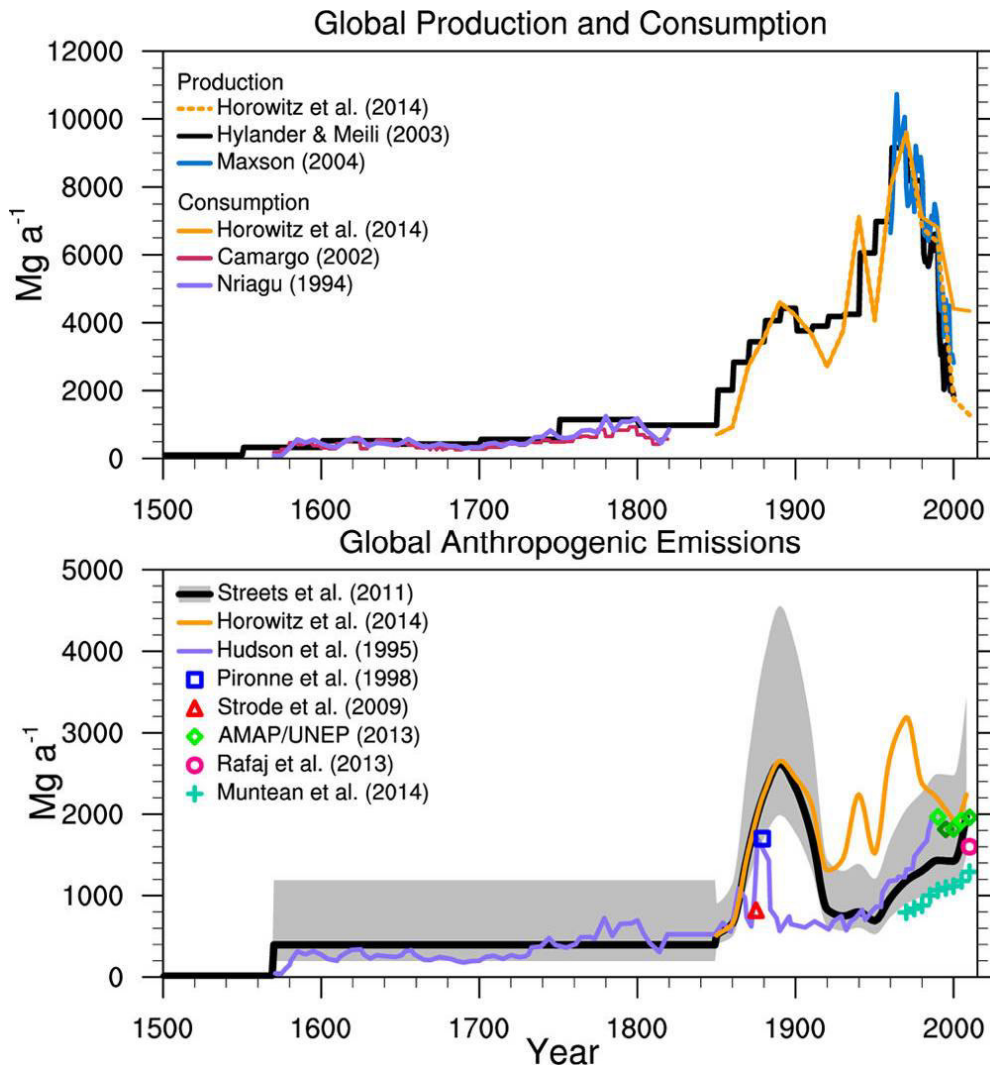


Figure 5: Production, consommation et émissions de Hg au cours des 5 derniers siècles, d'après Amos et al. (2015).

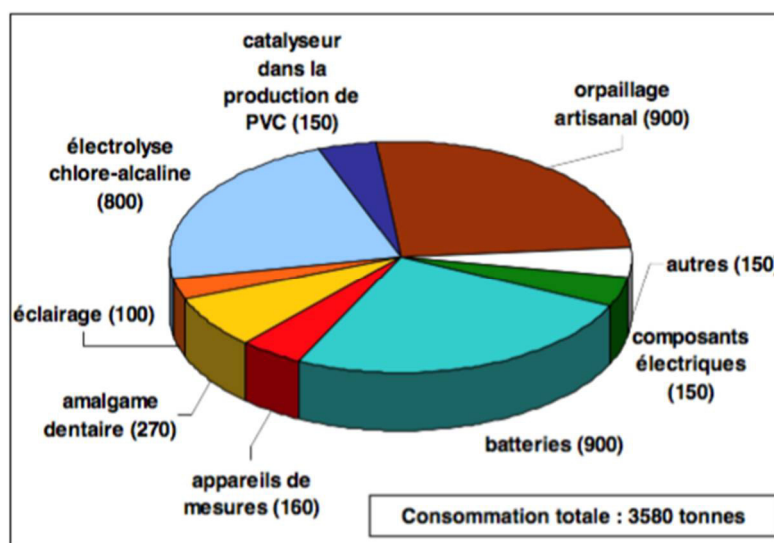


Figure 6: Consommation estimée de Hg dans le monde en 2003 - valeurs exprimées en tonne (Maxson, 2005).

2.1.2.2 Utilisations industrielles du Hg

Depuis plus de 3000 ans, l'Homme a utilisé le Hg pour de nombreuses applications. Les chinois employaient le minerai rouge de cinabre, composé de sulfure de mercure (HgS), comme colorant d'encre; les orpailleurs utilisaient le mercure élémentaire pour extraire l'or (activité toujours d'actualité) ; le calomel (Hg₂Cl₂) rentrait dans la composition de « poudres à dentition » au XX^{ème} siècle, utilisées pour prévenir les douleurs liées à la pousse des dents chez les nouveaux nés (Clarkson et Magos, 2006). Ces multiples utilisations ont surtout mis en évidence la toxicité du Hg et de ses composés pour la santé humaine et sur l'environnement.

Les propriétés physico-chimiques exceptionnelles du Hg ont en effet conduit à son utilisation très vaste dans différentes industries depuis la révolution industrielle. La **Figure 6** détaille les principaux secteurs où le Hg est utilisé ainsi que sa consommation associée. Ces applications industrielles font principalement appel au Hg élémentaire ou aux formes inorganiques du Hg. L'emploi d'espèces organiques tend à diminuer: en France, plusieurs gouvernements ont interdit leur utilisation dans les activités agricoles (Horvat et Gibičar, 2005) tandis que dans l'industrie pharmaceutique, le mercurochrome est remplacé par d'autres molécules antiseptiques pour éviter tous risques d'allergies (Galindo et al., 1997) et l'utilisation du Thimerosal est réduite de par la suspicion d'effets délétères sur la santé humaine (Clarkson et Magos, 2006).

Ces applications industrielles ont généré des déchets et des boues contaminés par le Hg (Xu et al., 2015), qui sont ensuite stockés dans les décharges de résidus. Ces décharges sont souvent équipées d'une membrane imperméable pour empêcher le transfert de Hg par lixiviation dans l'environnement (Mukherjee et al., 2004). A l'arrêt des dépôts de sédiments, une recolonisation spontanée par des espèces végétales endogènes est souvent observée, ce qui peut affecter le cycle local du Hg car les espèces végétales sont susceptibles de capter une partie du Hg comme le suggère les travaux de Lee and Lee (2012) (voir à ce propos la section 2.2.2.3).

Les émissions atmosphériques anthropiques cumulées de Hg depuis 1850 ont été récemment estimées à 215 000 tonnes (en comptant seulement les rejets de Hg provenant de la production commerciale de chlore-alcali, l'incinération des déchets et l'exploitation minière). D'autres utilisations commerciales de Hg, incluant les rejets non atmosphériques résultant des industries chlore-alcali et l'exploitation minière atteignent 540 000 tonnes supplémentaires de Hg rejetés dans l'environnement mondial depuis 1850 (air: 20%; l'eau: 30%; le sol: 30%; les décharges: 20 %). Une partie de cette libération a été séquestré dans les décharges et les sédiments benthiques, mais 310 000 tonnes circulent activement entre les réservoirs géochimiques et contribuent actuellement à des concentrations élevées de Hg environnemental (Horowitz et al., 2014). La **Figure 4** détaille les principales activités industrielles émettrices du Hg (UNEP, 2013).

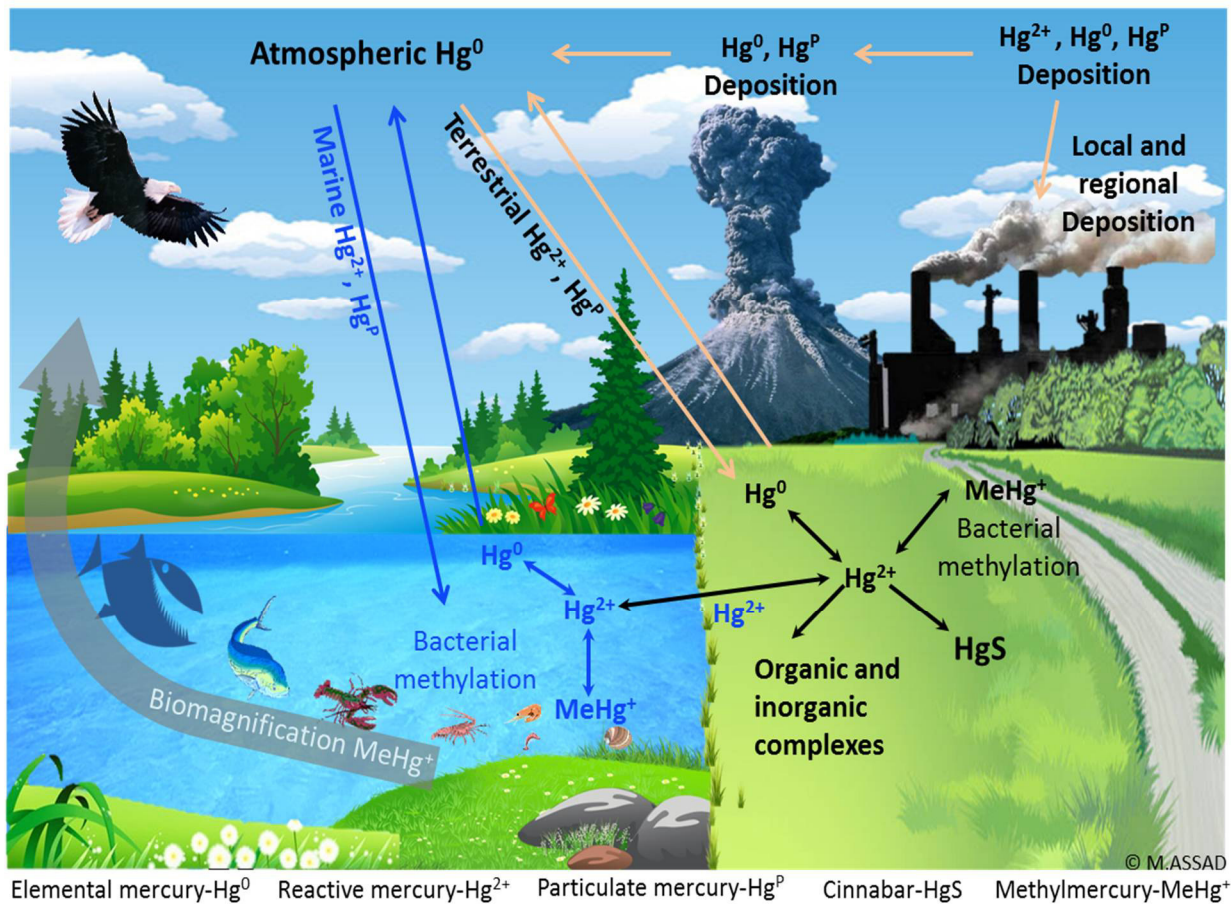


Figure 7: Les processus biogéochimiques de transformation du Hg (modifiée d'après Robles et al., 2014).

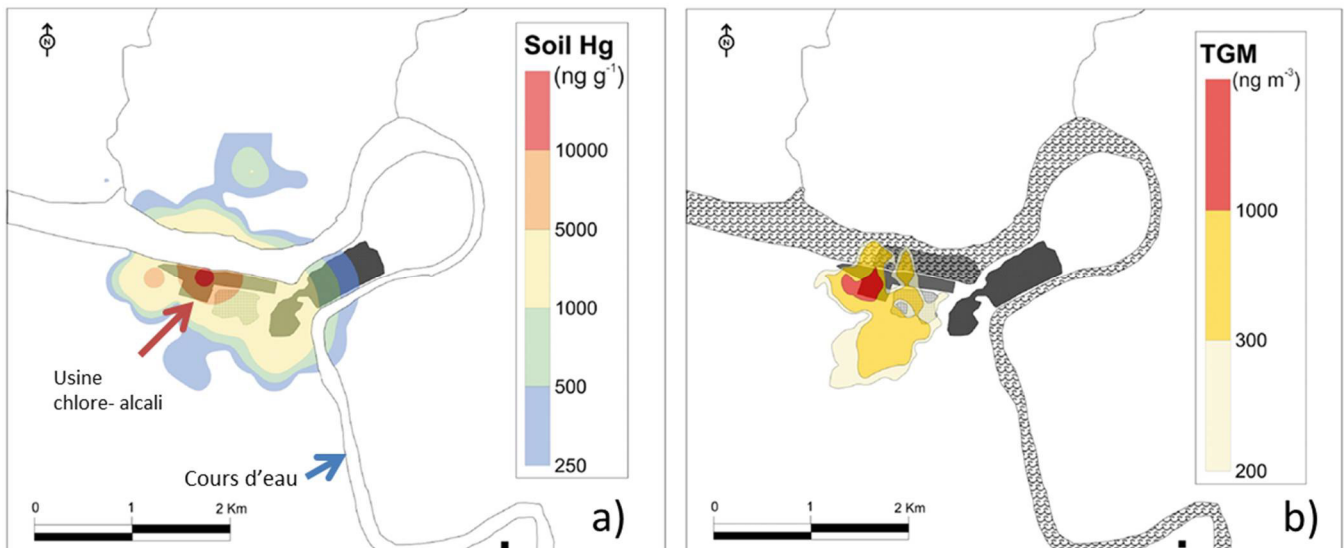


Figure 8: Cartographie des teneurs en Hg mesurées dans les sols (a) et dans l'atmosphère (b) autour d'une usine chlore-alcali (Esbrí et al., 2014).

2.1.2.3 Cycle biogéochimique du Hg

Le cycle biogéochimique global du Hg est dynamique et complexe parce que le Hg peut être facilement transporté à travers l'atmosphère et circule dans les écosystèmes terrestres et aquatiques. Le Hg s'évapore facilement sous sa forme élémentaire Hg^0 très mobile, en raison de son faible point d'ébullition ($357^\circ C$ à la pression atmosphérique, Mukherjee et al., 2004), et Hg^0 est donc l'espèce dominante de Hg émis du sol vers l'atmosphère (Kim et al., 1995).

La **Figure 7** illustre le cycle biogéochimique du Hg dans la biosphère. Ce dernier a été fortement perturbé depuis les révolutions industrielles par l'introduction massive de Hg liée aux activités anthropiques : les concentrations des différents compartiments environnementaux sont en moyenne trois fois supérieures à celles de l'ère pré-industrielle (Tessier, 2004).

Dans le cas particulier des industries chlore alcali qui produisent des produits chlorés à partir de l'extraction électrolytique du Cl (procédé Solvay), les électrodes à Hg ont été largement utilisées et leur utilisation a généré des déchets contaminés par le Hg et des émissions de Hg dans l'atmosphère de façon très locales, alors que leur contribution à la contamination atmosphérique globale reste minime (**Figure 4**). L'utilisation d'électrode à Hg a été abandonnée depuis l'année 2008 (Guédron et al., 2013) au profit des procédés membranaires. Les sols et l'atmosphère situés à proximité immédiate de ces usines sont généralement pollués en Hg en raison des rejets dans l'environnement local et provenant des déchets, de la boue, et des résidus contaminés durant les procédés, comme l'illustrent les travaux de Esbrí et al., (2014) et la **Figure 8**.

2.1.3 Caractéristique chimique des métaux et leur comportement au milieu vivant

Les ETMs pénètrent dans les tissus végétaux grâce à leurs propriétés chimiques, qui leur permettent d'être impliqués dans des réactions de réduction et d'oxydation, dans des conditions physiologiques. Les réactions après le contact de l'ETM et la biomolécule cible impliqueraient (i) une liaison non covalente par la formation de liaisons hydrogène et ioniques impliquant l'interaction de certains ETMs avec des cibles telles que des récepteurs membranaires, les récepteurs intracellulaires, et des canaux ioniques et (ii) une liaison covalente dans la plupart des ETMs qui réagissent avec les atomes nucléophiles. Ces atomes sont abondants dans les macromolécules biologiques, telles que des acides aminés, des protéines et des acides nucléiques.

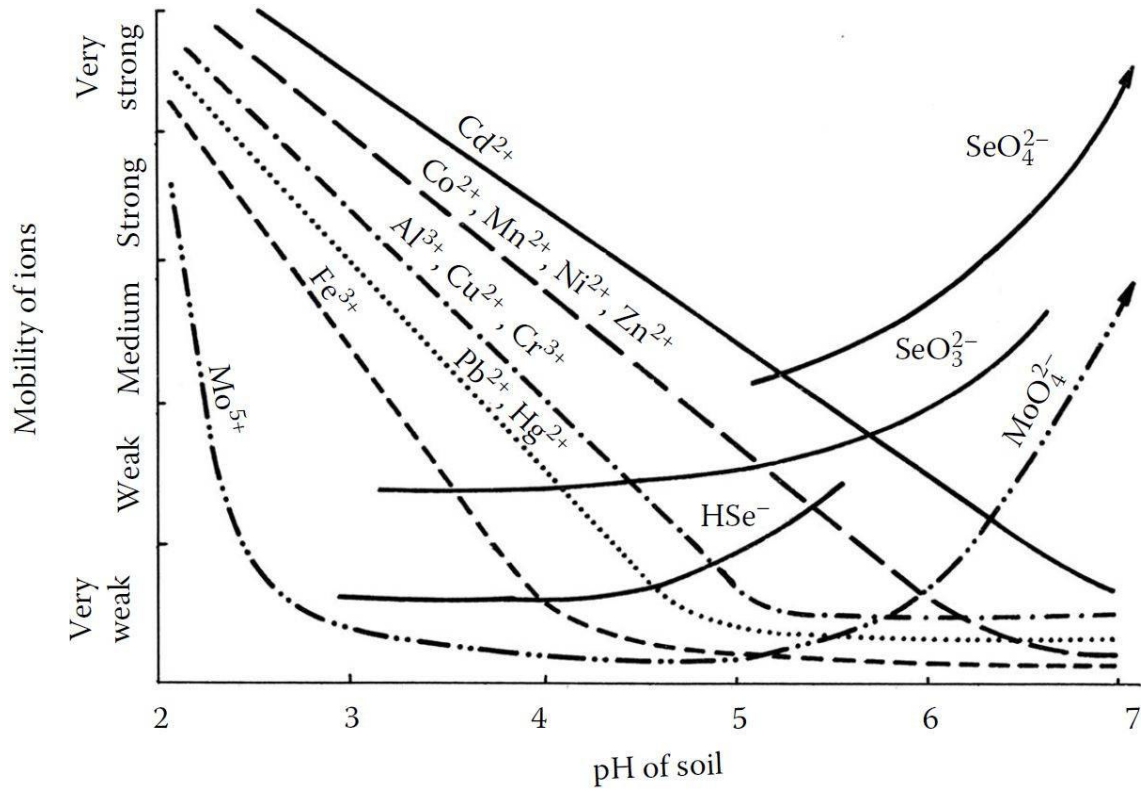


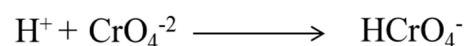
Figure 9: Schéma représentant la mobilité des ions métalliques en fonction du pH du sol d'après Kabata-Pendias (c2011).

Les métaux électrophiles mous tels que le Ag, le Cd et le Hg et les métaux électrophiles intermédiaires tels que le Cu, le Zn et le Fe réagissent avec des nucléophiles mous comme du soufre dans des résidus cystéines dans les protéines et glutathion (thiols) et le soufre des méthionines (thioéther). Ainsi des électrophiles durs tels que le Li, le Ca et le Ba réagissent préférentiellement avec des nucléophiles durs (oxygène de purines et des pyrimidines dans les acides nucléiques et de l'oxygène de phosphate des acides nucléiques). En revanche, le Cr, le Zn et le Pb réagissent de façon intermédiaire et présentent une réactivité universelle à toutes les nucléophiles dont l'azote dans des groupes amino primaires et secondaires des protéines, et l'azote des bases purine dans des acides nucléiques (Shanker, 2008). La cystéine possède un atome thiol S qui devrait être non protoné (thiolate) lorsqu'il est impliqué dans la coordination de l'ion métallique. Il est un bon ligand pour le Fe, Cu, et Zn, ainsi que pour les métaux toxiques tels que le Cd et le Hg (Shriver and Atkins, 2001).

2.1.3.1 Caractéristiques chimiques générales des ETMs Cd, Cr, Mn, Pb, Ti et Zn

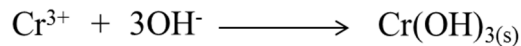
Le Cd appartient au groupe IIB du tableau périodique des éléments. Sa configuration électronique est [Kr] 4d¹⁰ 5s². Il existe sous deux états d'oxydation: 0, et +2. Certaines espèces de Cd pourraient exister dans la solution du sol: (1) dans le sol en conditions aérobies, Cd²⁺, CdSO₄ et CdCl⁺; (2) dans le sol acide, Cd, CdCl⁺, CuSO₄; et (3) dans le sol alcalin, CdHCO₃⁺. La solubilité du Cd est fortement liée à l'acidité de la solution du sol (**Figure 9**). L'acidité critique dans les sols minéraux se situe dans la gamme de pH de 4,0-4,5, à laquelle une baisse du pH de seulement 0,2 unités se traduit par une augmentation de 3-5 fois en fraction labile de Cd (Kabata-Pendias, c2011).

Le Cr appartient au groupe VIB du tableau périodique des éléments. Sa configuration électronique est [Ar] 3d⁵ 4s¹. Il existe normalement sous la forme d'ions inorganiques et il se trouve sous différents états d'oxydation : Cr²⁺, Cr³⁺ et Cr⁶⁺. Les états d'oxydation courants sont +3 et +6, soit Cr (III) et Cr (VI), connu comme le chrome trivalent et hexavalent, respectivement, et sont les plus stables et communs dans les milieux terrestres. Dans des conditions oxydantes, soit aérobies, le chrome existe habituellement à l'état VI, comme l'ion chromate CrO₄⁻², alors, cet oxyanion est protoné à HCrO₄⁻² dans des conditions légèrement acides.



Dans des conditions réductrices, i.e. anaérobies, le chrome est présent habituellement à l'état III (Cr³⁺ en solution aqueuse).

Cependant, la solubilité aqueuse de cet ion est peu élevée, et Cr(III) est souvent précipité sous forme hydroxylées, le Cr(OH)₃ en milieu alcalin, neutre, voire en conditions légèrement acides :



Le Mn appartient au groupe VIIB du tableau périodique des éléments. Sa configuration électronique est [Ar] 3d⁵ 4s². L'état d'oxydation et la biodisponibilité de Mn est fortement dépendante du pH du sol, par exemple la forme Mn (II) est la plus soluble et de plus en plus abondante à des pH < 5,5 et les formes moins solubles sont le Mn (III), Mn (IV) et Mn (VII) qui deviennent plus abondantes à des pH > 6,5 (DalCorso, 2012).

Le Pb appartient au groupe IVA du tableau périodique des éléments. Sa configuration électronique est [Xe] 4f¹⁴ 5d¹⁰ 6s² 6p². Bien que la forme élémentaire ne soit pas un problème environnemental ni pour la plupart des formes de vie, il devient une véritable préoccupation lorsqu'il se dissout pour former des espèces ioniques Pb²⁺ et Pb⁴⁺. L'ion Pb²⁺ est l'ion le plus commun, tandis que l'ion Pb⁴⁺ ne se produit qu'en conditions très oxydantes. On le trouve dans la solution du sol sous forme d'espèces cationiques: Pb²⁺, PbCl⁺, PbOH⁺ et d'espèces anioniques: PbCl³⁻ et Pb(CO₃)₂²⁻ (Kabata-Pendias and Sadurski, 2004).

Le Ti appartient au groupe IVB du tableau périodique des éléments. Sa configuration électronique est [Ar] 3d² 4s². Ces états d'oxydation sont +2, +3, +4, mais dans les minéraux le Ti se produit principalement dans l'état d'oxydation tétravalent TiO₂, en tant que composant principal des oxydes, des titanates et des silicates. La solubilité de Ti dans les sols est très limitée, ce qui conduit à une augmentation des quantités relativement stables de Ti dans l'horizon supérieur du sol.

Le Zn appartient au groupe IIB du tableau périodique des éléments. Sa configuration électronique est [Ar] 3d¹⁰ 4s². Il existe ainsi sous deux états d'oxydation: 0, et + 2. Le Zn est un micronutriment essentiel et participe à de nombreux processus cellulaires chez les plantes, tels que l'activation de l'enzyme, le métabolisme des protéines et des glucides, des lipides et des acides nucléiques. Le Zn est habituellement abondant dans le composant minéral des sols et est présent sous forme de ZnS, ZnSO₄, ZnAl₂O₄, ZnCO₃, Zn₃(PO₄)₂ et Zn₂SiO₄ (DalCorso, 2012).

2.1.3.2 Caractéristiques chimiques du mercure

Les espèces de Hg peuvent être regroupées en trois catégories (Qvarnström, 2003; Tessier, 2004 ; Horvat et Gibičar, 2005) :

- Le Hg élémentaire ou Hg⁰ ;
- Le Hg inorganique réunissant le Hg monovalent (Hg⁺) et divalent (Hg²⁺) sous forme de sels ou pouvant former des complexes avec des ligands ;

Tableau 2: Propriétés physico-chimiques générales du Hg (Qvarnström, 2003 ; INRS, 2016).

<i>Numéro atomique</i>	80		
<i>Période / groupe</i>	12 / 6 (IIB)		
<i>Structure électronique</i>	[Xe] 4f ¹⁴ 5d ¹⁰ 6s ²		
<i>Degré d'oxydation à l'état naturel</i>	0	+I	+II
	mercure	mercureux	mercurique
<i>Masse molaire</i>	200.59 ± 0.02 g.mol ⁻¹		
<i>Point de fusion</i>	-38,8 à -38,48 °C		
<i>Point d'ébullition</i>	356,7 à 356,9 °C		

- Le Hg organique rassemblant les espèces formées à partir d'une liaison covalente entre le Hg divalent (Hg^{2+}) et au moins un atome de carbone.

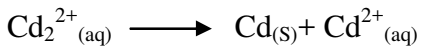
Les principales propriétés du Hg sont regroupées dans le **Tableau 2**.

Le Hg existe ainsi sous trois états d'oxydation: 0, + 1 et + 2. Dans l'environnement atmosphérique, le Hg existe principalement sous la forme élémentaire $\text{Hg}(0)$ et dans l'état d'oxydation + 2, en revanche l'état d'oxydation + 1 est très rare (Schroeder and Munthe, 1998). La vapeur de Hg et les composés organo-mercuriels volatiles peuvent parcourir de longues distances dans l'atmosphère. Finalement, le Hg élémentaire est oxydé en Hg^{2+} et les organo-mercuriels sont décomposés, à la fois, par réaction avec de l'ozone ou hydroxyle atmosphérique ou avec des radicaux halogènes. Les ions Hg^{2+} sont solvatés par les molécules d'eau et déposés lors des précipitations. Non seulement les rejets atmosphériques directs du Hg contribuent à la diffusion de cet élément, mais les décharges de résidus et les dépôts de Hg peuvent se produire loin de la source d'émission, et sont distribués assez uniformément autour du globe. La situation est encore compliquée par le fait qu'une fraction importante de Hg stockée dans les décharges de résidus ou provenant des dépôts atmosphériques est recyclée à travers des processus naturels qui produisent des composés volatiles ou des vapeurs de Hg. Par exemple, une grande partie de l'activité de biométhylation, des bactéries sulfato-réductrices produisent du diméthyl Hg, $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$, qui, étant volatile, est relargué dans l'atmosphère. D'autres bactéries ont une enzyme (méthylmercure lyase) qui rompt la liaison de méthyle mercure CH_3Hg^+ , et une autre enzyme (méthylmercure réductase) qui réduit le Hg(II) en $\text{Hg}(0)$. C'est un mécanisme de résistance développé par les microorganismes, qui leur permet d'évacuer le Hg sous forme volatile Hg^0 (Shriver and Atkins, 2001).

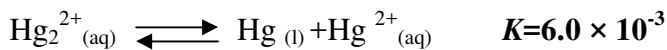
Dans des solutions aqueuses, le Hg ionique peut exister sous les formes monovalente [$\text{Hg}(I)$, $5d^{10} 6s^1$] ou divalente [$\text{Hg}(II)$, $5d^{10} 6s^0$]. Hg (I) existe sous la forme d'un dimère, Hg_2^{2+} ; tandis que Hg (II) agit comme un acide mou et peut former des complexes stables avec des ligands tels que OH^- , Cl^- , Br^- , I^- , SO_3^{2-} et CN^- . Dans la nature, le Hg se produit principalement en sulfure (cinabre), et parfois comme un chlorure ou un oxyde (Lin and Pehkonen, 1999). En présence de chlorure, les ions Hg (II) sont présents en tant qu'un mix des espèces HgCl_2 , HgCl_3^- , HgCl_4^{2-} et CH_3HgCl (Roundhill, 2001). L'hydrolyse du Hg(II) s'effectue à partir de $\text{pH}=2$, le HgOH^+ prédomine entre $\text{pH}=2,2$ et $\text{pH}=3,8$ et l'espèce finale principale à $\text{pH}=6$ est $\text{Hg}(\text{OH})_2$. A $\text{pH} 6-7$, c'est la solubilité de $\text{Hg}(\text{OH})_2$ qui détermine la distribution du Hg (Roundhill, 2001).

Le Hg (II) forme certains complexes bicoordinés linéaires comme $\text{Hg}(\text{CN})_2$, $\text{Hg}(\text{CH}_3)_2$ (qui se forme dans la nature par l'action de bactéries sur $\text{Hg}_2^{2+}(\text{aq})$, et O-Hg-O dans l'oxyde de Hg solide HgO). Le Hg est beaucoup moins électropositif que le Zn et le Cd et est le seul dont le degré d'oxydation +1 (l'ion Hg_2^{2+}) persiste en solution aqueuse.

Les analyses spectroscopiques RMN multinoyaux et diffractomètre automatique de rayons X démontre que Hg(I) se présente sous la forme du cation dinucléaire (Hg_2^{2+}) et ont constitué le premier exemple d'une liaison métal-métal. Le Cd_2^{2+} et le Zn_2^{2+} ont été découverts plus tard mais sont moins stables que (Hg_2^{2+}). Par exemple le Cd_2^{2+} se dismute rapidement en présence d'eau (Shriver and Atkins, 2001) :



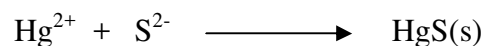
La situation n'est pas très différente pour les ions de Hg(I), parce que leur dismutation a une constante d'équilibre mesurable :



Les composés avec des groupes soufrés sont fréquemment utilisés comme agents d'extraction pour le Hg (II) à partir de solutions aqueuses. Dans de nombreux cas, ces composés ont des groupes fonctionnels donneurs de soufre qui sont incorporés dans une résine afin que le matériau résultant puisse être utilisé comme un agent d'extraction en phase solide pour le Hg (Roundhill, 2001).

2.1.3.2.1 Précipitation des ions Hg^{2+} sous forme de sulfure

Comme Zn et Cd dans le même sous-groupe de la table périodique des éléments, l'atome libre de l'élément Hg présente une configuration électronique de s^2p^0 , et par conséquent l'ion commun du Hg est le, Hg^{2+} , l'ion mercurique ou l'ion de Hg (II). Un exemple d'un composé contenant l'ion mercurique est le minerai de cinabre rouge, HgS , i.e $\text{Hg}^{2+}\text{S}^{2-}$. Comme la plupart des sulfures, ce sel est très insoluble dans l'eau; en effet, les eaux usées dans les usines chlore-alcali sont parfois traitées par addition d'un sel soluble tel que le Na_2S qui contient l'ion sulfure, étant donné que cette action précipite le Hg ionique en HgS (Baird and Cann, 2012).



2.1.3.2.2 Réduction des ions Hg^{2+} en Hg^0

Réduction par voie abiotique : Hg présent dans les sols et dans les solutions aqueuses peut être réduit sous forme de Hg^0 par photoréduction sous l'action des rayons solaires La photoréduction des ions mercuriques a lieu essentiellement en surface (Lindberg et al., 1998) et est contrôlée par les rayonnements lumineux de longueur d'onde supérieure à 320 nm. La photoréduction des ions mercuriques en Hg^0 est maximale à pH 8. Par contre les réactions sombres sont contrôlées essentiellement par des radicaux libres organiques et inorganiques (Barkay et al., 2003).

Réduction par voie biotique : une partie du Hg présent dans les sols et les sédiments est éliminée par volatilisation notamment après réduction microbienne de Hg^{2+} au Hg^0 et ensuite accumulée par les plantes (Patra and Sharma, 2000).

Tableau 3: Les différentes formes de Hg dans l'air, et leur durée de vie dans l'atmosphère d'après Baird et Cann (2012).

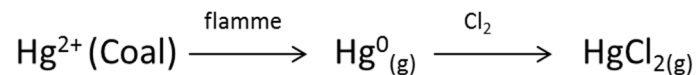
Forme de mercure	Formule chimique	Durée de vie estimée dans l'atmosphère
Mercure élémentaire gazeux	$\text{Hg}^0_{(g)}$	mois-an
Mercure particulaire	Hg^{2+} (adsorbé, comme HgO sur des solides); certains adsorbé sur Hg^0	quelques semaines
Mercure gazeux réactif	$\text{HgCl}_{2(g)}$	jours-semaine

Cette volatilisation serait le processus biologique dominant de la chimie du Hg dans les sols (ATSDR, 1999) et est essentiellement contrôlée par les bactéries aérobies. Ces dernières sont pour une majeure partie du genre *Pseudomonas* (Giovannella et al., 2016).

2.1.3.2.3 Oxydation du Hg⁰ en Hg²⁺

Oxydation par voie abiotique : le Hg émis par les centrales électriques et les incinérateurs est sous forme neutre, libre et gazeuse Hg⁰. L'élément est émis principalement comme un gaz monoatomique qui n'est pas soluble dans l'eau. Au contraire, il continue à circuler dans l'air sous forme Hg⁰ jusqu'à ce qu'il soit finalement ré-oxydé par le radical d'hydroxyle (OH[·]) ou l'ozone (O₃) en Hg²⁺ en produisant deux formes de mercure : 1) le Hg gazeux réactif et 2) le Hg particulaire.

La forme de Hg gazeux réactif est probablement le chlorure mercurique gazeux, HgCl_{2(g)}, le composé moléculaire du Hg oxydé qui est formé lorsque le Hg⁰ réagit avec les diverses formes de gaz contenant du chlore (Cl, Cl₂, HCl), libérées lors de la combustion du charbon:



La fraction de Hg oxydé en Hg²⁺ dépend fortement de la teneur du charbon en chlore en cours de la combustion. Par contre, le Hg particulaire se compose de Hg oxydé lié à des particules de l'émission. Le composé réel pourrait être le HgO. La durée de vie du Hg gazeux réactif dans l'air est relativement courte (environ 1 à 10 jours) depuis le chlorure de mercure est très soluble dans l'eau et est donc facilement déposé par précipitation humide. Puisque les particules en suspension ont tendance à se déposer en quelques semaines, la plupart du Hg particulaire est déposée au niveau régional autour de sa source. En revanche, la durée de vie moyenne du Hg élémentaire gazeux dans l'air est d'environ un an, permettant sa circulation autour du globe. Le **Tableau 3** montre les différentes espèces du Hg existantes dans l'atmosphère et leur durée de vie (Baird and Camm, 2012).

Oxydation par voie biotique : le Hg⁰ est peu réactif, cependant sa forme oxydée Hg (II) est réactive. Des études ont rapporté que l'oxydation de Hg⁰ en Hg (II) pourrait se produire grâce à des bactéries anaérobies (*Geothrix fermentans* H5 ; *Shewanella oneidensis* MR-1 ; et *Cupriavidus metallidurans*) (Colombo et al., 2014). Cette étude souligne l'association covalente de Hg (II) à des groupes fonctionnels ressemble étroitement aux complexes Hg (II) –cystéine₂, ce qui suggère que le Hg oxydé est lié à des thiols cellulaires. Il a été suggéré que la sorption physico-chimique du Hg⁰ aux sites réactifs (fonction thiol –SH) est la première étape de l'oxydation de Hg⁰ par la matière organique dissoute. Une étude plus poussée a révélé que des composés organiques contenant des groupes fonctionnels thiol réduits, comme le glutathion et l'acide mercaptoacétique, oxydent le Hg⁰ dans des conditions anoxiques (Zheng et al., 2012).

D'autres protéines sont potentiellement impliquées dans l'oxydation du Hg par voie biotique, et notamment les catalases. Les catalases sont des protéines possédant un hème de fer (III) qui ont pour fonction de transformer H_2O_2 en entités moins nocives pour la cellule (Barkay et al., 2003).

2.1.3.2.4 Méthylation des ions Hg^{2+}

La méthylation abiotique du Hg inorganique existe et est associée à des substances humiques (Weber, 1993; Siciliano et al., 2005). Il est cependant admis que la méthylation du Hg est un processus principalement d'origine biotique qui se produit par voie intracellulaire chez les bactéries (Benoit et al., 2002). Cela implique que le passage du Hg inorganique au travers la paroi cellulaire bactérienne avant la méthylation est une étape cruciale dans ce processus.

Des études récentes ont rapporté que l'ion Hg^{2+} est le substrat essentiel pour les communautés microbiennes responsable de la méthylation du Hg. Ce processus se fait donc en deux étapes clés: **i)** l'oxydation du Hg^0 en Hg^{2+} qui est une étape cruciale pour fournir le Hg disponible pour la méthylation et **ii)** le transport de cet ion à travers la membrane cellulaire des bactéries. La diffusion passive du Hg inorganique à travers les membranes cellulaires a été proposée (Benoit et al., 1999a,b, 2001a,b), et implique que la spéciation chimique extracellulaire de Hg est un déterminant majeur de la biodisponibilité du Hg pour la méthylation. De plus, la diffusion passive a été montrée comme régissant le transport des espèces de Hg inorganique dans les cellules de phytoplancton en conditions aérobies (Gutknecht, 1981; Mason et al., 1995b, 1996; Barkay et al., 1997).

Comme le Hg est un élément chalcophile classique, son cycle géochimique est intimement lié au cycle du soufre (Morel and Hering, 1993; Stumm and Morgan, 1996). En milieu anoxique, une variété de complexes de sulfure de Hg dissous existent dans les eaux interstitielles, y compris les espèces neutres, $\text{HgS}^0_{(\text{aq})}$ et $\text{Hg}(\text{SH})_2$, et des espèces chargées, à savoir $\text{Hg}(\text{SH})^+$, HgS_2^{2-} et HgHS^{2-} (Dyrssen and Wedborg, 1991; Benoit et al., 1999b; Jay et al., 2000). Il est possible que les complexes solubles de Hg non chargés tels que $\text{HgS}^0_{(\text{aq})}$ et $\text{Hg}(\text{SH})_2$, diffusent passivement à travers les membranes des bactéries méthylatrices, tandis que la charge peut modifier la répartition dans (et par conséquent la diffusion à travers) la bicouche lipidique de la membrane cellulaire (Madigan et al., 2003). Selon les modèles de spéciation chimique, lorsqu'une matrice est faiblement chargée en Hg total et le niveau de sulfure relativement faible, des espèces non chargées, comme le $\text{HgS}^0_{(\text{aq})}$ constituent la forme chimique dominante. La spéciation du Hg tend à se déplacer vers des complexes chargés, tels que HgHS^{2-} , lorsque les niveaux de sulfure augmentent (Morel et al., 1998; Benoit et al., 1999b; Jay et al., 2000).

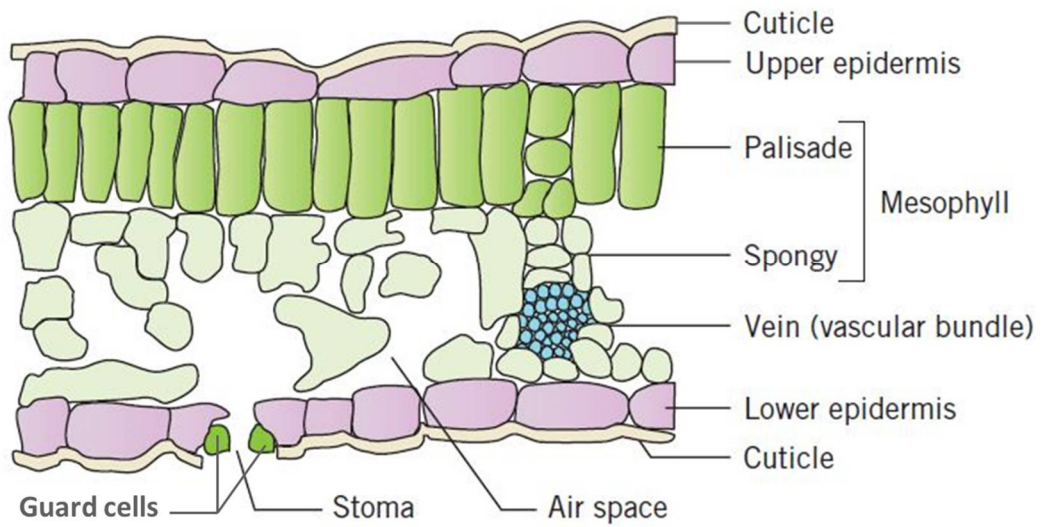


Figure 10: Représentation schématique d'une feuille mésomorphe typique (*Acer sp.*) en coupe transversale d'après [Hopkins et Huner \(2008\)](#) . Noter en particulier la présence d'une cuticule recouvrant les deux surfaces extérieures pour les deux épidermes supérieur et inférieur. Noter également les vastes espaces intercellulaires avec accès à l'air ambiant à travers les stomates ouverts.

Bien que des niveaux plus élevés de sulfate peuvent améliorer la méthylation du Hg par les bactéries sulfato-réductrices (SRB) dans les sédiments, l'excès de sulfure libéré pendant la respiration du sulfate inorganique peut limiter la disponibilité de Hg, en augmentant la fraction extracellulaire des complexes sulfurés chargés. Actuellement, il est connu qu'au cours du processus de méthylation, le Hg inorganique (II) est transformé en méthylmercure par principalement l'action de fer (III) dans les bactéries réductrices (FeRB) et les bactéries sulfato-réductrices (SRB) (Fleming et al., 2006; Kerin et al., 2006; Hines et al., 2012).

2.2 Transfert de métaux chez les végétaux

Avant d'aborder les mécanismes de transfert d'ETMs proprement dits, il m'a semblé important de rappeler dans la première sous-section des notions élémentaires d'anatomie végétale, et notamment au niveau des feuilles puisque le Hg, principal élément étudié dans ce travail de thèse, présente la particularité de pouvoir diffuser au travers les stomates.

2.2.1 Anatomie et fonctionnement foliaire

2.2.1.1 Caractéristiques anatomiques

Une section transversale d'une feuille d'angiospermes typique possède divers types de cellules dont les caractéristiques anatomiques sont importantes pour la photosynthèse et la transpiration. Les feuilles sont généralement de 4 à 10 cellules d'épaisseur, ce qui correspond à quelques centaines de micromètres (**Figure 10**). Un épiderme est présent à la fois sur la face supérieure et sur la face inférieure des feuilles et est constitué d'une seule couche de cellules. À l'exception des cellules de garde, le cytoplasme des cellules de l'épiderme est habituellement incolore, car très peu, voire aucun chloroplaste n'y est présent (en fonction de l'espèce végétale).

Entre les deux couches d'épiderme se trouve le mésophylle généralement différencié en parenchyme palissadique et parenchyme lacuneux dans les écosystèmes tempérés. Les cellules du parenchyme palissadique sont souvent allongées en « palissade » perpendiculairement à l'épiderme supérieur. Les cellules du parenchyme lacuneux, situé entre le parenchyme palissadique et l'épiderme inférieur, sont légèrement arrondies, et espacées par de grandes lacunes. Cette structure permet une circulation de l'air à l'intérieur de la feuille, depuis les stomates situés dans l'épiderme inférieur (Hopkins and Huner, 2008; Nobel, 2005)

2.2.1.2 Epiderme

L'épiderme est la couche de cellules externes des feuilles. Cette couche est généralement transparente (ces cellules n'ont pas de chloroplastes) et couverte par une cuticule d'aspect cireux permettant de limiter les pertes en eau lors de trop fortes chaleurs.

Cette cuticule imperméable à l'eau relativement épaisse sur la face supérieure. La cuticule contient de la cutine, un groupe hétérogène de polymères complexes composés principalement d'esters d'acides monocarboxyliques 16 et 18 atomes de carbone ayant deux ou trois groupes hydroxyle (estérification se réfère à la réaction chimique d'un acide et d'un alcool avec l'élimination de l'eau). La cutine est relativement inerte et résiste à la dégradation enzymatique par des micro-organismes, de sorte qu'elle est souvent bien conservée dans le matériel fossile car son rôle dans la prévention de la perte d'eau à partir d'une feuille est crucial. Chez les végétaux des climats secs, cette cuticule est plus épaisse. La cuticule est parfois plus fine sur l'épiderme inférieur que sur l'épiderme supérieur (Morot-Gaudry et al., 2012).

2.2.1.3 Structure et fonctionnement des cellules stomatiques

L'épiderme des feuilles contient des stomates qui permettent l'échange de gaz entre les espaces d'air internes et le milieu ambiant. L'ouverture, ou ostiole, est bordée par une paire de cellules spécialisées appelées cellules de garde (**Figure 10**). La caractéristique du complexe stomatique est la paire de cellules de garde qui fonctionne comme une vanne à commande hydraulique. Les cellules de garde absorbent l'eau et gonflent pour ouvrir les pores lorsque le CO₂ est nécessaire pour la photosynthèse, et perdent de l'eau pour fermer l'ostiole lorsque le CO₂ n'est pas nécessaire ou lorsque le risque de déshydratation l'emporte sur les besoins photosynthétiques de la plante. Les stomates régulent des échanges gazeux et donc la photosynthèse, la productivité et le rendement des cultures. Plus de 90 % de la vapeur d'eau et de CO₂ échangés entre une plante et son environnement passent par les stomates. Les stomates sont donc impliqués dans le contrôle de deux processus très importants mais concurrents: l'absorption du CO₂ pour la photosynthèse, et la perte d'eau par transpiration. Plus récemment, un intérêt supplémentaire dans la fonction stomatique a été motivé par la reconnaissance que les polluants atmosphériques tels que l'ozone (O₃), dioxyde de soufre (SO₂) (Hopkins et Huner 2008; Nobel, 2005) et des vapeurs de Hg⁰ (Laacouri et al., 2013; Millhollen et al., 2006a; Millhollen et al., 2006b) entrent aussi principalement dans la feuille par les stomates ouverts

2.2.1.4 Densité des stomates foliaires

Les stomates se trouvent dans les feuilles de la quasi-totalité des plantes supérieures (angiospermes et gymnospermes) et la plupart des plantes inférieures (fougères) à l'exception des plantes aquatiques immergées et des mousses. Ils se trouvent sur la plupart des parties aériennes, y compris les structures non foliaires telles que des parties florales et les tiges, bien qu'ils puissent être non fonctionnel dans certains cas. La fréquence et la distribution des stomates sont très variables et dépendent d'un certain nombre de facteurs, y compris les espèces, la position de la feuille, le niveau de ploïdie (le nombre de jeux de chromosomes), et les conditions de croissance.

La densité est généralement comprise dans l'intervalle de 20-400 stomates mm^{-2} de la surface de feuille, bien que des fréquences de 1000 stomates mm^{-2} ou plus aient été rapportées. Les feuilles de monocotylédones herbacées telles que les graminées contiennent habituellement des stomates à la fois sur les surfaces adaxiale (supérieure) et abaxiale (inférieures) avec des fréquences approximativement égales. Les stomates se situent sur les deux faces supérieure et inférieure des feuilles de dicotylédones herbacées, mais la fréquence est généralement plus faible sur la face supérieure. La plupart des dicotylédones ligneuses et les espèces d'arbres ont des stomates seulement sur la surface inférieure de la feuille tandis que les feuilles flottantes de plantes aquatiques (par exemple, nénuphar) possèdent leur stomates seulement sur la surface supérieure (Hopkins and Huner, 2008). La densité stomatique et la taille des stomates foliaires jouent un rôle primordial dans les échanges gazeux, et en conséquence dans l'accumulation des polluants atmosphérique dans les tissus foliaires.

2.2.1.5 Translocation de photoassimilats, les concepts de source et puits

Bien que l'essentiel de la photosynthèse se produise dans les feuilles, une partie se déroule dans d'autres tissus chlorophylliens, y compris les cotylédons, les bourgeons, les tiges, les racines aériennes, les fleurs et les fruits. Dans la grande majorité, les contributions photosynthétiques des tissus autres que les cotylédons et les feuilles sont relativement peu importantes (Pallardy, 2010).

La sève se déplace des zones d'approvisionnement, appelées sources, à des zones du métabolisme ou de stockage, appelés puits. Les sources comprennent tous les organes exportateurs, généralement les feuilles matures, qui sont capables de produire des photosynthétats à des quantités supérieures à leurs propres besoins. Le terme photosynthétat se réfère aux produits de la photosynthèse. Les puits comprennent tous les organes non photosynthétiques de la plante et des organes qui ne produisent pas assez de produits photosynthétiques pour soutenir leurs propres besoins de croissance ou de stockage. Racines, tubercules, fruits en développement, et les feuilles immatures, qui doivent importer des glucides pour le développement normal, sont tous des exemples de tissus de puits. Tous les étudies soutiennent le modèle de translocation dans le phloème de source vers les puits (LAZAR, 2003; Nobel, 2005; Hopkins and Huner, 2008; Mishra, 2004).

2.2.2 Forme et mobilité des ETMs dans le sol et leur transfert vers les parties aériennes des plantes

2.2.2.1 Considérations générales

La croissance de la population urbaine entraîne un énorme défi pour la sécurité des approvisionnements alimentaires, l'hygiène et la lutte contre la pauvreté. En effet, au fur et à mesure que la population urbaine augmente, les approvisionnements alimentaires par personne diminuent et la proportion des personnes sous-alimentées augmente (Smith, 1999).

Le maraîchage urbain connaît un développement récent et rapide dans le monde entier (Kessler, 2013), sans prendre en compte le fait que des différentes activités industrielles ou leurs décharges de résidus différemment pollués par des ETMs sont à proximité de ces cultures. La nécessité d'une évaluation spécifique de la qualité des sols dans les jardins urbains sur chaque site depuis l'estimation réelle du risque varie considérablement d'entre eux, en fonction de l'histoire des activités industrielles passées sur le site et la vitesse de dépôt des aérosols urbains (Izquierdo et al., 2015). Plusieurs études portant sur la consommation de légumes cultivés sur, ou à proximité, de sites contaminés, rapportent que l'exposition par la consommation de légumes uniquement peut conduire à atteindre les niveaux de seuil toxicologique (Cui et al., 2004; Xu et al., 2013). Les ETMs très étudiés tels que le Cd, ont la capacité d'être transférés à la partie comestible des plantes et à devenir potentiellement toxiques (Jolly et al., 2013).

A l'inverse, des études pour d'autres ETMs indiquent que cette exposition n'aboutit pas un apport supérieur à la limite de sécurité, même dans les zones de pollution importante (Sipter et al., 2008; Pelfrène et al., 2013; Adamo et al., 2014). Cependant, de nombreux auteurs ont conclu que les sols de jardin devraient être analysés pour déterminer leurs teneurs en ETMs avant d'être cultivés pour la production de légumes. Le transfert potentiel du sol vers les parties comestibles des légumes est couramment décrite pour Pb, Cd, Zn et As (Finster et al., 2004; Defoe et al., 2014; Massaquoi et al., 2015; L. Xu et al., 2015). Par contre ce transfert est moins étudié pour Ti et Cr.

Dans les sols, les ETMs peuvent se trouver sous différentes formes : associées à la phase solide ou solubles. Les formes associées à la phase solide (incluses dans les réseaux cristallins des minéraux, adsorbés sur les argiles) sont en quantité majoritaire. Les formes solubles (cations ou anions libres, complexes minéraux neutres) bien que minoritaires revêtent une importance particulière, puisqu'elles sont davantage biodisponibles (Sims et al., 1984).

Les sols ont la propriété de fixer les ETMs, en particulier dans les horizons de surface riches en matière organique. Les principaux facteurs de l'environnement influant sur la mobilité des éléments traces dans les sols sont le pH, le potentiel d'oxydoréduction et la capacité d'échange cationique (CEC). Ce dernier paramètre est lié à la quantité et la qualité de la matière organique ainsi qu'au pourcentage et aux types des minéraux argileux. Par exemple, La teneur en ETMs dans le blé varie en fonction du pH du sol, la teneur en matière organique dans le sol, et la proportion d'argile dans le sol (Tomás et al., 2012). Parmi ces facteurs, le pH du sol est le principal facteur influant sur la croissance et les propriétés de la rhizosphère du blé (Wang et al., 2012) et serait également un bon prédicteur des concentrations en Cd dans le blé et l'orge (Adams et al., 2004). D'autres facteurs, comme le climat ou les interactions entre les différents éléments présents dans les sols, peuvent aussi modifier la mobilité d'un ETMs (Tremel-Schaub and Feix, 2005).

La spéciation des ETMs, qui influe sur leur mobilité et biodisponibilité, dépend de nombreux facteurs (sources de pollution, itinéraires techniques, conditions pédo-climatiques). Le transfert d'éléments chimiques dans la chaîne alimentaire est une partie du cycle naturel. Cependant, l'alimentation naturelle et équilibrée a été modifiée par plusieurs facteurs anthropiques, en particulier des éléments traces ont été transférés vers l'alimentation et le fourrage. Un nombre important de publications révèle l'importance de l'équilibre chimique pour un environnement sûr et pour la santé humaine (Kabata-Pendias, c2011). La contamination des sol agricoles et les cultures (fruits, céréales et légumes) par les ETMs dangereux tels que Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, et Zn est un problème environnemental récurrent en raison de leur nature non-biodégradable et persistante (Radwan and Salama, 2006; Khan et al., 2010; Muhammad et al., 2011). Les voies de transfert peuvent être soit du sol vers la plante à travers les racines soit de l'atmosphère vers la plante à travers les feuilles.

Les plantes peuvent absorber les ETMs de sol par leurs racines, les transporter à travers le xylème et les accumuler dans les différents tissus de tous les organes (racine, tiges, feuilles). Ce transfert peut constituer un risque direct sur la santé humaine à travers les plantes alimentaires ou indirect par l'accumulation dans la chaîne alimentaire à travers le fourrage. Certains éléments sont classés et considérés comme non essentiel pour la vie des végétaux, parmi ces éléments le Cd, Pb, Hg, et Cr. Leur présence dans une telle plante peut provoquer des symptômes de toxicité même lorsqu'elle est exposée à des très faibles concentrations (Nicholson et al., 2003).

En revanche d'autres éléments appelés micronutriments sont indispensables pour les tissus végétaux mais à des concentrations inférieures à 100 mg kg^{-1} de la masse sèche. Parmi ces éléments on trouve Zn, Cu, Ni, Mn, Co, Mo et Si. Le dépassement de ce seuil dans une telle plante peut provoquer des symptômes de toxicité selon l'élément absorbé, sa concentration et l'espèce végétale. Les macronutriments ou éléments majeurs K, P, Mg, Ca, S, Na, et Al sont nécessaires à des concentrations excédant 100 mg kg^{-1} de masse sèche de la plante (Logsdon, 2008).

Il est essentiel de mentionner que certaines espèces végétales tolèrent mieux les éléments non essentiels que d'autres espèces en accumulant des concentrations assez élevées de ces éléments. Les plantes peuvent également absorber les ETMs par leurs feuilles mais uniquement à fortes concentrations atmosphériques (à l'exception de Hg). Les éléments essentiels ou non essentiels sous forme de poussière ou de gaz pénètrent dans les feuilles à travers les stomates sous forme d'ions après passage à travers la cuticule. La cuticule fonctionnerait comme un faible échangeur de cations et sa perméabilité est supérieure pour les cations par rapport aux anions et cette perméabilité est plus importante au niveau des stomates (Tremel-Schaub and Feix, 2005).

Plusieurs paramètres interviendraient dans l'absorption foliaire des ETMs, dont la densité stomatique, l'ETM, l'espèce végétale, et le pourcentage d'humidité du dépôt.

2.2.2.2 Transfert de Cd, Cr, Mn, Pb, Ti, Zn

2.2.2.2.1 Le cadmium

Le Cd est un élément trace toxique (non-essentiel) pour les plantes. Les facteurs du sol qui affectent l'absorption de Cd par les plantes ont été largement étudiés, et ceux tels que le pH, le contenu en carbone organique, la capacité d'échange cationique (CEC), la teneur en argile, et le contenu en oxydes de Fe et Mn, présentent une influence remarquable sur la disponibilité et le transfert de Cd vers les plantes (Ding et al., 2013; Tomás et al., 2012). Par exemple la mobilité du Cd dans les sols dépend fortement du pH, un pH acide favorisant la phytodisponibilité de celui-ci.

2.2.2.2.2 Le chrome

Etant donné que le Cr est un élément non essentiel pour les plantes, elles ne possèdent pas de mécanismes spécifiques pour son absorption. Par conséquent, l'absorption de ce métal se fait via des transporteurs utilisés pour l'absorption des éléments essentiels pour le métabolisme des plantes par les transporteurs de sulfate (Shanker et al., 2005). Le contenu du sol en Fe (II) ou en formes oxydés du Mn, influent fortement sur la disponibilité et le transfert de Cr vers les plantes (Singh et al., 2013).

2.2.2.2.3 Le manganèse

Le Mn est un élément essentiel classé dans les micronutriments, l'état redox du Mn varie entre +2 et +7. Il est absorbé sous la forme réduite Mn^{2+} . Souvent le premier symptôme de carence de Mn est un déficit en Fe, mais l'apparition d'un certain nombre de zones nécrotiques est une caractéristique distincte. La carence en Mn est très répandue dans les sols ayant un niveau élevé de matière organique, en particulier lorsque ceux-ci ont été chaulés. Dans ces conditions, le Mn^{2+} est oxydé par les microorganismes du sol en Mn^{3+} , suivie par dismutation irréversibles en Mn^{2+} et Mn (IV) comme MnO_2 . Le MnO_2 n'est pas disponible dans des conditions alcalines ce qui conduit à la carence en Mn. En outre, l'oxydation de l'As, Cr, V, Se, et Hg par les oxydes de Mn est susceptible de contrôler le comportement d'oxydo-réduction de ces éléments dans les sols. Toutes les formes de Mn sont des constituants très importants du sol, car cet élément est essentiel dans la nutrition des plantes et contrôle le comportement de plusieurs autres micronutriments (Kabata-Pendias, c2011 ; Farago, 1994).

2.2.2.2.4 Le plomb

Le Pb est considéré comme un métal non essentiel aux plantes, et seule une faible proportion de Pb dans le sol est disponible pour les plantes (Alloway, 1995).

Tableau 4: Les interactions antagonistes et synergiques entre les éléments majeurs et les ETMs dans les plantes d'après (Kabata-Pendias, c2011).

Eléments majeurs	Eléments antagonistes	Eléments synergiques
Ca	Al, B, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, F, Fe, Li, Mn, Ni, Pb, Sr et Zn	Cu, Mn et Zn
Mg	Al, Be, Ba, Cr, Mn, F, Zn, Ni, Co, Cu et Fe	Al et Zn
P	Al, As, B, Be, Cd, Cr, Cu, F, Fe, Hg, Mo, Mn, Ni, Pb, Rb, Se, Si, Sr et Zn	Al, B, Cu, F, Fe, Mo, Mn et Zn
K	Al, B, Hg, Cd, Cr, F, Mo, Mn, et Rb	—
S	As, Ba, Fe, Mo, Pb, Se, et Zn	F et Fe
N	B, F, Cu et Mn	B, Cu, Fe et Mo
Cl	Br et I	—
Na	Mn	—
Si	B, Mn	—

Cependant, les racines des plantes sont généralement en mesure d'absorber et d'accumuler de grandes quantités de Pb^{2+} dans les solutions de sol et de la culture, mais la translocation vers les parties aériennes est généralement limitée en raison de son adsorption à la surface des racines et des parois cellulaires (Farago, 1994).

2.2.2.2.5 Le titane

Aucune preuve avérée d'un rôle biochimique de Ti n'a été rapportée, bien qu'il existe quelques suggestions sur un rôle éventuel comme catalyseur dans la fixation de l'azote par des micro-organismes symbiotiques et dans la photo-oxydation des composés N par les plantes supérieures. La phyto-disponibilité de Ti est faible et semblent être fortement contrôlée par les propriétés et l'origine des sols. Les valeurs de facteur de transfert sont calculées pour l'herbe pâturage comme 0,03-0,04. Le Ti varie dans les aliments nutritionnels de 0,13 à 6,7 mg/kg (Kabata-Pendias, c2011).

2.2.2.2.6 Le zinc

Le Zn est un élément essentiel classé dans les micronutriments, il est facilement absorbé sous sa forme hydratée de l'ion Zn^{2+} . Habituellement, la teneur en Zn la plus élevée se trouve chez les jeunes plantes, ces teneurs diminuant au cours du vieillissement en raison de la dilution du Zn dans la biomasse. Ainsi, les minéraux argileux, les oxydes hydratés, et le pH sont susceptibles d'être les facteurs les plus importants pour le contrôle de la solubilité de Zn dans les sols, alors que la complexation organique et la précipitation du Zn sous forme d'hydroxyde, de carbonate, et de composés de sulfure semblent être de beaucoup moindre importance. La plupart des espèces et des génotypes végétaux ont une grande tolérance à des quantités excessives de Zn. La chlorose, principalement dans les nouvelles feuilles, et la croissance déprimée des plantes sont les symptômes les plus courants de toxicité par le Zn.

Cependant, le Zn n'est pas considéré comme hautement cytotoxique. La limite de toxicité pour le Zn dépend des espèces et du génotype, ainsi que du stade de croissance. Les espèces et variétés végétales diffèrent largement dans leur susceptibilité aux carences en Zn. Bien que ces déficiences soient relativement fréquentes, leur diagnostic est assez complexe, et les meilleurs diagnostics sont obtenus lorsqu'ils sont basés sur l'ensemble des symptômes visuels, et l'analyse de la plante et du sol (Kabata-Pendias, c2011).

2.2.2.2.7 Interaction entre les éléments traces et les éléments majeurs

Il existe des relations à la fois synergiques et antagonistes (**Tableau 4**) entre l'absorption ou l'utilisation de différents éléments par les plantes (Fränze, 2009). Les corrélations entre les éléments dans différents sols et/ou espèces végétales ont des caractères multiples.

Tableau 5: Vue d'ensemble des voies d'entrée du Hg dans la biomasse végétale influencées par des espèces végétales. Ce tableau est issu du manuscrit 1 chapitre 1 partie résultats et discussion (§ 5.1.2).

	Experimental conditions	Species	Hg concentrations			Exposure time	Hg origin	Leaf age effect	References
			Soil ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Air (ng m^{-3})	Leaf ($\mu\text{g g}^{-1}$)				
Foliar path	Close system growth chamber	<i>Populus tremuloides</i>	0.03-12.3	2.4-30.4	data not shown	not tested	mine tailings and Hg ⁰ vapor	2 days	Erickson and Gustin 2004
		<i>Juniperus scopulorum</i> , <i>Pinus ponderosa</i> , <i>Robinia pseudoacacia</i>	0.09 and 0.92	5.9 to 30.1	0.13	no effect	HgCl ₂ to natural soil	4 months	Millhollen et al., 2006
		<i>Robinia pseudoacacia</i>			0.25 to 0.4	age effect		4 months	Millhollen et al., 2006
	Open top chamber	<i>Chamaecrista nictitans</i> , <i>Sorghastrum nutans</i> , <i>Andropogon gerardii</i>	0.01 and 0.15	3.7 and 10	maximum of 0.1	not tested	HgCl ₂	29 weeks	Millhollen et al., 2006 (b)
		<i>Populus tremuloides</i>	12.3	10-50	data not shown	not tested	mill tailings	5-6 month	Gustin et al., 2004
	Natural conditions	<i>Pinus resinosa</i> Ait.	0.06 to 0.1	no data	0.028 to 0.017	positive effect		2 months	Fleck et al., 1999
		<i>Picea abies</i>	data not shown (flux measurements)	no data	data not shown	not tested	atmospheric and precipitation inputs	-	Bishop et al., 1998
		<i>Pinus sylvestris</i>							
		<i>Ulmus americana</i> , <i>Acer saccharum</i> , <i>Quercus rubra</i> , <i>Larix laricina</i> , <i>Aesulus hippocastanum</i>	no data	no data	0.003-0.041	positive effects	atmospheric and precipitation inputs	from emerging to senescing	Laacouri et al., 2013
		<i>Populus tremuloides</i>	0.01, 6.2 and 25.6	1.4, 14.9 and 68.5	0.06 to 0.4	positive effects	mill tailings	16 weeks	Frescholtz., 2003
Foliar and xylem path	Close system growth chamber	<i>Brassica rapa</i> P.	0.09 to 39.4	no data	0.17 to 4.0	negative effect	HgCl ₂	53 days	Dunagan et al., 2007
		<i>Brassica rapa</i> P.	120	no data	0.19 to 1.1	negative effect	industrial contamination	53 days	Dunagan et al., 2007
	Hydroponic system	<i>Salix viminalis</i> x <i>schwerinii</i> clone Björn	200 $\mu\text{g L}^{-1}$	1.5	0.7	not tested	HgCl ₂ to nutrient media	4 days	Greger et al., 2005
		<i>Zea mays</i> L.	0.025 to 0.552	2 to 50	0.2 to 0.7	not tested	HgCl ₂	one growing season	Niu et al., 2011
	Open top chambers	<i>Triticum aestivum</i> L.	maximum of 0.21	0.007	from 0.0035 in bud break to 0.04 in litterfall	positive effect	no description	one growing season	Rea et al., 2002
		Northern mixed-hardwood forests	maximum of 100	no data	0 to 6	positive effect	mill tailings	two growing seasons	Higuera et al., 2012, 2015
	Natural conditions	Olive trees	0.008	from 7 to 10	0.008	not tested	city emission		Niu et al., 2011
		<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	0.5 to 10 μM	no data	0-3000	positive effect	HgCl ₂	1-4 weeks	Rea et al., 2002
	Hydroponic system	Natural conditions	<i>Lupinus albus</i>						

Ces relations peuvent être attribuées à la compétition ionique au niveau des sites de sorption des particules du sol et également aux propriétés de la membrane cellulaire de la surface de racine et aux exsudats racinaires. Un équilibre chimique dans les organismes vivants est une condition de base pour leur croissance et développement. Les interactions des éléments chimiques sont également d'une importance similaire à la carence et de toxicité des plantes. Ces interactions entre les éléments chimiques et leurs réactions déséquilibrées peuvent provoquer un véritable stress chimique dans les plantes.

Un antagonisme se produit lorsque l'effet physiologique combiné de deux ou plusieurs éléments est inférieur à la somme de leurs effets individuels, et un synergisme se produit lorsque l'effet physiologique combiné de ces éléments est supérieur à la somme de leurs effets individuels. Ces interactions peuvent aussi se référer à la capacité d'un élément à inhiber ou stimuler l'absorption d'autres éléments dans les plantes. Toutes ces réactions sont très variables et peuvent se produire à l'intérieur des cellules, à la surface de la membrane et également entourant les racines des plantes.

Les effets antagonistes se produisent le plus souvent de deux manières, les macronutriments peuvent inhiber l'absorption d'ETMs, ou au contraire, les ETMs peuvent inhiber l'absorption de macronutriments. Ces réactions ont été observées en particulier pour le phosphate. Les interactions entre les éléments majeurs et traces montrent clairement que Ca, P et Mg sont les principaux éléments antagonistes de plusieurs ETMs pour leur absorption et leur métabolisme. Cependant des effets synergiques, ont également été observés pour des paires antagonistes des éléments, selon la réaction spécifique du génotype de la plante ou l'espèce (**Tableau 4**) (Kabata-Pendias, c2011).

2.2.2.3 Cas particulier du transfert de Hg

Des études réalisées depuis quelques décennies ont rapporté que plusieurs espèces végétales accumulent le Hg dans leurs parties aériennes et/ou racinaires (**Tableau 5**). De ce fait la couverture végétale sur un site contaminé par le Hg pourrait avoir un rôle important dans la capture du Hg contenu dans les différents réservoirs (sols et atmosphère). L'utilisation d'une stratégie de végétalisation assistée serait donc une méthode appropriée pour stabiliser le Hg sur le site et éviter les sorties putatives de Hg vers l'environnement et ainsi diminuer les risques pour les populations locales comme le suggèrent les travaux de Stamenkovic et Gustin (2009). Par ailleurs, Molina et al. (2006) ont émis l'hypothèse que les variations dans la fixation du Hg par une couverture végétale dépendent d'un grand nombre de facteurs, y compris le contenu en Hg dans le sol et l'atmosphère, les espèces végétales considérées, et la saison. Sur la base de ces travaux, nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le couvert végétal apporté par exemple par une plantation de peupliers pourrait intercepter une partie du Hg volatile, ce qui a pu être observé pour d'autres combinaison ETM / arbre (Fantozzi et al., 2013).

Tableau 6: Données bibliographiques concernant les concentrations en Hg mesurées dans les parties comestibles d'espèces végétales (légume-feuilles ou légume-fruits), en fonction de l'environnement local (teneur en Hg dans le sol et l'air), et des conditions expérimentales. Ce tableau est issu du manuscrit 3 chapitre 1 partie résultats et discussion (§ 5.1.4).

Experimental conditions	Species	Hg concentrations			Hg origin	Exposure time	References	
		Soil ($\mu\text{g/g}$)	Air (ng/m^3)	edible part (ng/g)				
Natural conditions	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>acephala</i>			450	atmospheric industrial contamination	56 days	De Temmerman et al. 2009	
	<i>Allium ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i> L.			230		56 days		
	<i>Spinacia oleracea</i> L.	10 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	20	400		14 days		
	<i>Lactuca sativa</i> L.			100		14 days		
	<i>Cichorium endivia</i> L. subsp. <i>endivia</i>			200		28 days		
	<i>(Valerianella locusta (L.) Laterr</i>			280		28 days		
	<i>Cabbage Brassica oleracea</i>			228	smelting activities and Hg ⁰ vapor	two growing seasons	Miklavčič et al. 2013	
	<i>Chicory Cichorium intybus</i>			1,950				
	<i>Parsley Petroselinum crispum</i>	33 to 484	not measured	373				
	<i>Mangold Beta vulgaris</i>			362				
	<i>Lettuce Lactuca sativa</i>			489		one growing season		
	Close system growth chamber	<i>Oryza sativa</i>	2.8	19.6	81	e-waste recycling industry	no data	Tang et al. 2015
		<i>Oryza sativa</i>	1.3	21.1	20			
		<i>Zea mays</i> L.	1.2	15.5	68			
<i>Glycine max</i>		0.8	9.3	43				
<i>Oryza sativa</i>		0.1	7.2	12				
<i>Olea europaea</i> , L. (<i>Olive trees</i>)		6 to 8,889	2 to 6,892	18 to 162	mill tailings			
Open top chambers	<i>Brassica rapa</i> P.	0.09		210 to 430	control soil	53 days	Dunagan et al., 2007	
	<i>Brassica rapa</i> P.	39.4	not measured	170 to 900	HgCl ₂			
	<i>Brassica rapa</i> P.	120		250 to 340	industrial contamination			
	<i>Zea mays</i> L.	0.025 to 0.552	2 to 50	0.6 - 2.7	HgCl ₂	one growing season	Niu et al., 2011	
	<i>Triticum aestivum</i> L.							

Un deuxième aspect concerne le transfert de Hg chez les plantes d'intérêt agro-alimentaire, et en particulier dans les organes comestibles pour des végétaux cultivés à proximité de sources de Hg atmosphérique. Les résultats récents de la littérature sont rassemblés dans le **Tableau 6** et dans la **Figure 11**. Les plus fortes teneurs en Hg dans les parties comestibles sont retrouvées chez les plantes exposées à une source atmosphérique. Les parties comestibles des légumes-feuilles sont généralement plus enrichies en Hg que celles des légumes-fruits.

Le Hg détecté dans les parties aériennes des végétaux pourrait provenir de plusieurs sources, (i) l'absorption de Hg atmosphérique (habituellement sous la forme élémentaire gazeuse, Hg^0) par les stomates, (ii) l'accumulation foliaire de Hg le dépôt sec et humide (Hg particulaire et Hg gazeux réactif) (Hg^0 , diverses espèces de Hg II, ou de l'aérosol lié au Hg) de l'atmosphère, ou (iii) l'absorption du Hg dissous dans l'eau de sol par le biais du flux transpiratoire (Rea et al., 2002). La spéciation du Hg dans le sol contaminé joue un rôle crucial sur sa mobilité/stabilité.

La proportion de Hg biodisponible dépend principalement de la source de pollution, par exemple les sols des zones minières de Hg présentent une faible teneur en Hg biodisponible car la majeure partie du Hg est sous forme de HgS (J. Wang et al., 2011; Kim et al., 2004). Cependant, le sol des zones d'extraction d'or et les usines de l'industrie (i.e. fabrication des thermomètres, les baromètres et l'activité industrielle chlore-alcali) présente une proportion relativement élevée de Hg biodisponible en raison du rejet de Hg dans le sol sous une forme soluble (Boszke et al., 2007; Neculita et al., 2005; Santos-Francés et al., 2011).

Les études récentes qui ont portées sur les voies de transfert du Hg dans la biomasse végétale ne permettent pas de dresser un panorama clair, car les données rapportées dans la littérature ont été obtenues à partir de diverses conditions d'exposition surtout artificielles à l'aide de différentes concentrations et formes de mercure et différentes espèces végétales, comme le montre le **Tableau 5**. Les variations d'absorption de Hg par une couverture végétale dépendent d'un grand nombre de facteurs, y compris la concentration en Hg dans le sol et l'atmosphère, des espèces végétales, les organes, et les saisons (Molina et al., 2006).

L'entrée du Hg dans les plantes par les racines via la voie du xylème rapportée dans la littérature a été la plupart du temps observée via des expériences en systèmes hydroponiques ou d'autres expériences utilisant le HgCl_2 comme source de Hg. Par exemple, les teneurs en Hg foliaire chez le saule sont particulièrement élevées (environ 700 ng/g MS (**Tableau 7**) dans les expériences rapportées par Greger et al. (2005).

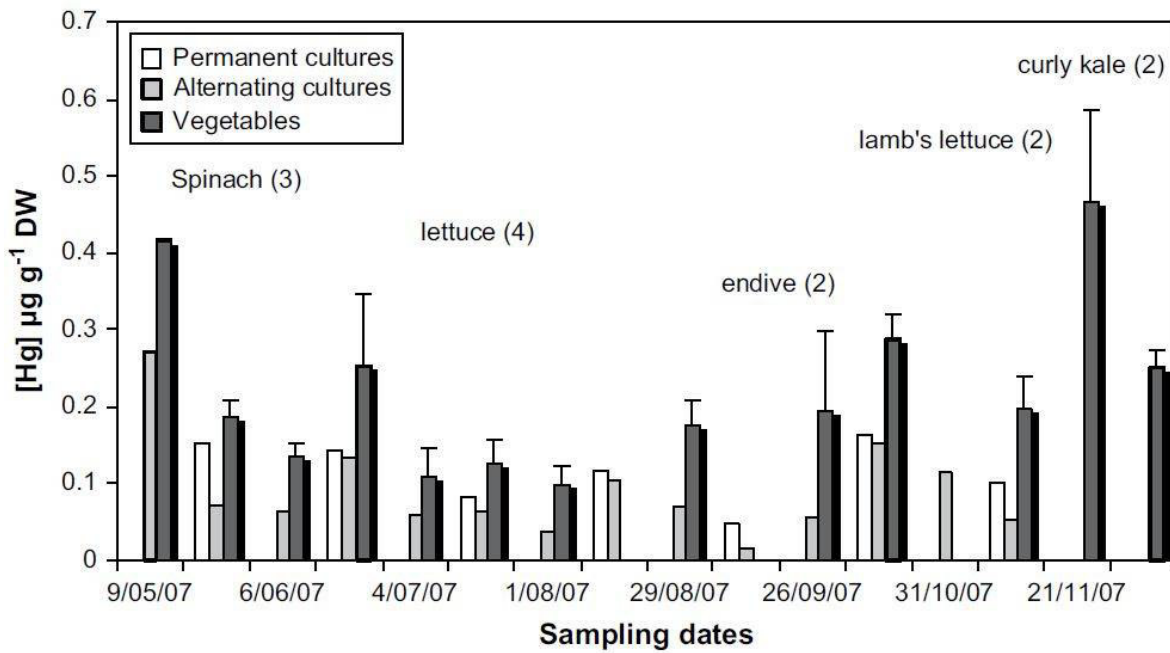


Figure 11: Teneurs en Hg mesurées dans les feuilles de différentes espèces végétales d'intérêt agronomique. Les végétaux ont été exposés à 20 ng/m³ de Hg pendant 24h. D'après [De Temmerman et al., \(2009\)](#).

Tableau 7: La moyenne ± écart type (n = 3-5) de concentrations en Hg (en µg/g MS) dans les feuilles et racines de six espèces végétales. Les saules ont été exposés au Hg pendant 72 h, dans 800 ml d'une solution nutritive à 0 ou 200 µg Hg/L d'après [Greger et al. \(2005\)](#).

Plant species	Hg dans les parties aériennes		Hg dans les parties racinaires	
	0 µg Hg/ L	200 µg Hg/ L	0 µg Hg/ L	200 µg Hg/ L
Clover	0.05 ± 0.01	0.16 ± 0.04	0.36 ± 0.03	390 ± 88
Wheat	0.04 ± 0.01	0.27 ± 0.03	0.54 ± 0.11	208 ± 9
Sugar beet	0.14 ± 0.02	0.31 ± 0.25	0.34 ± 0.13	200 ± 100
Rape	0.11 ± 0.05	0.57 ± 0.20	2.49 ± 1.46	407 ± 77
Willow	0.14 ± 0.06	0.70 ± 0.08	0.67 ± 0.36	373 ± 18
Pea	0.08 ± 0.03	1.40 ± 0.38	2.60 ± 0.91	389 ± 70

Tableau 8: Concentrations de Hg dans l'air en sortie de la chambre de transpiration contenant des plants de saules exposés à 200 µg Hg/L d'après [Greger et al. \(2005\)](#).

Traitements	Concentration en Hg dans l'air sortant	
	Lumière, ng / m ³	Obscurité, ng / m ³
Boutures	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.2
Jeunes plantules sans Hg	1.6 ± 0.4	1.4 ± 0.3
Jeunes plantules avec Hg	1.5 ± 0.3	1.4 ± 0.3

Il faut noter cependant que l'exposition est réalisée uniquement par voie racinaire (**Figure 12**), avec des concentrations en Hg très élevées (200 µg Hg/L de solution), alors que l'atmosphère dans la chambre reste dépourvue de Hg (**Tableau 8**).

En outre, des concentrations élevées en HgCl₂ se sont révélées être cytotoxiques, ce qui peut modifier la perméabilité des membranes (voir [Javot et Maurel, 2002](#) pour une revue). [Carrasco-Gil et al. \(2013\)](#) ont comparé dans leur étude la localisation spatiale du Hg dans les racines et les feuilles de *Marrubium vulgare* et *Medicago sativa* cultivées sur des conditions naturelles ou hydroponiques respectivement.

Il a été montré que dans le système hydroponique, l'absorption par les racines est apparue comme la source majeure de Hg pour les feuilles; cette translocation accrue vers les feuilles dans un tel système pourrait être associée à l'architecture modifiée des racines avec moins de barrières apoplastiques par rapport aux plantes cultivées dans des sols pollués par des barrières apoplastiques améliorées ([Redjala et al., 2011](#)). Ces conditions pourraient faciliter le transfert du Hg radial aux cellules de xylème dans les racines et les feuilles par la sève du xylème. D'un autre côté, d'autres auteurs ont observé que l'absorption de Hg par les parties aériennes d'une végétation se produit par l'absorption de vapeur de Hg élémentaire issu des sols contaminés par les stomates des plantes, ou l'absorption par la cuticule lors du dépôt sec et humide de Hg⁰ sur la surface de la feuille. L'assimilation de Hg à travers les feuilles dépend principalement du degré de contamination de l'air, du dépôt d'aérosol atmosphérique, de la teneur de CO₂ dans l'air et des espèces végétales, et donc de la fermeture des stomates ([Egler et al., 2006](#); [Millhollen et al., 2006b](#)). Des systèmes d'étude complexes ont été utilisés pour mettre en évidence le flux de Hg par voie atmosphérique (**Figure 13**) ([Ericksen et Gustin, 2004](#)). De même, des études ont renforcé l'hypothèse de l'absorption de vapeur de Hg via les stomates à partir de l'atmosphère par l'hypothèse de la couche qui joue probablement un rôle dans la diminution de l'accumulation de Hg ([De Temmerman et al., 2009](#)). Dans des études récentes une comparaison a été faite entre les concentrations de Hg dans les parties comestibles chez différents légumes-fruits et légumes-feuilles exposés à la fois au Hg par voie atmosphérique et par voie racinaire (**Tableau 6**).

2.3 Effets toxiques des ETM s et risque sanitaire

2.3.1 Effets toxiques des ETM s chez les végétaux

La toxicité des ETMs dans les plantes peut comprendre plusieurs effets comme l'inhibition de la photosynthèse, la chlorose (inhibition de la synthèse de chlorophylle), la faible croissance des plantes et une diminution du rendement des cultures qui peuvent être accompagnés d'une réduction de l'absorption d'eau et des nutriments et des troubles du métabolisme des plantes ([Dan et al., 2008](#); [Clemens et al., 2002](#); [Clijsters and Assche, 1985](#))

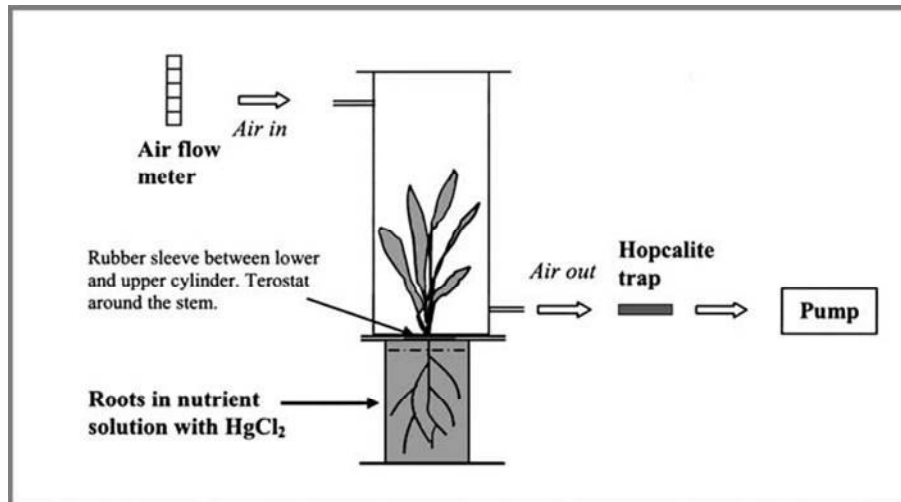


Figure 12: Système d'étude du transfert de Hg par voie racinaire. Une chambre de transpiration est composée de deux cylindres séparés en PVC pour éviter que l'air de la solution pénètre dans le cylindre supérieur. La partie aérienne des plantes est donc uniquement exposée à l'air ambiant d'après Greger et al. (2005).

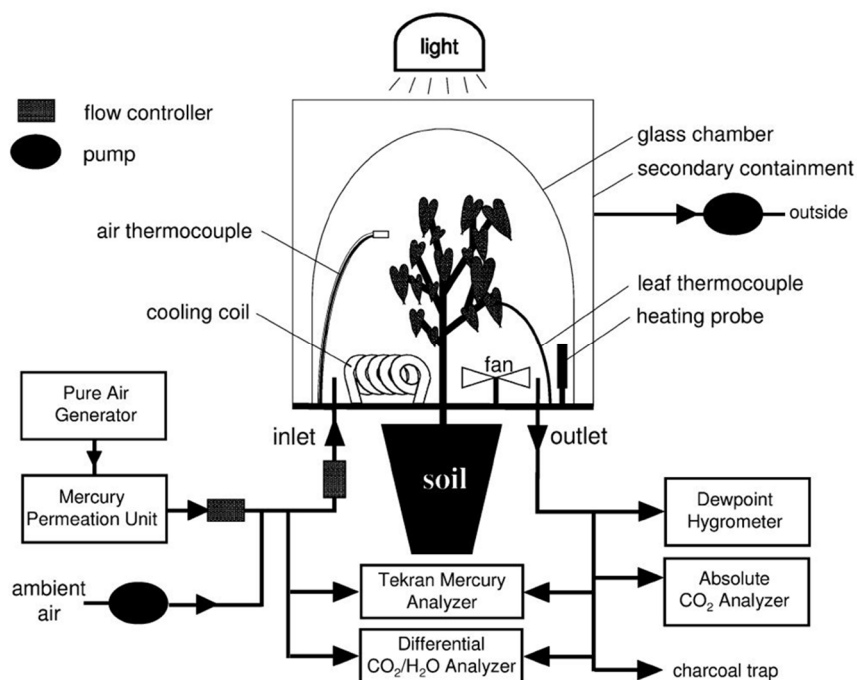


Figure 13: Système d'étude de transfert du Hg par voie atmosphérique d'après Ericksen et Gustin (2004).

La phytotoxicité de certains métaux est établie depuis longtemps (Foy et al., 1978). La toxicité des métaux est attribuée à trois raisons principales. (i) l'interaction directe avec des protéines en raison de leurs affinités pour les groupes thioyl-, histidyl- et carboxyle, entraînant les métaux aux sites cibles de structure, catalytiques et de transport de la cellule; (ii) la stimulation de la production d'espèces oxygénées réactives (ROS) qui modifient les défenses antioxydantes et génère un stress oxydatif; et (iii) le déplacement des cations essentiels à partir des sites de liaison spécifiques, ce qui provoque l'effondrement de fonctions cellulaires. Les effets les plus néfastes des ETMs pour la cellule sont indirects et liés à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), à l'origine d'un stress oxydatif pour la cellule (**Figure 14**).

En effet, certains ETMs peuvent induire la formation de ROS dans les cellules. Les métaux de transition (Fe, Cu, Mn...) sont capables de transférer un de leurs deux électrons sur une molécule d'oxygène et de générer ainsi des ions superoxydes (Bhaduri & Fulekar, 2012). Certains ETMs comme le Cd, le Fe, le Cu, le Zn, le Cr, le Co ou le V vont pouvoir générer, via des réactions de types Fenton ou Haber-Weiss, la formation de ROS tels que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), les ions superoxydes (O₂^{•-}) et les radicaux hydroxyles (•OH) (Gadd, 1993; Galanis et al., 2009).

Les ETMs peuvent avoir un effet direct sur les membranes cellulaires en modifiant leur perméabilité et en entraînant souvent ainsi un efflux d'ions et une dépolarisation de la membrane plasmique (Rodríguez-Serrano et al., 2009). Un deuxième effet des ETMs sur les membranes cellulaires est un phénomène indirect lié à la production de radicaux libres qui entraînent une peroxydation des lipides constituant la membrane (Chaffai et al., 2007). Le radical hydroxyle initie le processus de peroxydation des acides gras membranaires.

Lors de la phase d'initiation, un acide gras insaturé est attaqué par un radical libre. Il en résulte un radical lipidique qui réagit avec l'oxygène moléculaire pour former un radical peroxyde. Ce dernier réagit avec un acide gras adjacent, lors de la phase de propagation, pour former un hydroperoxyde et un nouveau radical peroxyde (Jomova et al., 2012) (**Figure 14**). La peroxydation des lipides membranaires est une réaction très destructrice car elle provoque des brèches dans la phase lipidique et augmente ainsi la perméabilité membranaire, ceci résultant en une désorganisation cellulaire.

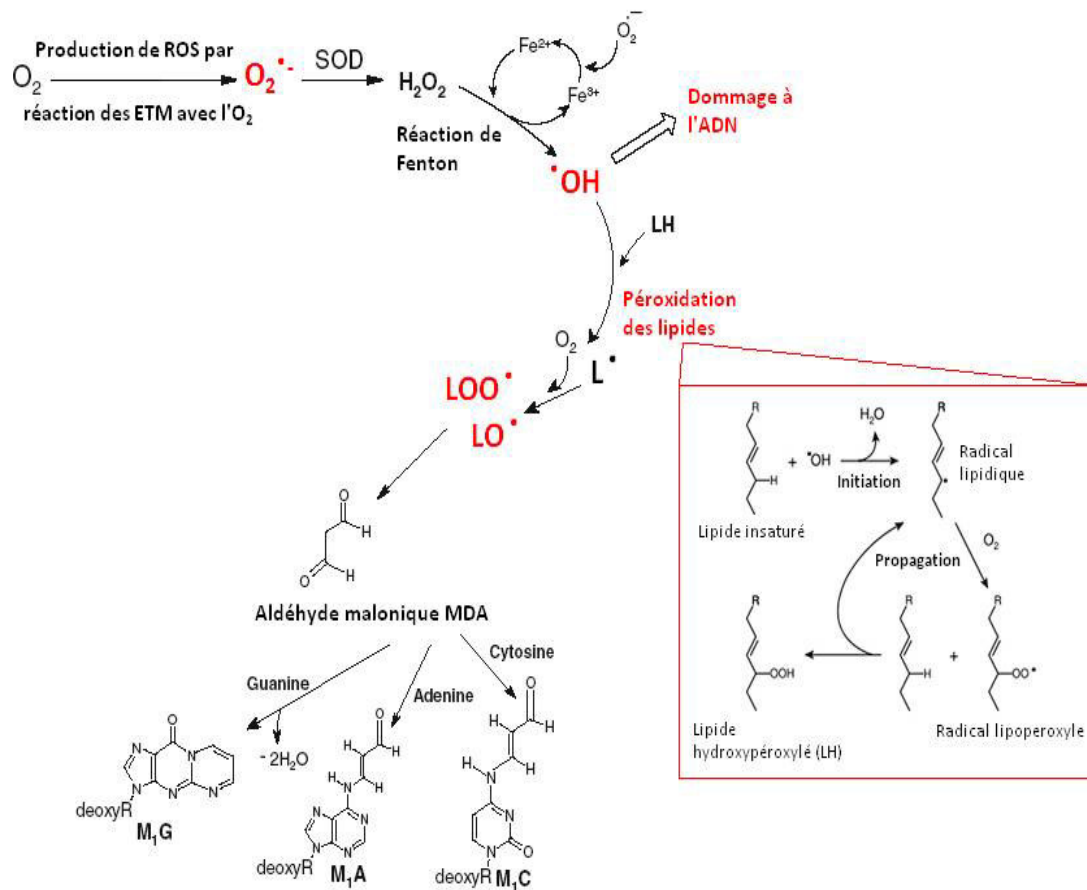


Figure 14: Origine des différents radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées par les ETMs et leurs actions sur les biomolécules (d'après [Jmova et al., 2012](#)). SOD : SuperOxide Dismutase ; LH : Lipide Hydroxyperoxylé ; L : Lipide ; L• : radical lipidique ; LOO• : radical lipoperoxyde ; MDA : aldéhyde malonique ; M₁G : pyrimido[1,2-a]purin-10(3H)-one ; M₁A : N6-(3-oxo-propenyl) deoxyadénosine ; M₁C : N4-(3-1oxopropenyl) deoxycytidine.

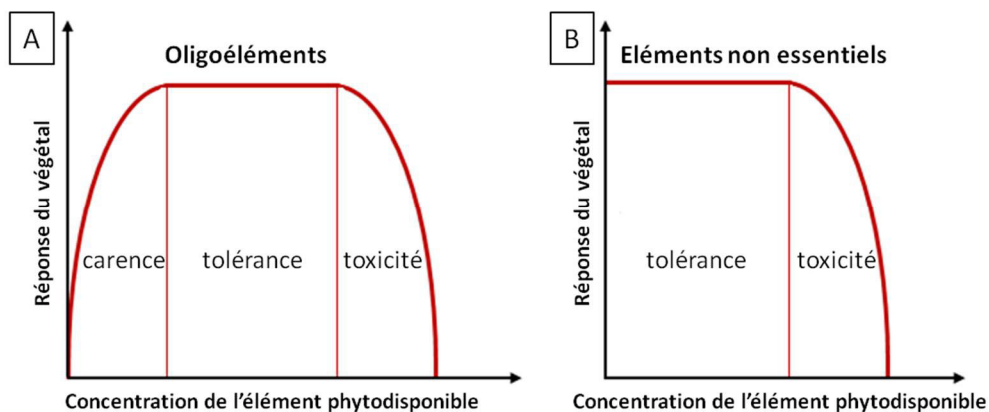


Figure 15: Courbes de réponses « dose-effet biologique » illustrant les effets des changements de concentrations phytodisponibles en oligoéléments (A) ou en éléments non essentiels (B) sur la vitalité de la plante (d'après [Deneux-Mustin et al., 2003](#)).

2.3.1.1 Réponses doses-effets et stratégies d'adaptation

La réponse des plantes à la toxicité des ETMs peut être représentée par des courbes de réponse « dose/effet biologique » de deux types (Deneux-Mustin et al., 2003) (**Figure 15**). Si l'élément est essentiel, la réponse de la plante suivra une courbe « en cloche » dont les trois phases observées seront la carence, la tolérance puis la toxicité (**Figure 15A**). Et si l'élément n'a pas de fonction physiologique établie, seules les deux dernières phases de la courbe (tolérance et toxicité) sont observées (**Figure 15B**). Lorsque la concentration phytodisponible d'un élément atteint le seuil de toxicité de la plante, les symptômes les plus souvent observés sont un ralentissement de la croissance racinaire et/ou aérienne, une perturbation des fonctions physiologiques, une nécrose ou une chlorose des feuilles.

Les symptômes sont liés à la nature de l'élément en cause et à sa spéciation (Nagajyoti et al., 2010). En général, la phytotoxicité des ETMs est soit liée à une carence en fer causée par l'excès d'un autre élément, soit liée à la génération de ROS dans la cellule végétale (Nagajyoti et al., 2010).

Les végétaux ont développé des stratégies d'adaptation à la contamination du sol par les ETMs, qui se traduisent par 4 modalités de réponses à l'exposition aux ETMs (**Figure 16**) (Robinson et al., 2009; Sheoran et al., 2011) :

- l'exclusion : la majorité des métallophytes adopte cette stratégie d'exclusion par restriction de la translocation des ETMs dans leurs parties aériennes, la concentration en ETM dans les racines étant importante, c'est le cas par exemple chez *Festuca rubra* ;
- l'indication : ces plantes accumulent les ETMs dans leurs parties aériennes à des concentrations reflétant le niveau de contamination du sol comme par exemple *Rumex acetosa* ;
- l'accumulation : certaines plantes ont la capacité d'accumuler les ETMs même non essentiels dans leurs parties aériennes, les plantes de la famille des Salicacées (peupliers, saules...) ont notamment cette particularité ;
- l'hyperaccumulation : dans certains cas, les plantes sont capables d'accumuler les ETMs dans leurs parties aériennes dans des quantités jusqu'à cent fois supérieures par rapport à des plantes non accumulatrices poussant dans les mêmes conditions. En général, une plante est considérée comme hyperaccumulatrice lorsque la concentration en un élément donné dans les parties aériennes dépasse 0,1 % de la masse sèche. Les genres de plantes hyperaccumulatrices les plus connus sont *Alyssum* et *Thlaspi* respectivement pour le nickel et le zinc.

2.3.1.2 Réponses cellulaires aux ETMs chez les végétaux

Les principales étapes de l'entrée des ETMs dans les cellules sont :

- l'absorption au niveau de la membrane plasmique
- l'association aux ligands pour transport entre tissus et stockage

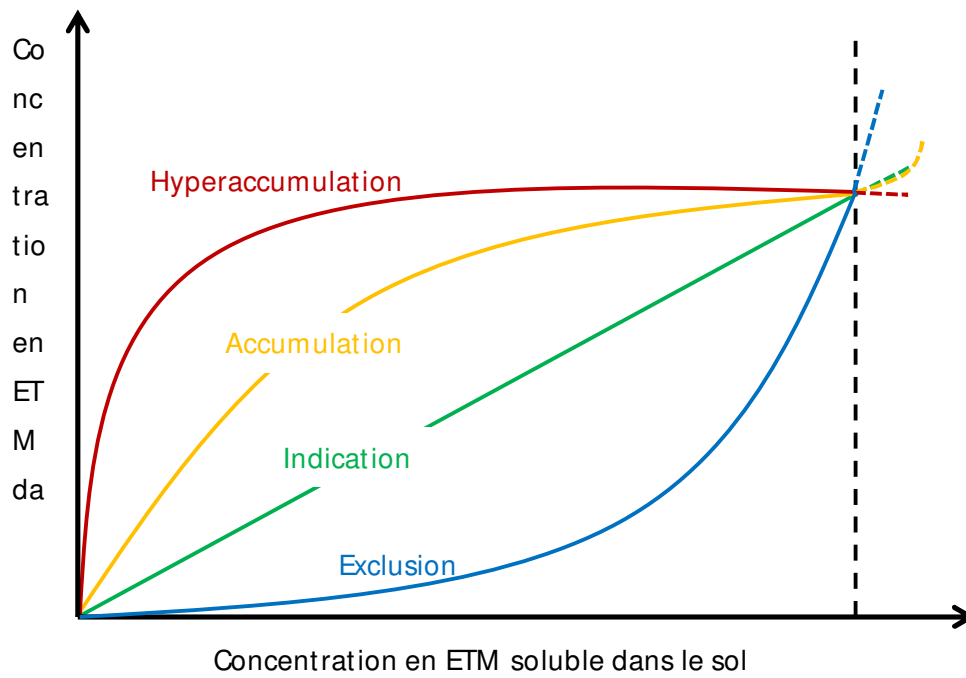


Figure 16: Différentes réponses des plantes à l'accroissement de la quantité des ETMs dans le sol (d'après Robinson et al., 2009). Les concentrations en ETM supérieures au point A correspondent aux concentrations phytotoxiques.

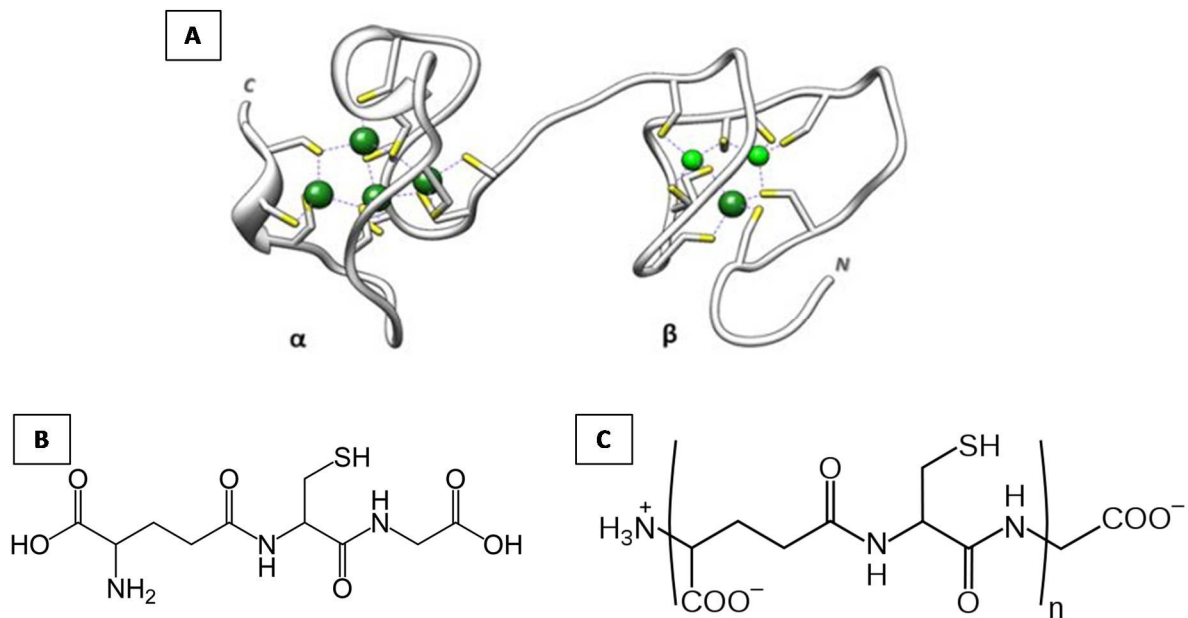


Figure 17: Principales molécules impliquées dans la complexation intracellulaire des ETMs. A : exemple de métallothionéine, les cystéines apparaissent en jaune et les ETMs complexés en vert (http://www.protein.pl/?name=molecular_mechanisms_of_zinc_homeostasis) ; B : molécule de glutathion ; C : structure d'une phytochélatine, $n = 2$ à 11.

2.3.1.2.1 Absorption au niveau de la membrane plasmique

La plupart des ETMs pénètre dans les cellules grâce à des transporteurs situés au niveau de la membrane plasmique. Certains cations métalliques n'étant pas indispensables pour les végétaux, ils entrent en compétition avec des éléments essentiels (métalliques ou non) de structure et/ou de charge proche(s) afin d'être pris en charge par des transporteurs qui ne leur sont pas spécifiques. Les transporteurs d'ETM chez le peuplier ont fait l'objet d'un certain nombre de travaux impliquant l'équipe (Migeon et al., 2010; Montanini et al., 2007; Peiter et al., 2007; Pottier et al., 2015). A ce jour aucune protéine de transport n'a pu être mise en évidence pour le Hg chez les végétaux supérieurs.

2.3.1.2.2 Association aux ligands pour stockage et transport entre tissus

Une fois absorbés, les ETMs ne sont pas toujours transportés sous forme libre. Ils peuvent être rapidement complexés dans le cytoplasme à différentes molécules en fonction du composé métallique. Le transport peut se faire sur une courte distance à l'intérieur de la cellule et sur une distance plus longue vers d'autres cellules et tissus de l'organe d'absorption ou vers d'autres organes de la plante.

2.3.1.2.2.1 Acides organiques

Ces molécules ont été présentées précédemment comme des composés sécrétés par voie racinaire dans le milieu afin de solubiliser les ETMs. Ces mêmes acides, majoritairement du citrate, du malate et de l'oxalate, peuvent également s'accumuler dans les cellules et former des complexes avec certains métaux absorbés pour faciliter leur transport dans la plante.

2.3.1.2.2.2 Acides aminés libres et oligopeptides

Plusieurs études ont montré que des espèces hyperaccumulatrices de Ni transportaient ce métal sous forme complexée à de l'histidine. Chez *Alyssum lesbiacum* et *Thlaspi caerulescens* (Brassicacées), la forte production d'histidine au niveau racinaire permet de former rapidement des complexes avec le Ni absorbé et ainsi d'acheminer le métal vers les parties aériennes (Richau et al., 2009).

2.3.1.2.2.3 Nicotianamine

La nicotianamine est composée de trois molécules de S-adénosylméthionine dont l'assemblage est catalysé par la nicotianamine synthase. Plusieurs travaux reportés dans la revue de Verbruggen et al. (2009) ont montré la formation de complexes entre la nicotianamine et plusieurs ETMs tels que Fe, Ni et Zn avec toutefois une affinité plus forte pour le Ni. Ces travaux suggèrent que la nicotianamine joue un rôle dans le transport des métaux vers les parties aériennes.

2.3.1.2.2.4 Oligopeptides riches en cystéine

La cystéine est un acide aminé clé dans la fixation d'ETM. Cet acide aminé sert de précurseur pour la synthèse de glutathion (GSH), de cofacteurs, de vitamines (biotine, thiamine), d'esters de soufre (coenzyme A) et de dérivés soufrés (Verbruggen et al., 2009). La cystéine possède un groupement sulfhydryle (ou thiol) permettant non seulement de former des ponts disulfures avec d'autres molécules mais aussi de lier des ETMs. Chez les plantes, **les métallothionéines, le glutathion et les phytochélatines (Figure 17)** sont également largement impliquées dans la tolérance aux ETMs (Yadav, 2010).

- **Le glutathion (GSH)** est un tri-peptide contenant une cystéine, responsable de son activité biologique et est synthétisé par voie enzymatique
- **Les métallothionéines** sont de petites protéines riches en cystéine et présentes chez la majorité des eucaryotes et chez plusieurs procaryotes. Elles sont constituées de 45 à 80 acides aminés et sont divisées en 4 classes en fonction de la distribution des cystéines
- **Les phytochélatines (PC)** constituent une famille de petits peptides riches en cystéines capables de fixer les ions métalliques via leurs groupes SH. Les phytochélatines sont constituées de plusieurs dipeptides de glutamate et cystéine répétés n fois (généralement $n = 2$ à 5 mais pouvant aller jusqu'à 11) et suivis d'un résidu glycine terminal (**Figure 17**). Les phytochélatines sont synthétisées de façon enzymatique, par la phytochélatine synthase, à partir de γ -glutamylcystéine qui est un composé intermédiaire de la voie de biosynthèse du glutathion. Les phytochélatines se retrouvent principalement chez les plantes et les algues

Concernant le Hg, aucun des mécanismes de chélation décrit ci-dessus n'a pu être mis en évidence à ce jour chez les végétaux supérieurs. Seule une liaison putative avec des protéines a pu être mise en évidence, sans que la nature réelle de ces protéines n'ait pu être prouvée (Válega et al., 2009).

2.3.1.3 Symptômes de toxicité du Cd, Cr, Hg, Mn, Pb, Ti et Zn

Les symptômes de toxicité varient selon l'élément trace absorbé, le degré de contamination, et l'espèce végétale considérée.

2.3.1.3.1 Symptômes liés au Cd

Le Cd est classé comme un élément non essentiel pour les plantes. Il est bien documenté que le Cd peut être facilement transféré vers les parties aériennes des plantes. Lorsque le Cd exogène est présent en quantités excessives dans le sol, le rendement des cultures et la qualité de la plante sont réduites (Bose and Bhattacharyya, 2008). Par exemple, la concentration en Cd dans les différents composants de la plante (chez le mil, l'avoine, et l'amarante), y compris les graines et la biomasse, a été augmentée fortement avec l'augmentation de la concentration en Cd du sol (Harangozo et al., 2013). Il est bien connu que la consommation humaine par l'ingestion des plantes cultivées sur des sols contaminés est l'une des voies d'exposition au Cd les plus importantes. Par exemple, les graines de blé peuvent être enrichies par un excès de Cd dans l'environnement (Z.-W. Wang et al., 2011). Faller et al. (2005) ont rapporté que le cation Cd^{2+} remplace le cation Ca^{2+} dans le centre réactionnel du photosystème II, provoquant une inhibition du PSII.

2.3.1.3.2 Symptômes liés au Cr

Cr (III) et Cr (VI) sont les formes les plus stables. Le Cr (VI) est le plus persistant dans le sol et est très toxique pour les êtres vivants. Le Cr est toxique pour la plupart des plantes supérieures à 100 μM . kg^{-1} de poids sec (Davies et al., 2002). Les composés du Cr sont très toxiques pour les plantes et sont nuisibles pour leur croissance et leur développement y compris les céréales, les légumineuses, les légumes, les fourrages et les arbres. Les symptômes de toxicité du Cr (III, VI) comprennent l'inhibition de la germination, de la croissance des racines, du développement et production de biomasse des plantules, de l'induction de la chlorose des feuilles, de la formation de nécroses en plus des altérations physiologiques et biochimiques (Shanker et al., 2005; Singh et al., 2013). Le Cr interfère aussi avec les processus photosynthétiques et respiratoires, et avec les mécanismes d'absorption de l'eau et des minéraux. Diverses activités enzymatiques liées au métabolisme de l'amidon et de l'azote sont ralenties par la toxicité du Cr soit par l'interférence directe avec les enzymes ou par la production d'espèces oxygénées réactives (ROS). Le Cr provoque des dommages oxydatifs par la destruction des lipides des membranes et des lésions de l'ADN. Le Cr peut même causer la mort des espèces végétales. Peu d'espèces végétales sont en mesure d'accumuler des quantités de Cr sans être endommagées (Singh et al., 2013). En général les racines accumulent 100 fois plus de Cr que les parties aériennes (Zayed et al., 1998). Cela est probablement dû à une mauvaise translocation de cet élément en raison de la formation de composés insolubles de Cr.

Le Cr hexavalent (CrO_4^{2-}) est un cancérigène puissant et extrêmement toxique pour les animaux et les humains. Ainsi, le Cr accumulé dans les végétaux comestibles peut représenter des dangers potentiels pour la santé des animaux et des humains si l'élément est accumulé sous la forme hexavalente ou à des concentrations élevées. Par conséquent, les investigations de la forme présente dans les plantes alimentaires sont nécessaires.

2.3.1.3.3 Symptômes liés au Hg

Le Hg est un élément non essentiel pour les êtres vivants, plutôt toxique. Son accumulation, sa phytotoxicité et sa distribution diffèrent selon l'espèce végétale, le tissu végétal et le mode d'exposition (racines/feuilles). Le seuil critique de la phytotoxicité du Hg est faible et varie entre 0,5 et 3 mg.kg^{-1} MS de Hg selon l'espèce (Kabata-Pendias, c2011). Un niveau élevé de Hg^{2+} est fortement phytotoxique pour les cellules végétales et peut induire des lésions visibles et des troubles physiologiques chez les plantes. Par exemple, le Hg^{2+} pourrait se lier aux protéines constituant les canaux hydriques, ce qui provoque la fermeture des stomates foliaires et une obstruction physique du flux d'eau dans les plantes.

Le niveau élevé de Hg^{2+} interfère avec l'activité mitochondriale et induit un stress oxydatif en déclenchant la génération des ROS. Ceci conduit à la perturbation des lipides membranaires et du métabolisme cellulaire chez les plantes (Nagajyoti et al., 2010b).

2.3.1.3.4 Symptômes liés au Mn

L'excès de Mn dans les sols faiblement drainés et acides, est toxique pour la plupart des espèces végétales, induisant des symptômes généraux tels que le retard de croissance, chlorose, feuilles frisées, des lésions nécrotiques brunes, et la mort dans les cas les plus graves. La baisse de l'activité photosynthétique après une exposition à un excès de Mn correspond également à la production de ROS, tels que H_2O_2 et O_2^- qui provoque la peroxydation des lipides dans les membranes des thylakoïdes et endommage les enzymes. L'excès de Mn peut également entraîner des carences pour d'autres nutriments tels que Fe, Mg, Zn et Ca (DalCorso, 2012).

2.3.1.3.5 Symptômes liés au Pb

Le Pb est un élément non essentiel pour les êtres vivants, plutôt toxique. Des effets inhibiteurs de Pb^{2+} sur la croissance et la production de biomasse peuvent dériver des effets sur les processus métaboliques des plantes. La croissance rapide des plantules a également été inhibée par le Pb chez le soja, le riz, le maïs, l'orge et certaines légumineuses. Le Pb a également inhibé l'allongement des racines et des tiges et l'expansion des feuilles chez l'ail, l'orge et le radis noir. De faibles quantités de Pb (0,005 ppm) ont entraîné une réduction significative de la croissance de racines de laitue et de carottes. Le Pb est également connu pour affecter la photosynthèse en inhibant l'activité des enzymes carboxylantes. Un niveau élevé de Pb provoque également une inhibition des activités enzymatiques par une réaction avec les groupes sulfhydryles, un déséquilibre hydrique, des altérations de la perméabilité membranaire et de la nutrition minérale (Nagajyoti et al., 2010).

2.3.1.3.6 Symptômes liés au Zn

Bien que le Zn soit un micronutriment pour les plantes, il devient toxique pour les plantes à des concentrations élevées. Les premiers symptômes de la toxicité du Zn sont la chlorose et le rougissement des feuilles dans les cas graves. Elle est suivie par l'apparition de taches nécrotiques brunes sur les feuilles de certaines espèces, accompagnée d'une croissance retardée et d'un rendement réduit. Ainsi, l'inhibition de la croissance se caractérise par une croissance réduite des racines, l'augmentation de l'épaississement de la racine, et altération de la division/ élongation cellulaire. Le Zn a une similitude chimique à la fois avec le Fe et le Mg et peut se substituer à ces deux ions métalliques dans les sites actifs des enzymes et ainsi interférer avec les fonctions cellulaires (Mustafa and Komatsu, 2016).

Tableau 9: Dose journalière tolérée des éléments en mg pour un adulte de 60 kg.

Élément	Symbole	DJT ($\mu\text{g}\cdot\text{j}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ masse corporelle)	DJT $\text{mg}\cdot\text{j}^{-1}$ pour 60 kg	Référence
Aluminium	Al	1000	60	OMS, 1989
Antimoine	Sb	6	0,36	OMS, 2006
Arsenic	As	2	0,12	EFSA, 2009
Cadmium	Cd	1	0,06	EFSA, 2009
Calcium	Ca	---	2500	EFSA, 2006
Chrome III	Cr III	1500	90	INERIS, 2005
Cobalt	Co	1,4	0,084	Baars et al., 2001
Cuivre	Cu	140	8,4	Baars et al., 2001
Fer	Fe	---	30	EFSA
Magnésium	Mg	---	530	EFSA, 2006
Manganèse	Mn	60	10	SCF 1993
Mercure	Hg	---	0,012	INRA, 2004
Nickel	Ni	12	0,72	OMS, 2006
Phosphore	P	---	3000	EFSA, 2006
Plomb	Pb	3,5	0,21	OMS, JECFA 1993
Potassium	K	---	5000	EFSA, 2006
Silicium	Si	---	84	SC, 2007
Sodium	Na	---	2000	OMS, 2003
Soufre	S	No data	---	---
Strontium	Sr	130	7,8	ATSDR, 2004
Titane	Ti	Pas de recommandation	---	---
Zinc	Zn	---	25	EFSA, 2006
Chrome VI	Cr VI	3	0,21	INERIS, 2005

2.3.2 Exposition humaine et risque sanitaire

2.3.2.1 Aspects réglementaires

Le diagnostic de danger d'un produit végétal récolté se formalise par le rapport : concentration mesurée / concentration maximale réglementaire (CMR) ou concentration mesurée / concentration maximale recommandée (CMREC) (Mench et Baize, 2004). On considère le danger comme avéré si le rapport est supérieur à 1. Compte tenu des effets toxicologiques différenciés des espèces chimiques, ce formalisme peut inclure la spéciation du contaminant (par exemple : arsenic inorganique, méthyl-mercure). On notera donc que nous acceptons de calquer la notion de danger sur les niveaux de teneurs seuils réglementaires et non sur des démonstrations scientifiques. Il peut donc exister des sols contaminés portant des récoltes respectant les CMR et, inversement, des sols peu anthropisés fournissant des produits non conformes. Le règlement CE 466/2001, amendé par le règlement 257/2002, liste les CMR, exprimées en $\mu\text{g/g}$ de matière fraîche (MF), pour Cd, Pb et Hg, dans des denrées destinées à l'homme. Une CMREC est recommandée pour Hg dans les végétaux par le Conseil supérieur d'hygiène publique de France (CSHPF).

2.3.2.2 Evaluation du risque de toxicité des métaux sur l'être humain

Les polluants présents dans le sol peuvent être mobilisés et induire des risques sanitaires ou nuisances pour les usagers, les riverains du site ou pour les ressources naturelles environnementales. On parle d'un risque sanitaire si la chaîne « source- vecteur – cible » peut permettre la propagation et le contact de la cible (l'humain) avec un polluant. En absence d'un de ces éléments il n'y a pas de risque. L'évaluation des risques liés aux ETMs pouvant se trouver dans les aliments, prend en compte les résultats d'études toxicologiques réalisées chez l'animal afin d'établir une dose journalière ou hebdomadaire tolérable pour l'homme. Cette méthodologie d'évaluation fondée sur des données expérimentales s'est avérée efficace pour protéger la santé du consommateur en particulier lorsqu'elle est appliquée aux métaux traces consommés en quantités élevées.

La dose journalière tolérable DJT d'un ETM exprimée en mg par unité de masse corporelle standardisé (par exemple 60 kg) est l'estimation de la dose présente dans les aliments exprimée en fonction de la masse corporelle, qui peut être quotidiennement ingérée pendant toute la vie, sans risque appréciable pour la santé du consommateur, compte tenu de tous les facteurs au moment de l'évaluation (**Tableau 9**). La masse végétale fraîche comestible à ingérer (kg) quotidiennement par un adulte de 60 kg pour atteindre la DJT pour chaque élément peut être calculée en divisant la DJT par la concentration d'un tel élément en mg/kg dans les parties comestibles fraîches. Cette masse représente la quantité maximale à ingérer sans risque d'un produit agricole comestible.

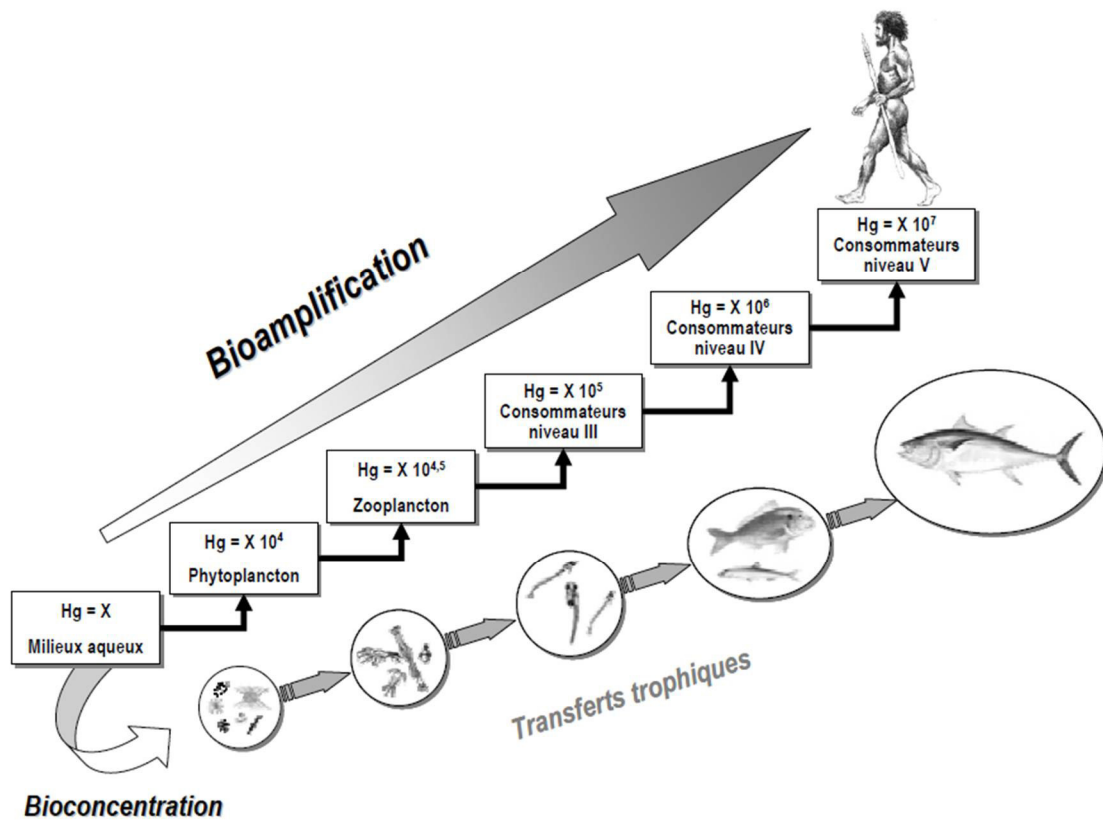


Figure 18: Bioconcentration et bioamplification du Hg dans les réseaux trophiques aquatiques (Tessier, 2004).

Le mécanisme de l'action toxique s'explique par une forte affinité entre les cations et le soufre. Ainsi, des groupes sulfhydriles, -SH, ce qui se produit couramment dans les enzymes qui gouvernent la vitesse de réactions métaboliques importantes dans le corps humain, se fixent facilement aux cations de métaux de trace ingérée ou à des molécules qui contiennent ces métaux. Étant donné que la liaison métal-soufre résultant affecte l'ensemble de l'enzyme, cette dernière ne peut pas agir normalement; par conséquent, la santé humaine est affectée, parfois mortellement. La réaction des cations de métaux de trace M^{2+} (où M est Hg, Pb, ou Cd) avec les unités de sulfhydrile d'enzymes R-S-H pour produire des systèmes stables tels que R-S-M-S-R est analogue à la réaction avec le simple hydrogène sulfuré H_2S inorganiques, avec lequel ils donnent des sulfures solides insoluble MS (Baird and Cann, 2012).

2.3.2.3 Cas particulier du Hg

L'exposition de l'Homme au Hg est principalement réalisée par l'inhalation de Hg élémentaire et l'ingestion de méthylmercure. Hormis lors d'une exposition aiguë en relation avec une activité professionnelle, la population ne semble que faiblement exposé à Hg^0 (Gochfeld, 2003). Les apports liés à la pollution atmosphérique et à l'utilisation d'amalgames en médecine dentaire semblent négligeables (Clarkson, 2002). L'ingestion et l'exposition des populations au Hg se réalise majoritairement à travers la consommation de produits de la pêche (WHO, 2000 ; Dietz et al., 2000) dans lesquels le $MeHg^+$ représente 75 à 95% du Hg total (Gochfeld, 2003). La consommation d'espèces se situant aux niveaux supérieurs des réseaux trophiques y représente la plus grande exposition en $MeHg^+$, comme l'illustre la **Figure 18**. Elle éclaire surtout sur l'importance de contrôler les apports en Hg dans ces denrées alimentaires. Du point de vue des risques sur la santé humaine, les formes les plus préoccupantes sont la vapeur de Hg élémentaire et les composés organiques à courtes chaînes alkyles. En particulier, le méthylmercure représente une véritable menace en tant qu'espèce majoritaire de l'exposition humaine.

Au cours du XXème siècle, l'extrême toxicité du méthylmercure a d'abord pu être illustrée à travers plusieurs cas d'intoxications massives de populations, à Minamata et Niigata au Japon via la consommation de poissons et en Irak avec la fabrication de pains à partir de graines traitées (WHO, 1990 ; Gochfeld, 2003). Entre 1932 et 1966 au Japon, 400 tonnes de Hg furent rejetées d'une usine pétrochimique dans la baie de Minamata engendrant des dizaines de milliers de malades durant les décennies qui suivirent jusqu'à nos jours (Harada, 1995). Le 10 octobre 2013 était signé au Japon sous l'égide de l'ONU la convention Minamata visant à réduire au niveau mondial les émissions du Hg.

3. Objectifs du travail de thèse

Ce travail de thèse comporte deux objectifs principaux :

1) **Le premier objectif de ce travail de thèse était d'étudier les modes de transfert et de stockage du Hg vers les parties aériennes de végétaux** cultivés sur sols enrichi en Hg. Les modèles retenus sont ceux qui présentent un potentiel d'accumulation du Hg avéré :

- a. le peuplier *Populus trichocarpa* x *Populus maximowiczii* var Skado ; déjà implanté sur le site d'étude dans le cadre du projet BIOFILTERE.
- b. des espèces d'intérêt agronomiques de la famille des Solanacées

Une étude bibliographique a en effet souligné les incertitudes et controverses liées aux modalités d'entrée du Hg dans la biomasse aériennes des végétaux. Il s'agira d'évaluer les contributions relatives des voies racinaires et atmosphériques d'entrée du Hg par estimation de la croissance de jeunes plantules et des teneurs en Hg. Nous avons privilégié un système qui a permis une exposition naturelle plutôt qu'une exposition à des teneurs en Hg artificielles. Ce mode d'exposition naturel nous a permis par ailleurs d'envisager plusieurs hypothèses exposées dans la littérature :

- c. le transfert du Hg est réalisé par voie aérienne (absorption foliaire du Hg atmosphérique).
- d. le transfert du Hg est réalisé par voie racinaire (absorption racinaire du Hg sédimentaire puis transfert vers les parties aérienne par la sève).
- e. le transfert du Hg est réalisé de façon mixte (absorption foliaire et racinaire du Hg atmosphérique et sédimentaire respectivement).

Dans la présente étude, nous avons combiné les approches de terrain et de laboratoire pour déterminer les voies d'absorption du Hg dans des feuilles de *Populus trichocarpa* X *Populus maximowiczii* / var Skado et dans certaines plantes de la famille des Solanacées tel que le tabac et d'autres espèces agronomiques (poivron, tomate, aubergine). Plus précisément, le but de ce premier objectif est d'évaluer les contributions relatives des voies racinaires et atmosphériques par la croissance de boutures de peuplier et de plantules de la famille des Solanacées, lors d'une exposition naturelle au Hg plutôt qu'à une exposition artificielle.

Les expériences de terrain ont été réalisées sur le site de Tavaux, dont le sol est enrichi en Hg ; et sur le site de Montbéliard comme site contrôle avec une teneur en Hg de base. Les expériences de laboratoire ont été réalisées en Phytotron, le premier contenant des pots avec des sols contrôle (sans Hg), et le second contenant des pots avec du sol de Tavaux. Le détail sera précisé dans le chapitre « matériel et méthodes ».

Des approches biochimiques ont été mises en œuvre afin de déterminer quelles étaient les modalités de stockage ou de séquestration du Hg dans les tissus végétaux :

- f. Stockage du Hg sous forme inorganique
- g. Stockage du Hg sous forme chélatée/ méthylée.
- h. Chélation du Hg aux parois cellulaires

2) **Le deuxième objectif de ce travail de thèse avait pour but de mettre en évidence le transfert d'ETMs à partir de sols contaminés chez des espèces d'intérêt agronomique.** Ce travail visait à estimer les risques de contamination lors de la consommation de ces végétaux et contribuer aussi à la compréhension des mécanismes de compétition entre les ETMs et les éléments majeurs à partir du sol vers les parties aériennes des plantes. Cet objectif est en lien avec les pratiques fréquentes de cultures agronomiques en milieu urbain/suburbain, supposant dans certains cas une exposition aux ETMs plus élevées qu'en milieu agricole, notamment à proximité d'activités industrielles génératrices d'ETMs (hormis le Hg qui est abordé dans le premier objectif). Les trois types de substrats utilisés pour cette étude :

- Le **substrat de Thann** issu d'un bassin de stockage des résidus de l'activité d'extraction du Ti à partir d'une roche mère, l'Ilménite.
- Le sol **pollué ou non pollué du site de Fresnes**. Cette zone a été utilisée pour le dépôt des sédiments de curage réalisés par les VNF des années 60 à 70. Cependant l'épandage des sédiments a été réalisé de façon hétérogène et certaines parcelles présentes des teneurs en ETMS en deçà des seuils réglementaires, alors que d'autres zones présentent des niveaux de contamination élevés, comme l'ont révélées les analyses réalisées dans le cadre du projet BIOFILTREE.
- Le **substrat contrôle** préparé au laboratoire,

Dans cette étude, nous avons conduit l'expérience en chambre de culture en utilisant diverses espèces agronomiques d'intérêt agro-alimentaire (légume-feuille : salade, chou ; et légume-fruit : concombre, poivron). En outre nous avons utilisé comme plante de référence le peuplier afin de mieux évaluer ses capacités de bio-moniteur passif dans ce contexte.

4. Matériels et méthodes



Figure 19: Vue aérienne de l'étang et de la décharge de résidus situés à Saint-Symphorien-sur-Saône (21) en Bourgogne Franche Comté, contenant le substrat de l'usine située à Tavaux (39), et contaminé principalement par le Hg.



Figure 20: Vue aérienne de l'usine de traitement des effluents et de la décharge de résidus contenant le gypse rouge (site de l'Ochsenfeld), issu de l'usine Cristal située à Thann (68).

4.1 Description des sites d'étude et caractérisation des sols

Les expériences réalisées ont concerné 3 sites expérimentaux décrits ci dessous.

4.1.1 Le site de Tavaux

L'usine de Solvay à Tavaux a démarré son activité en 1930. L'usine produit actuellement des matières plastiques comme du PVC (PolyChlorure de Vinyle) et plusieurs composés chimiques tels que de la soude caustique, de l'eau de javel, de l'acide chlorhydrique, du chloroforme ou d'autres produits organiques chlorés⁴. Les composés chlorés produits dans l'usine sont principalement issus de l'électrolyse du sel (NaCl), le sous-sol du Jura étant riche en sel gemme. L'électrolyse du sel permet de générer du chlore sous forme gazeuse (Cl₂) et de la soude (NaOH). Plusieurs techniques permettent la production de chlore et de soude comme l'électrolyse à Hg longtemps utilisée par l'usine Solvay. Parfois, du chlorure de baryum est utilisé pour éliminer les ions sulfates du *process*. En 2010, l'usine a remplacé ses deux salles d'électrolyse Hg par une salle d'électrolyse membrane de capacité équivalente, moins nocive pour l'environnement, car l'utilisation de l'électrolyse à Hg sera définitivement interdite à partir de 2020. L'usine est également classée « Seveso » (la directive « Seveso » impose aux États membres de l'Union Européenne d'identifier les sites industriels présentant des risques d'accidents majeurs) en raison notamment des natures toxiques et inflammables de nombreux produits. L'activité liée à la production de produits chlorés (de même que la gestion du site de St Symphorien) est depuis 2016 passée sous l'enseigne INOVYN.

Les eaux usées provenant de l'usine sont acheminées via un canal partiellement couvert et déversées dans des bassins de décantation sur la commune de Saint-Symphorien-sur-Saône (21), avant de rejoindre l'étang de l'Aillon. Cette étape permet d'éliminer une majorité des polluants et de diminuer le pH de l'eau, très alcalin en raison de la présence de soude. Le sol de ces bassins est donc contaminé par du Hg et du Ba principalement, et présente un pH alcalin (§ 4.1.4). Les sédiments de l'étang ont été prélevés et déposés pendant près de 40 ans sur une lagune construite et située sur la commune de Saint-Symphorien-sur-Saône, dans le département de la Côte d'Or (Latitude : 47° 4' 52 " Nord, longitude : 5° 20' 14" Est). Le dépôt de sédiments a été arrêté en 2010, et une végétation naturelle a colonisé cette lagune d'environ 12 ha (**Figure 19**).

4.1.2 Le site de Thann

Le site d'étude est situé à Thann dans le Haut Rhin en France (lat. 47° 47' 47.6124" N - long. 7° 8' 18.6498" E) et appartient au groupe Cristal France SAS de Thann. Le site de l'Ochsenfeld, usine de traitement et de valorisation des effluents de 80 hectares, se trouve environ à 3 kilomètres du site principal (**Figure 20**).

⁴ http://www.solvay.fr/FR/SolvayenFrance/nos_sites_en_france/tavaux/tavaux_les_produits_fabriques.aspx



Figure 21: Vue aérienne du site expérimental situé à Fresnes-sur-Escout (59) au bord de la rivière Escout.

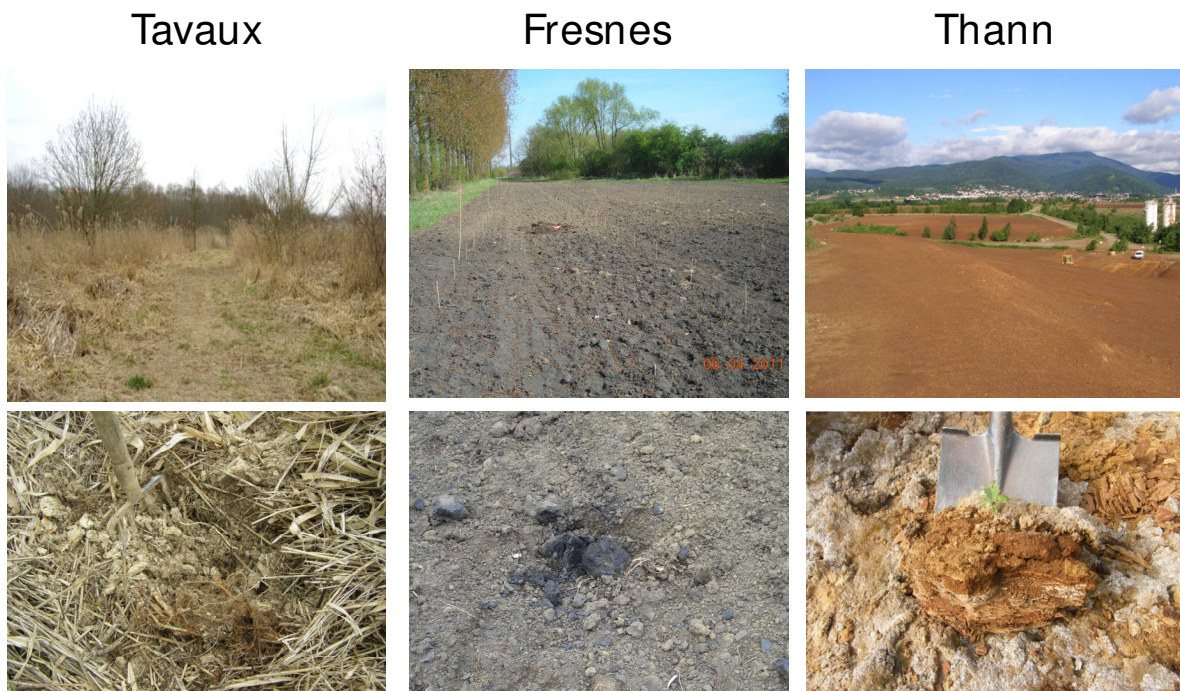


Figure 22: Les substrats issus de trois sites : Tavaux, Fresnes et Thann.

À Ochsenfeld, une paroi moulée de 3,5 km de long a été construite pour protéger les aquifères de la nappe phréatique de la région des pollutions industrielles du passé. Cette usine a été la première usine au monde à produire du TiO_2 dont la fabrication a démarré en 1922. Le TiO_2 est un pigment blanc utilisé pour blanchir et apporter éclat, opacité et durabilité aux peintures et revêtements plastiques, papiers et élastomères. L'usine produit du TiO_2 par un procédé à base de sulfate, procédé chimique par voie humide qui utilise l'acide sulfurique pour extraire et purifier le TiO_2 sous la forme cristalline anatase. L'extraction du titane par le procédé sulfurique (tel que celui mis au point par la Société Cristal en France) conduit à la production de gypse rouge, produit par la neutralisation des eaux usées de l'usine de TiO_2 avec le calcaire. Le sol de ce site « gypse rouge » a des caractères limoneux, alcaline, et contaminé principalement par le Ti, le S, le Fe et le Cr.

4.1.3 Le site de Fresnes

Le site de Fresnes-sur-Escaut (59) (Latitude : 50° 25' 46" Nord, Longitude : 3° 35' 4" Est) est situé au bord de la rivière Escaut dans le département du Nord, de la région Nord-Pas-de-Calais (**Figure 21**). Le terrain appartient aux VNF (Voies Navigables de France) et a été utilisé pendant plusieurs années pour le dépôt de sédiments issus du curage de l'Escaut. Aucune donnée n'est disponible quant à la fréquence et la quantité de sédiments déposés sur ce site. Plusieurs couches de sédiments successives ont ainsi été apportées dont l'épaisseur totale varie de quelques centimètres (20 à 40 cm) à plusieurs mètres (2 à 3 m). Les polluants majeurs de ce site sont le Cd, Zn, As et Pb. Le site a principalement été exploité comme prairie et pour la chasse. Des études de risques menées par l'INERIS ont montré que l'ingestion de gibier issu de la chasse ne présentait pas de danger pour la population car la consommation annuelle de lapins par personne reste limitée (maximum 4 lapins par personne et par an) et largement inférieure au seuil de risque évalué.

4.1.4 Caractéristiques physico-chimiques des sols

Cinq substrats différents ont été utilisés pour nos expérimentations (**Figure 22**). Ces substrats sont mélangés au préalable à du sable (vol/vol, 1/1) pour une meilleure aération. Des échantillons de substrats ont été prélevés au temps initial (t_0) et final (t_f) puis séchés à l'air ambiant pendant une semaine, broyés au mortier et tamisés à 2 mm. Les paramètres physico-chimiques ont été mesurés par la société SADEF (Aspach-le-Bas, Haut-Rhin) (échantillons de 500 g déposés au laboratoire). Ces 5 substrats sont les suivants :

- **Le substrat contrôle** se compose d'un mélange de tourbe commercial (Brill substrat Typical GmbH, Georgsdorf, Allemagne) et de sable (vol/vol, 1/1). Ce mélange se compose principalement du sable grossier et a des caractères alcalins.



Figure 23: Dispositif de Tavaux : préparation du substrat, homogénéisation et distribution dans des pots de 4 L avant plantation de boutures de peuplier.

Tableau 10: Distribution granulométrique et caractéristiques physico-chimiques des substrats.

		Argile %	Limo n fin %	Limon grossier %	Sable fin %	Sable grossier %	pH	CaCO ₃ %	Phosphore assimilable g/ kg
Substrat contrôle	Moyenne (N= 4)	2,57	2,80	2,30	11,87	80,60	8,18	11,45	0,08
	Ecart- type	1,08	1,56	1,00	1,17	0,95	0,05	0,45	0,02
Substrat de Tavaux	Moyenne (N=6)	20,66	74,53	2,21	0,95	1,60	8,32	58,16	0,35
	Ecart- type	2,05	2,47	0,69	0,07	0,46	0,17	11,22	0,02
Substrat de Thann	Moyenne (N=4)	8,18	46,38	25,83	14,75	4,85	7,90	8,98	0,01
	Ecart- type	0,84	1,94	3,95	1,16	3,95	0,12	1,63	0,00
Substrat contrôle de Fresnes	(N=1)	15,2	18,7	48,7	11,4	6	7,7	3,2	0,58
	Ecart- type	---	---	---	---	---	---	---	---
Substrat pollué de Fresnes	(N=1)	15,5	32,1	34,7	14,4	3,3	7,8	7,1	0,5
	Ecart- type	---	---	---	---	---	---	---	---

- **Le substrat de Tavaux** a été collecté sur la lagune de stockage (§ 4.1.1). Après élimination de la fraction la plus grossière (litière et racine), le substrat est prélevé à la pelle, et homogénéisé sur une bâche avant d'être disposé dans des pots (**Figure 23**). Ce substrat calcaire se compose principalement du limon fin et d'argile (**Figure 22**), et présente un caractère alcalin (**Tableau 10** et **Tableau 11**). Ce substrat est utilisé soit en milieu naturel, soit en phytotron pour éviter la dispersion du Hg⁰ dans l'atmosphère du laboratoire.
- **Le substrat de Thann** a été collecté sur les 20 premiers cm de sol de la lagune (**Figure 22**), puis homogénéisé avant d'être disposé dans des pots. Ce substrat contient principalement du gypse (CaSO₄), oxydes/hydroxydes de fer et d'autres oxydes/hydroxydes de métaux (i.e. Mn, Cr). Ce substrat est stocké dans des décharges ouvertes, il présente un caractère alcalin et contient des faibles quantités en matière organique et en éléments nutritifs (N, P, K) (**Tableau 10** et **Tableau 11**).
- **Les deux substrats de Fresnes** sont prélevés sur une même parcelle (§ 4.1.3). Sur une des extrémités de cette parcelle, le dépôt de sédiment de curage a été très limité et le sol a été peu impacté. Il nous servira de sol contrôle pour les expériences portant sur ce site. Après élimination de la fraction la plus grossière (litière et racine), le substrat pollué ou non est prélevé à la pelle, et homogénéisé avant utilisation. Ce substrat se compose principalement du limon grossier et fin (**Figure 22**). Les deux substrats ont un caractère alcalin par contre le substrat pollué de Fresnes contient trois fois plus de matières organiques que le substrat contrôle (**Tableau 10** et **Tableau 11**).

Tableau 11: Caractéristiques chimiques principales des substrats. Corg : carbone organique ; MO : matière organique ; Ntot : azote total ; C/N : rapport carbone sur azote ; CEC : capacité d'échange cationique.

		Corg g/ kg	MO g/ kg	Ntot g/ kg	C/ N	CEC meq/ kg	K ₂ O g/ kg	MgO g/ kg	CaO g/ kg
Substrat contrôle	Moyenne (N= 4)	42,45	73,45	1,12	37,75	86,50	0,12	0,14	8,98
	Ecart- type	4,13	7,14	0,24	4,57	24,37	0,10	0,02	0,18
Substrat de Tavaux	Moyenne (N=6)	19,88	34,38	2,11	9,42	87,50	0,39	0,13	11,90
	Ecart- type	1,84	3,19	0,19	0,43	7,89	0,12	0,01	0,71
Substrat de Thann	Moyenne (N=4)	7,15	12,38	0,37	19,30	51,00	0,01	0,76	87,20
	Ecart- type	2,29	3,98	0,03	4,46	5,42	0,01	0,59	1,41
Substrat contrôle de Fresnes	(N=1)	46,3	80,1	2,71	17	119	0,28	0,15	8,7
	Ecart- type	---	---	---	---	---	---	---	---
Substrat pollué de Fresnes	(N=1)	149	257,8	3,64	40,9	155	0,58	0,17	10,8
	Ecart- type	---	---	---	---	---	---	---	---

Tableau 12: Caractéristiques des différentes espèces végétales utilisées.

Espèce/ nom latin	Cultivar	Famille	Origine/ provenance	Utilisation
Aubergine/ <i>Solanum melongena L.</i>	de Barbentane	Solanacées	Graines	Investiguer les modes d'absorption et d'accumulation du Hg dans leurs parties aérienne (fruits et/ou feuille)
Tomate/ <i>Solanum lycopersicum</i>	Marmande	Solanacées	Graines	
Poivron/ <i>Capsicum annuum</i>	Yolo wonder	Solanacées	Graines	
Tabac/ <i>Nicotiana tabacum</i>	---	Solanacées	Jardinerie	
Poivron/ <i>Capsicum annuum</i>	Alby F1	Solanacées	Jardinerie	Investiguer les modes d'absorption et d'accumulation des ETMs dans leurs parties aérienne (fruits et/ou feuille)
Concombre/ <i>Cucumis sativus</i>	Raider F1	Cucurbitacées	Jardinerie	
Laitue/ <i>Lactuca sativa</i>	Batavia kamikaze	Astéracées	Jardinerie	
Chou/ <i>Brassica oleracea</i> Var. capitata f. alba	Mozart F1	Brassicacées	Jardinerie	

4.2 Matériel végétal et dispositifs expérimentaux

4.2.1 Matériel végétal

4.2.1.1 Peuplier (*Populus trichocarpa* X *Populus maximowiczii*/var *Skado*)

Le Peuplier appartient à la famille des Salicacées, le genre *Populus* englobe 35 espèces, il comprend également de nombreux hybrides comme le cultivar Skado obtenu par le croisement de *Populus trichocarpa* et *Populus maximowiczii*. Le peuplier a une croissance rapide et considéré comme une plante ligneuse modèle. Le peuplier est largement étudié pour ses capacités de tolérance aux ETMs et donc utilisé dans la majorité de nos expériences comme référence. Les boutures nous ont été fournies par les Pépinières EARL D'Arcy (Ferme d'Arcy, 6050 Bury), seul détenteur de la licence d'exploitation de ce clone. Ce clone est originaire de Belgique.

4.2.1.2 Plantes d'intérêt agronomique

Plusieurs plantes d'intérêt agronomique ont été utilisées et leurs principales caractéristiques sont détaillées dans le **Tableau 12**.

4.2.2 Dispositifs expérimentaux pour l'étude du transfert de Hg (Tavaux)

4.2.2.1 Culture en pot en condition d'exposition naturelle

Des boutures de 30 cm de cultivar Skado ont été plantées en pots de 4 litres, contenant du substrat de Tavaux ou du substrat contrôle, comme décrits au paragraphe 4.1.4. Ces pots sont disposés l'un à côté de l'autre de façon aléatoire, sur le site de Tavaux (atmosphère enrichie en Hg) ou de Montbéliard (atmosphère ambiante) (**Figure 24**).

- Site de Tavaux : l'étude a été conduite pendant 8 semaines. Les peupliers sont arrosés 2 fois par semaine avec ≈ 300 ml d'eau par pot. Parmi les 30 pots de chaque type de substrat mis en place au départ, cinq de chaque ont été utilisés pour récolter les feuilles. Deux feuilles avec deux âges différents sont marquées au cours de l'expérience, une feuille jeune (16 jours) et une feuille mature (29 jours).
- Site de Montbéliard : L'étude a été conduite pendant 16 semaines, les peupliers sont arrosés 2 fois par semaine avec ≈ 300 ml d'eau par pot. Parmi les 30 pots de chaque types de substrat mis en place au départ, cinq de chaque ont été utilisés pour récolter les feuilles. Trois feuilles d'âges différents sont marquées au cours de l'expérience, une feuille jeune (14 jours), une feuille mature (77 jours) et une feuille âgée (104 jours). La feuille d'âge 0 a été définie le jour du marquage comme étant la troisième feuille de plus de 2 mm en partant de l'apex (soit la feuille d'indice foliaire 3 d'après la définition de [Larson et Isebrands \(1971\)](#)).
- La teneur en chlorophylle a été estimée à partir de trois mesures sur chaque feuille marquée en utilisant un appareil de mesure de la teneur en chlorophylle (CCM200, Opti-Sciences, Inc., Hudson, États-Unis) (**Figure 25**). A la fin de l'expérience, les feuilles marquées sont récoltées et rincées à l'eau déminéralisée puis à l'eau distillée.

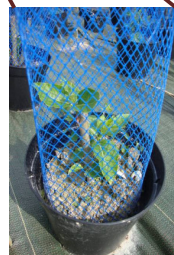
Site de Tavaux



a)



b)



Site de Montbéliard



c)



d)



Figure 24: Dispositif expérimental de culture de boutures de peuplier exposées à l'atmosphère enrichie au Hg sur le site de Tavaux et à l'atmosphère ambiante sur le site de Montbéliard. Des boutures implantées sur le substrat contrôle préparé au laboratoire (a, c), alternent avec des boutures implantées sur le substrat de Tavaux (b, d).



Figure 25: Appareil de mesure de la teneur en chlorophylle, *Chlorophyll content meter (CCM)*.

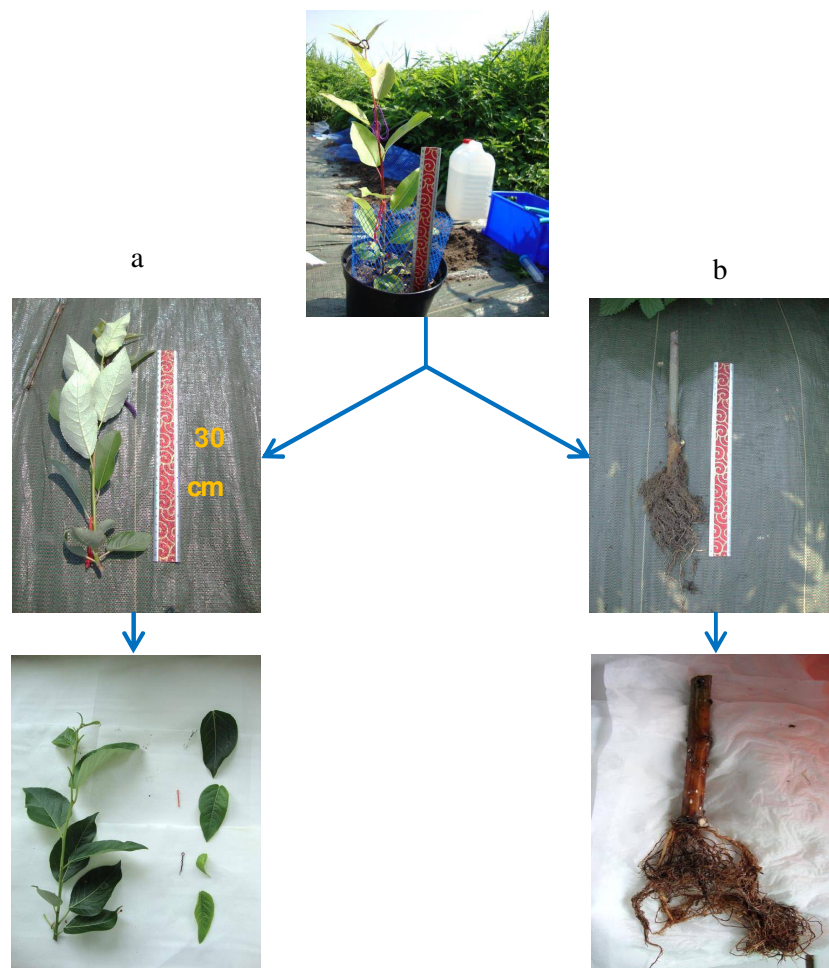


Figure 26: La récolte de peupliers cultivés sur les sites de Tavaux (atmosphère contaminée par Hg) et Montbéliard (atmosphère ambiante). Les différentes feuilles marquées au cours de croissance (a), et les racines de chaque individu (b) ont été lavées, séchées et préparées pour l'analyse.

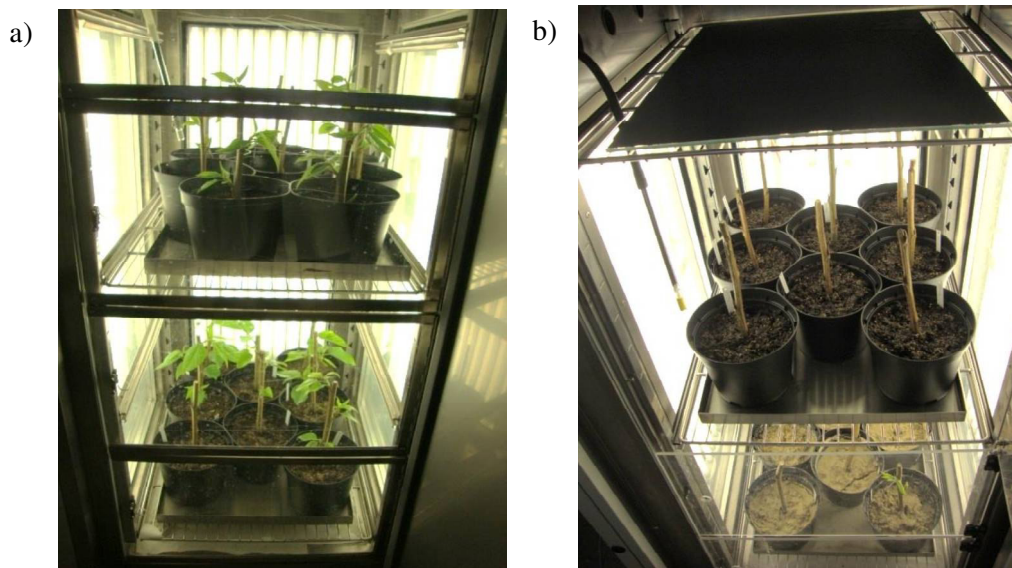


Figure 27: Deux phytotrons, a) le premier contient des boutures de peuplier implantées uniquement sur le substrat contrôle et exposées à une atmosphère ambiante. b) le deuxième contient des boutures de peuplier implantées soit sur le substrat de Tavaux enrichi en Hg (1^{er} étage du phytotron) soit sur le substrat contrôle (2^{ème} étage du phytotron) et exposées à une atmosphère contaminée par des vapeurs du Hg issus du substrat de Tavaux.

Tableau 13: Conditions environnementales pour la culture des végétaux dans les phytotrons.

	Jour	Nuit
Température	22 °C (peuplier) ou 25°C (autres espèces)	18 °C
Humidité relative	60-80 % (phytotron) 30-50% (chambre de culture)	
Durée de l'éclairage	16 heures	8 heures
Densité de flux des photons	250-300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{S}^{-1}$	---

- Ensuite, les peupliers sont déterrés, leurs racines sont rincées deux fois durant 15 minutes dans l'eau distillée (**Figure 26**).
- Par la suite, les substrats contrôles, les feuilles, et racines (plants contrôles uniquement) ont été broyées. 50 à 100 mg de masse sèche ont été utilisés pour la quantification de Hg à l'AMA254 (§ 4.4.1.1). La concentration aérienne en Hg dans le site de Montbéliard contenant une atmosphère ambiante a été estimée en utilisant un piège de charbon actif (§ 4.2.2.2.3). Le charbon d'iode a été broyé et analysé par l'AMA 254. Les teneurs en Hg atmosphérique mesurées au site de Montbéliard furent $0,95 \pm 0,13 \text{ ng m}^{-3}$. La teneur en Hg atmosphérique n'a pas pu être mesurée sur le site de Tavaux par le même dispositif pour des raisons pratiques.

4.2.2.2 Expériences réalisées en phytotron

4.2.2.2.1 Peuplier

Des boutures de peuplier du cultivar Skado ont été plantées en pots de 3 litres, contenant du substrat de Tavaux ou du substrat contrôle, comme décrit précédemment (§ 4.1.4). Un fertilisant (N/P/K11/11/18, Osmocote exact, Heerlen, Netherlands) est ajouté à raison de 9 g par pot. Deux expériences ont été mises en place de façon séquentielle dans deux phytotrons différents pendant 45 et 46 jours respectivement. La première expérience est constituée seulement de pots contrôles (atmosphère contrôle) afin d'éviter tout risque de contamination atmosphérique par l'expérience en présence de Hg. La seconde expérience a été mise en route immédiatement après la première et était composée d'un mélange de pots contenant du substrat enrichi en Hg ou du substrat contrôle (§ 4.1.4), mais séparés en deux étages dans le phytotron comme détaillé dans la **Figure 27** afin d'éviter le contact des pots via la solution ruisselant après arrosage (atmosphère pollué par Hg issu du substrat de Tavaux). Dans la deuxième expérience les peupliers cultivés sur substrat contrôle n'ont été exposés qu'au Hg atmosphérique issu du substrat de Tavaux, alors que les peupliers cultivés dans le substrat pollué ont été exposés au Hg atmosphérique et racinaire. Les conditions environnementales dans les deux phytotrons sont résumées dans le **Tableau 13**.

- Deux à trois feuilles représentatives de différents âges ont été marquées sur chaque plante, et la teneur en chlorophylle a été suivie tout au long de l'expérience. L'échantillonnage des feuilles a été réalisé selon le même protocole que l'expérience en conditions naturelles.
- La concentration aérienne en mercure dans les deux phytotrons a été estimée en utilisant un piège de charbon actif (§ 4.2.2.2.3). le charbon d'iode a été broyé et analysé par l'AMA 254. Les teneurs en Hg atmosphériques mesurées dans les phytotrons furent $2,190 \pm 0,356 \text{ ng m}^{-3}$ et $8,775 \pm 0,764 \text{ ng m}^{-3}$ pour les phytotrons contrôle et polluée respectivement.



Figure 28: Des plantules de la famille des Solanacées (poivron, tomate, aubergine et tabac) implantées soit sur substrat contrôle soit sur substrat de Tavaux. Les substrats sont distribués sur deux étages du phytotron, chaque étage contient deux bacs séparés, un pour les pots contrôles et l'autre pour les pots contenant le sol de Tavaux.

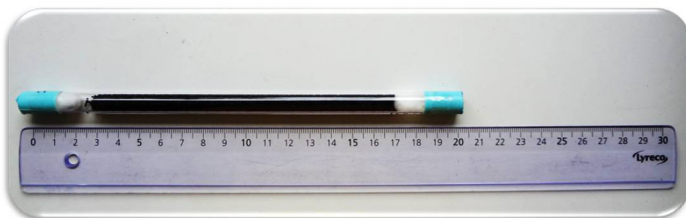


Figure 29: Un piège de charbon d'iode conçu précisément pour capturer le Hg atmosphérique (d'après INRS, 2003).

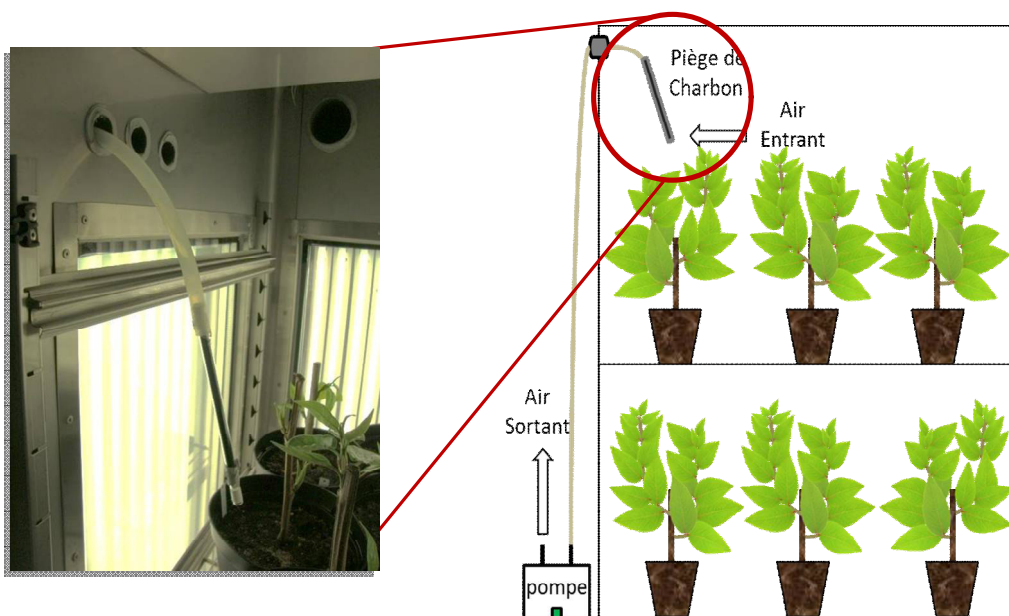


Figure 30: Un piège de charbon d'iode lié à une pompe avec un débit de 6l/min dans toutes les expériences en phytotron sous condition contrôlée pour évaluer la concentration du Hg aérien.

4.2.2.2.2 Solanacées

Plusieurs plantules préalablement mises à germer ont été plantées en pots de 0.5 litres, contenant du substrat de Tavaux ou du substrat contrôle, comme décrit précédemment (§ 4.1.4). Le fertilisant est ajouté à raison de 1.5 g par pot. L'étude a été conduite pendant 12 semaines en phytotron. L'expérience est similaire à celle décrite pour le peuplier (**Figure 28**), avec des conditions environnementales précisées dans le **Tableau 13**.

- 32 pots contenant du substrat contrôle (8 pots pour chaque espèce) et 32 pots contenant du substrat de Tavaux (8 pots pour chaque espèce) sont mis en place au départ de l'expérience, toutes les plantes ont été utilisées pour la récolte. Les feuilles et les fruits ont été rincés à l'eau déminéralisée puis par l'eau distillée. Ensuite les masses fraîches des feuilles et fruits ont été mesurées, séchées à 35°C à l'étuve pendant 48 h pour les feuilles et une semaine pour les fruits avant d'en mesurer les masses sèches.
- Concernant les substrats, un sous-échantillon a été collecté de chaque pot, tamisé (2 mm) après avoir été séché à l'air durant une semaine. Par la suite, les substrats contrôles, les feuilles, et fruits ont été broyés. 50-100 mg de masses sèches sont utilisés pour la quantification du Hg total par l'AMA254. La concentration aérienne en Hg dans le phytotron a été estimée en utilisant un piège de charbon actif comme précisé précédemment).

4.2.2.2.3 Optimisation du piège à Hg gazeux

La nécessité d'avoir une matrice analysable dans les mêmes conditions d'analyse que le Hg séquestré dans nos échantillons, et la nécessité de la précision requise pour capturer des faibles quantités du mercure gazeux dans les différentes expériences nous ont poussé à développer un piège à Hg gazeux très précise de l'échelle de ppb. Le piège se compose d'un tube de verre de longueur 20 cm et diamètre intérieur de 0,8 cm (INRS, 2003) remplis sur 14 cm de charbon actif (Charbon d'iode, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Allemagne) maintenu par deux tampons de laine de quartz (**Figure 29**). Ce charbon d'iode est conçu précisément pour absorber les vapeurs de Hg. Ce piège a été utilisé comme collecteur actif du Hg en le liant à une pompe à l'air avec un débit de 6l/min (**Figure 30**).

4.2.3 Dispositifs expérimentaux pour l'étude de la phytotoxicité et du transfert des éléments traces (substrats de Thann et Fresnes)

Quatre substrats ont été utilisés pour ces expériences (substrat de Thann, sols de Fresnes, et substrat contrôle), comme décrits précédemment (§ 4.1.4). Les plantes utilisées pour cette étude sont des légumes-feuilles (laitue et chou), des légumes-fruits (poivron et concombre) et le peuplier (**Tableau 12**).



Figure 31: Cinq espèces végétales (peuplier, laitue, chou, poivron et concombre), et 12 individus de chaque espèce ont été cultivés en pots de 0,5 L contenant l'un des 4 substrats (substrat de Thann, les deux sols de Fresnes et le substrat contrôle). Les 240 pots ont été séparés selon le type de substrat sur 4 bacs.

Des plantules de légumes et des boutures de peuplier ont été plantées en pots de 0.5 L, contenant des substrats pollué de Thann ou de Fresnes, du sol agricole faiblement pollué de Fresnes et du substrat contrôle. 1,5 g des fertilisants (N/P/K 11/11/18, osmocote exact, Heerlen, Netherlands) ont été ajoutés à chaque pot. L'expérience est similaire à celle décrite pour le peuplier, avec des conditions environnementales précisées dans le **Tableau 13**.

- L'expérience a été mise en place dans une chambre de culture pendant 56 jours. Les quatre substrats ont été placés dans différents bacs (**Figure 31**) : 60 pots de chaque type de substrat contenant 5 espèces végétales (12 individu de chaque espèce) ont été disposés dans des bacs différents pour éviter le contact des pots via l'eau ruisselant après arrosage. Les plantes ont été arrosées deux fois par semaine.
- Les plantes ont été récoltées en deux séries, la moitié après 32 jours de croissance, et la seconde moitié a été récoltée après 56 jours de croissance. Les plantes entières feuilles et fruits (le cas échéant) ont été récoltées et rincées par l'eau déminéralisée puis par l'eau distillée. Ensuite, les masses fraîches ont été enregistrées puis les feuilles et fruits ont été séchés puis les masses sèches ont été enregistrées afin de calculer les teneurs en eau dans chaque espèce et dans chaque organe (i.e. feuille ou fruit). Par la suite, les feuilles, et fruits ont été broyés. En ce qui concerne les substrats, un sous-échantillon a été collecté de chaque pot, et tamisé (2 mm) après avoir été séché à 40°C à l'étuve durant deux jours. 125 mg de matière sèche de chaque matrice (feuille, fruit ou substrat) ont été utilisés pour la quantification des éléments par ICP-AES (§ 4.4.2.2).

4.3 Méthodes Biochimiques

4.3.1 Extraction de la fraction acides aminés

400 mg de masse sèche de peuplier ou de poivron ont été broyés en présence de 2 ml d'éthanol frais (70%) en utilisant le broyeur à billes (Retsch MM200, Haan, Allemagne). Puis les échantillons ont été centrifugés à 25000 g pendant 5 min à 4°C. Les surnageants ont été centrifugés une deuxième fois et filtrés à 0.45 µm (Merck millipore, Darmstadt, Allemagne). Un aliquote de 2 x 300 µl de chaque surnageant limpide a été passé à l'AMA254 pour en quantifier le Hg total (§ 4.4.1.1).

4.3.2 Extraction et dosage des protéines solubles

- L'extraction doit être réalisée en un minimum d'étapes pour éviter les pertes de Hg. Elle est réalisée dans un tampon contenant des inhibiteurs de protéases (comme le PMSF) mais sans ajout d'anti-oxydants (réducteur) (i.e. β-mercaptoethanol) afin d'éviter la libération du Hg impliqué dans les liaisons S-Hg-S. 10 g de matière végétale fraîche enrichie en Hg (feuilles de poivron) ont été broyés dans un mortier en présence du tampon d'extraction Tris/HCl (50 mM, pH 7,8). L'homogénat a été filtré sur une gaze puis centrifugé à 30,000 g pendant 10 min à 4 °C. Puis le surnageant a été filtré sur filtre de nitrocellulose à 0.2 µm (Whatman, maidstone, England). Le surnageant limpide a été aliquote pour quantifier les protéines, le Hg.

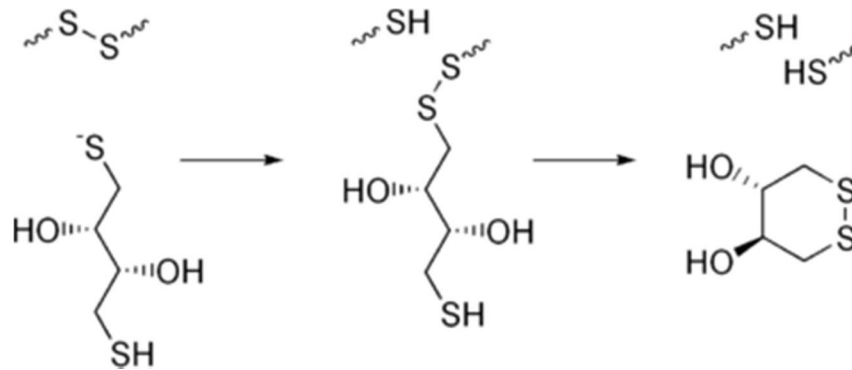


Figure 32: Mécanisme de réduction des ponts disulfure par le DTT (d'après [Celand, 1964](#)).



Figure 33: Analyseur de Hg total AMA (*Advanced mercury analyser*) (à gauche). Le plateau de passeur automatique ASS (*auto solid sampler*) remplis par des nacelles en nickel contenant des échantillons liquides (à droite).

- Le dosage des protéines est réalisé par la méthode de Bradford. Une courbe de calibration est effectuée avec de la sérumboalbumine (BSA) à 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 µg/ml. La concentration en protéines totales a été estimée à l'aide d'un kit (Coomassie Bradford Protein Assay kit, Thermo Scientific). La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique qui utilise comme réactif le bleu de coomassie, basé sur la mesure de l'absorbance à 595nm. 30 µl de chaque surnageant sont mélangés à 1.5 ml de réactif de Coomassie en formulant le composé coloré (bleu), le blanc a été préparé à partir des mêmes réactifs en remplaçant le surnageant par le tampon d'extraction utilisé pour extraire les protéines solubles (Tris-HCl, 50 mM, pH 7.5). Les protéines ont été quantifiées en mesurant la densité optique (DO) sur trois répliques de chaque échantillon. Les concentrations de protéines sont exprimées en µg/ml.
- Des aliquotes de protéines sont prélevés et conservés pour être analysés à l'AMA

4.3.3 Essais de relargage du Hg lié aux protéines par le DTT

Le DTT est utilisé principalement pour réduire les ponts disulfures des protéines, et, plus généralement, pour prévenir la formation de ponts disulfures intramoléculaires et intermoléculaires. Le mécanisme de réduction repose sur la substitution successive des atomes de soufre par protonation. Il se cyclise ensuite en formant un pont disulfure intramoléculaire (**Figure 32**). L'ajout de DTT dans un extrait protéique contenant des protéines chélatées au Hg par liaison S-Hg devrait donc se traduire par la libération de Hg. Nous avons donc

- réalisé des essais avec et sans DTT,
- précipité les protéines par l'acétone pure contenant 10% de TCA (poids/volume)
- mesuré la teneur en Hg dans les fractions « surnageant » et « précipité » à l'AMA254.

4.4 Méthodes analytiques

4.4.1 Analyse des formes de Hg

4.4.1.1 Mesure du Hg total par l'analyseur AMA254

4.4.1.1.1 Préparation du matériel végétal et des sols

Tous les échantillons secs (végétaux et substrats) ou frais (végétaux), en solution (fractions acides aminés ou protéiques) sont analysés à l'AMA254 sans aucun prétraitement. Environ 50 mg de chaque échantillon sec ou frais ont été pesés précisément, déposés dans des nacelles en nickel qui sont disposées sur un passeur automatique qui peut recevoir jusque 44 nacelles sur son plateau (**Figure 33**). En revanche 300 µl sont utilisés pour les échantillons liquides. Les nacelles sont calcinées avant chaque utilisation sous la flamme d'un bec benzène pendant 20 secondes par nacelle. Tous les échantillons ont été analysés en deux répliques et conjointement avec les matériaux de référence certifiés suivants.

- Feuilles de tabac (oriental basma tobacco leaves, INCT-OBTL-5, LGC Promochem, Molsheim, France)
- Boues d'épuration (sewage sludge, METRANAL, ANALYTIKA, Ltd., Prague, Czech Republic).

4.4.1.1.2 Description de l'analyseur AMA254

La nacelle contenant l'échantillon est introduite dans l'analyseur, est séchée, puis subit une combustion par l'intermédiaire d'un flux d'oxygène dans un tube en quartz localisé à l'intérieur d'un four à résistance. Les produits gazeux de la combustion sont décomposés sur une colonne catalysée, à 750 °C. La vapeur de Hg est collectée par piégeage sur dépôt d'or, thermiquement désorbée et le Hg volatil Hg^0 est alors entraîné par un flux d'oxygène dans une cellule optique traversée par un faisceau lumineux de longueur d'onde 253,7 nm. Cette longueur d'onde correspond à la longueur d'onde d'émission de Hg et est générée par une lampe à cathode creuse de Hg. La limite de détection absolue de cette technique est de 0,01 ng. Le temps moyen d'analyse pour chaque échantillon est de 5 min divisé en quatre phases :

- la première est le séchage : pour les échantillons secs cette phase est réglée à 45 secondes ; par contre pour les échantillons frais ou liquides le temps doit être prolongé un peu plus (≈ 10 min) et estimé selon la règle : $t = 0,7 \text{ seconde} \times 1 \mu\text{l}$ (ou 1 mg de matière fraîche).
- La deuxième est la décomposition, dont la durée est fixée à 150 secondes pour tout échantillon (sec, frais, liquide).
- La troisième phase est l'attente qui est fixé à 45 secondes pour tout échantillon.
- Ensuite, la quatrième phase est la lecture, d'une durée de 57 secondes avant affichage du résultat final sur l'écran de contrôle.

4.4.1.2 Mesure du MeHg par éthylation, séparation GC et AFS

Cette méthode concerne la détermination de méthylmercure (CH_3Hg^+) dans toutes les matrices environnementales par une éthylation aqueuse de (CH_3Hg^+), purge et piégeage, désorption, et analyse par spectrométrie de fluorescence atomique à vapeur froide (CVAFS). Cette méthode est conçue pour la détermination de (CH_3Hg^+) dans une gamme de 0,02-5 ng/L.

4.4.1.2.1 Préparation du matériel végétal et des sols

L'extraction du méthyl mercure a été réalisée après broyage dans un aliquote de 0,5 g de chaque échantillon via les solutions ajoutées : 2 ml de CuSO_4 (1M), 5ml de HNO_3 (5M) puis 10 ml de dichlorométhane CH_2Cl_2 (DCM) dans des tubes de centrifugation clos par du téflon et du parafilm, couvert par du papier aluminium et placés dans un agitateur pendant 60 min sous hotte.

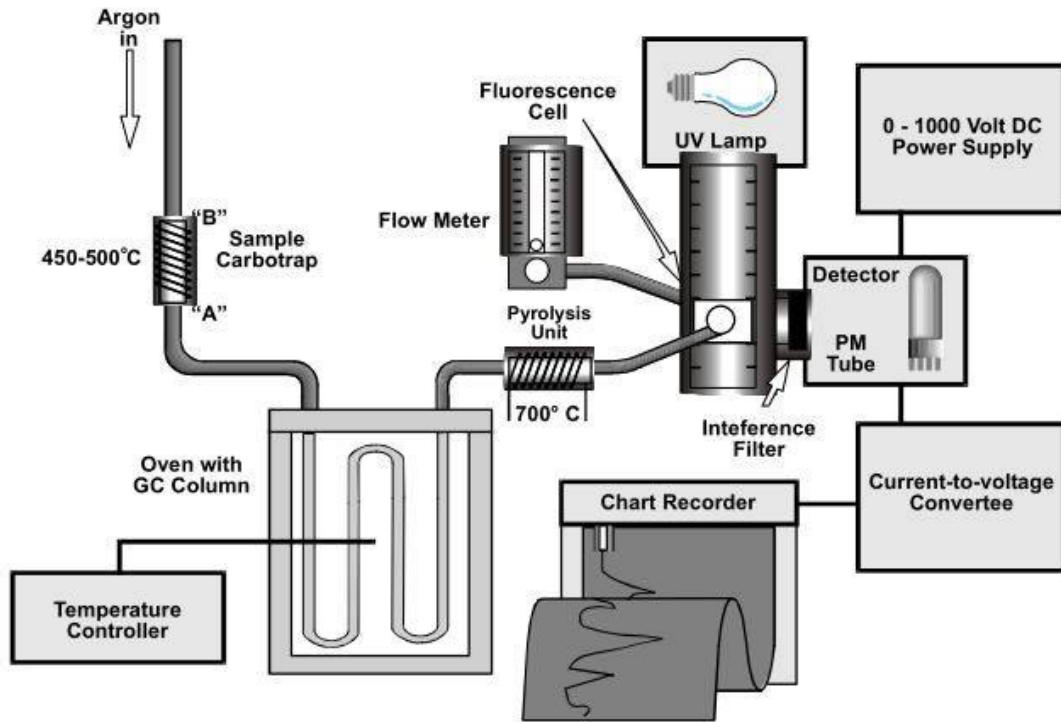


Figure 34: Schéma de l'appareillage de GC-CVAFS et de ses différents composants.

Ensuite, les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 25 min entre 10-15°C, puis la phase du solvant (en bas) est transférée dans des nouveaux tubes, et pesée vide et avec le solvant CH₂Cl₂. Les volumes sont complétés à ≈45 ml par de l'eau ultra pure et la masse est enregistrée. Les tubes sont ensuite placés dans un bain d'eau à 50° C sous un flux de N₂ (50 ml/min) pendant 30min (pour dégager le DCM). Les tubes fermés sont pesés et conservés à 4°C si l'analyse se fait dans les 2 jours maximum sinon les tubes sont congelés.

4.4.1.2.2 Spectromètre de fluorescence atomique à vapeur froide couplé à la chromatographie gazeuse (GC-CVAFS)

Les différentes unités de l'appareil sont d'abord allumées et le débit de gaz Ar est réglé entre 1 à 2 bars (**Figure 34**). Des tubes sont remplis de 29 ml d'eau ultrapure puis 1 ml de chaque extrait est ajouté. Ensuite 200 µl de tampon acétate de sodium (4M) et 100 µl de NaBEt₄ sont ajoutés à chaque tube pendant 15 min. Les pièges sont reliés aux tubes puis le flux de N₂ (350 ml/min) pendant 15 min est mis en marche, pour être ensuite abaissé à 100 ml/min. Les pièges sont inversés pour les sécher avant de les chauffer pendant 25 sec dans un four de résistance relié au four de GC. L'analyse de MeHg a été réalisée par éthylation en utilisant le NaBEt₄, l'analogue éthylyé de CH₃Hg, (méthyléthyle Hg).

4.4.2 Analyse d'ETM s

4.4.2.1 Préparation du matériel végétal et des sols

La minéralisation d'un échantillon végétal ou de sol consiste en la mise en solution des principaux éléments majeurs et des principaux éléments traces. L'extraction des éléments majeurs et traces a été réalisée après broyage d'un aliquote de 0,125 g d'échantillon végétal et minéralisation par 1,75 ml de HNO₃ et 0,5 ml de H₂O₂ ou de 0,125 g d'échantillon de sol et minéralisation par 2 ml de HNO₃ et 5 ml de HCl dans des tubes fermés placés dans un système bloc de digestion (DigiPREP, Sciences SCP, Courtaboeuf, France). Un mode de chauffage progressif a été utilisé pour atteindre une température finale de 100° C (temps de l'exécution totale de 265 min). Ensuite, de l'eau ultrapure (Milli-Q Millipore Système intégré 3, Molsheim, France) a été ajouté pour un volume final de 12,5 ml. Enfin, une filtration à 1 µm a été réalisée. Les concentrations des éléments majeurs et traces ont été déterminées en utilisant un plasma à couplage inductif spectrométrie d'émission atomique (ICP-AES, Radial ICAP 6500 Modèle, Thermo Fischer Scientific, Courtaboeuf, France), et tous les échantillons ont été analysés en trois réplicats et les analyses réalisées conjointement avec les matériaux de référence certifiés suivants :

- basma oriental feuilles de tabac (INCT-OBTL-5, LGC Promochem, Molsheim, France), fruits de *Cucumis sativus* (IPE-817, LGC Promochem, Molsheim, France),
- un sol argileux limoneux (CRM 052, LGC Promochem, Molsheim, France).

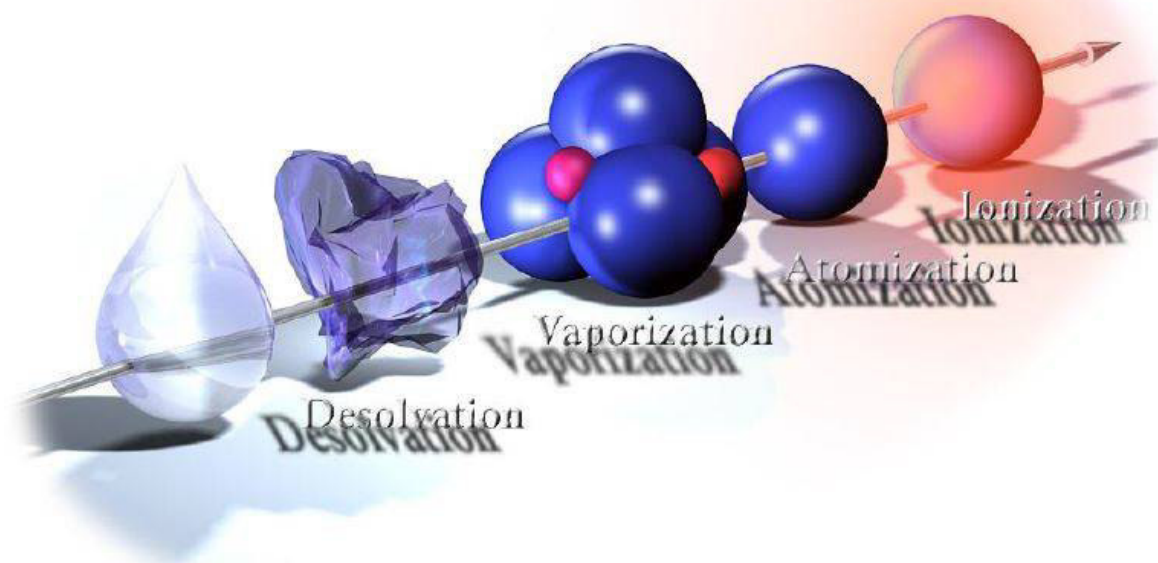


Figure 35: Les 4 étapes de la formation des ions dans le plasma.

4.4.2.2 Spectromètre d'émission atomique couplée à un plasma inductif (ICP-AES)

La méthode consiste à ioniser l'échantillon en l'injectant dans un plasma d'argon, ou parfois d'hélium, c'est-à-dire que les atomes de la matière à analyser sont transformés en ions par une flamme chaude. Certains appareils sont cependant dotés d'une option dite «à plasma froid» qui chauffent à plusieurs centaines de K tout de même, permettant l'analyse de molécules organiques qui seraient autrement détruites. L'échantillon pénètre généralement dans le plasma sous une forme condensée (liquide ou solide), et doit donc subir les changements d'état suivants : fusion (pour les solides), vaporisation, ionisation (**Figure 35**). L'introduction a lieu au centre du plasma, parallèlement au flux de gaz plasmagène.

4.5 Analyses statistiques

L'analyse de variance sur les données a été réalisée grâce au logiciel R version 3.2.0 (R Development Core Team, 2015).

Tous les tests ont été considérés comme significatifs lorsque $p < 0,05$.

- Tests de comparaison de moyennes :

Les différences de contenu en Hg ou des autres ETMs ont été réalisées avec une ANOVA suivie par un test de Tukey-Kramer de comparaison multiple des moyennes. Afin de respecter les postulats de ANOVA, les concentrations en ETM ont été transformées au log, ou en racine carré selon les cas.

- Analyse en composantes principales

Les analyses en composantes principales ont été effectuées sur les données non normalisées, mais les données inférieures à la limite de quantification ont été remplacées par des valeurs nulles car : i) cela permet de discriminer les espèces non accumultrices, ii) l'ACP ne nécessite pas de postulat sur la distribution des données iii) l'ACP n'est pas calculable pour des jeux de données incomplets.

5. Résultats et discussion

La partie « résultats et discussion » est organisée en deux chapitres qui répondent aux deux objectifs principaux de la thèse. Ces deux chapitres comportent 5 manuscrits rédigés en anglais, comme détaillé ci-dessous :

Manuscrit et statut	Référence
Chapitre 1. Étudier les modes de transfert et de stockage du Hg vers les parties aériennes de végétaux cultivés sur sols enrichis en Hg	
Manuscrit 1. Publié.	Assad M , Parelle J, Cazaux D, Gimbert F, Chalot M., Tatin-Froux F (2016) Mercury uptake into poplar leaves. <i>Chemosphere</i> , 146:1-7 (IF 2015 : 3,7).
Manuscrit 2. Publié.	Maillard F, Girardclos O, Assad M , Zappellini C, Jung L, Guyeux C, Chrétien S, Bigham G, Cosio C, Chalot M (2016) Dendrochemical assessment of mercury releases from a pond and dredged-sediment landfill impacted by a chlor-alkali plant. <i>Environmental Research</i> 148: 122-12 (IF 2015 : 3,1).
Manuscrit 3. En préparation.	Assad M , Chalot M. (----).Mercury transfer in Solanaceae species. A soumettre au journal : <i>Ecotoxicology and Environmental Safety</i> (IF 2015 : 3,1).
Chapitre 2. Mettre en évidence le transfert d'ETMs à partir de sols contaminés chez des espèces d'intérêt agronomique	
Manuscrit 4. Publié.	Assad M , Tatin-Froux F, Chalot M., Parelle J, (2017) Accumulation of trace elements in edible crops and poplar grown on a titanium ore landfill. <i>Environmental Science and Pollution Research</i> . Sous presse (IF 2015 : 2,8).
Manuscrit 5. En préparation.	Assad M , Parelle J, Chalot M., Tatin-Froux F (----) Trace metal accumulation in edible crops and poplar grown on dredged sediments. A soumettre au journal : <i>Ecotoxicology and Environmental Safety</i> (IF 2015 : 3,1).

5.1 **Chapitre 1 : Étudier les modes de **transfert** et de **stockage** du Hg vers les parties aériennes de **végétaux cultivés sur sols enrichi en Hg****

5.1.1 Préambule

Le Hg évaporé des décharges de résidus de chlore-alcali peut être stabilisé par le couvert végétal car les plantes sont considérées comme des puits nets de Hg atmosphérique par l'incorporation dans les tissus foliaires. Cependant, la plupart des études liées à l'absorption du Hg par les plantes ont considéré des plantes exposées uniquement au Hg atmosphérique, alors que dans le cas des décharges de résidus, les plantes sont potentiellement exposées au Hg présent à la fois dans le sol et l'atmosphère. De ce fait, ***nous avons émis 3 hypothèses sur le transfert du Hg vers les tissus foliaires :***

- 1) L'entrée du Hg dans la biomasse foliaire est réalisée exclusivement par absorption foliaire du Hg gazeux
- 2) L'entrée du Hg dans la biomasse foliaire est réalisée exclusivement par voie racinaire du Hg présent dans le sol, puis transféré des racines aux parties aériennes
- 3) L'entrée du Hg est une résultante des deux processus, absorptions foliaire et racinaire.

En effet, l'accumulation du Hg dans les plantes dépend de plusieurs facteurs : l'espèce végétale, l'organe et l'environnement auquel elles sont exposées. L'objectif du travail présenté dans le manuscrit 1 est d'évaluer les contributions relatives des voies racinaires et atmosphériques par la culture des boutures de peuplier (*Populus trichocarpa* X *Populus maximowiczii*) sur des substrats contrôle ou enrichi en Hg et dans des conditions d'exposition naturelle ou contrôlée.

Dans les conditions naturelles, deux dispositifs ont été établis avec ces deux types de substrat. Le premier dispositif était localisé directement dans la décharge de résidus à Tavaux où le substrat enrichi en Hg a été recueilli. Ce dispositif avait donc potentiellement une atmosphère enrichie en Hg gazeux. En revanche le deuxième dispositif, situé à Montbéliard, était soumis à une atmosphère ambiante. Les teneurs en Hg dans les feuilles en fonction de l'âge des feuilles nous ont permis d'adopter sans aucun doute la première hypothèse de la voie atmosphérique d'absorption foliaire du Hg, et de confirmer ce résultat lors d'une deuxième expérience optimisée sous conditions contrôlées en phytotron en ajoutant des fertilisants dans les deux substrats. Nos résultats ont été présentés et discutés dans le manuscrit 1, présenté ci-après.

Une fois le Hg absorbé dans les feuilles de peuplier, son devenir dans les tissus foliaires a été étudié en mesurant les différentes formes de stockage du Hg pouvant exister.

De ce fait, nous avons émis trois hypothèses, 1) un stockage du Hg sous forme méthylée/chélatée 2) une chélation du Hg aux parois cellulaires 3) un stockage du Hg sous forme inorganique. Dans le manuscrit 2, les données de dendrochimie obtenues par mesure du Hg dans les cernes, ont pu être renforcées par la mesure du Hg organique (MMHg et Hg chélaté aux protéines) dans les tissus foliaires de peuplier, que j'ai réalisé au laboratoire Chrono-Environnement et à l'Institut F.-A. FOREL (Genève).

Le Hg qui s'évapore des lagunes de stockage des résidus issus de l'activité industrielle chlore-alkali, peut potentiellement parcourir de longues distances sous forme gazeuse et impacter l'environnement et les populations aux alentours. Le risque de transfert du Hg vers les jardins urbains et les cultures agricoles voisines doit dès lors être évalué. En effet, la plupart des études liées à l'absorption du Hg par les cultures ont utilisé des légumes-feuilles, de ce fait nous avons étudié cette absorption dans le cas des légumes-fruits, principalement des Solanacées. En outre, la plupart des études antérieures reposent sur l'exposition des végétaux à la fois au sol pollué et à l'air sans déterminer la voie du transfert du Hg vers leurs biomasses aériennes. Le but de ce travail, qui fait l'objet d'un troisième manuscrit en préparation, est d'évaluer les contributions relatives des voies racinaires et atmosphériques en cultivant des légumes-fruits (poivrons, tomates, aubergines) et du tabac sur des substrats contrôlés ou enrichis en Hg (sol de la lagune de Tavaux) dans des conditions d'exposition contrôlées. J'ai ensuite estimé le risque sanitaire de l'ingestion des parties comestibles, et déterminé les formes de stockage du Hg dans l'espèce la plus accumulatrice. Nos résultats ont été discutés dans le manuscrit 3, présenté dans les pages suivantes.

5.1.2 Absorption du Hg par le peuplier

Les décharges de résidus issues des usines de chlore-alcali nécessitent une stabilisation du Hg pour empêcher la pollution de l'air par le Hg volatilisé, ce qui peut se réaliser par un couvert végétal. Les plantes sont considérées comme des puits net de Hg atmosphérique car elles l'incorporent dans leurs tissus foliaires. Cependant, la plupart des études liées à l'absorption du Hg par les plantes ont considéré des plantes exposées seulement au Hg atmosphérique, alors que dans le cas des décharges de résidus, les plantes sont potentiellement exposées à la fois au Hg racinaire et au Hg atmosphérique. Le but de ce travail est d'évaluer les contributions relatives des voies racines et des voies atmosphériques par la culture des boutures de peuplier (*Populus trichocarpa* X *Populus maximowiczii*) sur des substrats contrôles ou enrichis en Hg et dans des conditions d'exposition naturelles et contrôlées. Nous avons pu ainsi montrer que les concentrations en Hg foliaires ont considérablement augmenté avec l'âge, atteignant 120 ng g⁻¹ de masse sèche, lorsque les peupliers ont été exposés au Hg sous exposition naturelle. Remarquablement, nous n'avons pas observé de différences significatives pour les concentrations de Hg dans les feuilles de peupliers cultivés soit sur les substrats contrôles ou pollués lorsqu'ils sont cultivés ensemble dans une chambre de croissance. Cet ensemble de données nous a amené à conclure que l'entrée du Hg dans les feuilles de peuplier se réalise exclusivement par voie atmosphérique. Nos résultats sont discutés en regard de la littérature existante.

Manuscrit 1 : Je suis en 1^{er} auteur dans cet article publié, j'ai réalisé les principales étapes de ce travail : mise en place des dispositifs expérimentaux, suivi des expériences de la plantation à la récolte, analyse du Hg dans les différents compartiments (sol, feuille, racine), traitement statistique des données obtenues, rédaction de l'article, en collaboration avec mes co-auteurs.

Manuscrit et statut	Référence
Chapitre 1. Étudier les modes de transfert et de stockage du Hg vers les parties aériennes de végétaux cultivés sur sols enrichis en Hg	
Manuscrit 1. Publié.	Assad M, Parelle J, Cazaux D, Gimbert F, Chalot M., Tatin-Froux F (2016) Mercury uptake into poplar leaves. <i>Chemosphere</i> , 146:1-7 (IF 2015 : 3,7).



Mercury uptake into poplar leaves



Mohamad Assad^a, Julien Parelle^b, David Cazaux^c, Frédéric Gimbert^b, Michel Chalot^{a,d}, Fabienne Tatin-Froux^{b,*}

^a Laboratoire Chrono-Environnement, UMR CNRS 6249, Université de Bourgogne Franche-Comté, Pôle Universitaire du Pays de Montbéliard, 4 Place Tharradin, BP 71427, 25211 Montbéliard, France

^b Laboratoire Chrono-Environnement, UMR CNRS 6249, Université de Bourgogne Franche-Comté, 16 Route de Gray, Besançon Cedex, 25030 France

^c Solvay Electrolyse France, Tavaux Cedex, 39500 France

^d Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, Vandoeuvre-les-Nancy, 54506 France

HIGHLIGHTS

- Poplar cuttings were grown on Hg-contaminated or control substrates.
- The experimental design allowed discrimination between root and leaf uptake.
- Mercury accumulation is dependent on leaf age.
- Uptake of Hg by poplar occurs exclusively through the atmospheric pathway.
- Experimental factors affecting Hg accumulation pathway in plant leaves are reviewed.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 April 2015

Received in revised form

17 November 2015

Accepted 26 November 2015

Available online 14 December 2015

Handling Editor: X. Cao

Keywords:

Poplar

Mercury

Leaf age

Leaf Hg concentration

Field experiment

ABSTRACT

Tailings dumps require mercury stabilization to prevent air pollution by evaporated mercury, which can be achieved through plant covers. Plants are considered a net sink for atmospheric Hg via incorporation into leaf tissues. However, most studies related to Hg uptake by plants have considered plants exposed to only atmospheric Hg, whereas in the case of tailings dumps, plants are potentially exposed to both soil and atmospheric Hg. The goal of this work is to evaluate the relative contributions of root and atmospheric pathways by growing poplar (*Populus trichocarpa* X *Populus maximowiczii*/var Skado) cuttings on either control or polluted substrates and under either natural or controlled exposure conditions. We showed that foliar Hg concentrations significantly increased with age, reaching 120 ng g⁻¹ dry mass when poplars were exposed to Hg-contaminated substrate under natural exposure. Remarkably, we did not observe significantly different Hg concentrations in poplar leaves grown on either the control or polluted substrates when cultivated together in growth chambers. Our set of data prompted us to conclude that Hg entry into poplar leaves is exclusively through an atmospheric pathway. Our results are discussed in line with existing literature.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

It is estimated that more than 300 million tons of mining and quarrying waste is generated annually in the European Union according to a reference document elaborated by the European Commission (European Commission, 2009) as a follow-up to the tailings dam bursts that occurred at Baia Mare in Romania and

Aznalcóllar in Spain. After the dams were abandoned, these large dumps that store industrial tailings can generate significant unvegetated surfaces, which suggests biologically unfertile areas. Chlor-alkali industries have generated mercury-contaminated wastes (Xu et al., 2015) and sludge during the past half-century, where mercury-contaminated wastes have been excavated from sewage sludge sediments and then stocked in licensed tailings dumps. Such tailings dumps are equipped with an impermeable membrane to prevent transfer of mercury by lixiviation to the environment (see Mukherjee et al., 2004 for a review). The global biogeochemical cycle of Hg is dynamic and complex because Hg can be readily

* Corresponding author.

E-mail address: fabienne.tatin-froux@univ-fcomte.fr (F. Tatin-Froux).

transported through the atmosphere and cycle through terrestrial and aquatic ecosystems. Elemental gaseous mercury (Hg^0) is the principal form of mercury in the atmosphere, where Hg^0 is extremely volatile and can be oxidized photochemically to mercuric ion (Hg^{2+}) and methylated by microorganisms (Bacci et al., 1994; Guimarães et al., 1998). Hg evaporates easily as Hg^0 species due to its low boiling point (357°C at atmospheric pressure, Mukherjee et al., 2004). Soil gaseous mercury depends on the organic matter content, redox potential, and temperature (Moore and Castro, 2012). Moreover, recent studies showed a daytime Hg^0 emission and a night-time deposition linked to the photochemical cycle and evasion from litter fall (Obrist et al., 2014). A recent paper summarized the natural and anthropogenic sources that have contributed to the increase of Hg concentration in soil and reviews major remediation techniques and their applications to control soil Hg contamination (Xu et al., 2015).

Tailings dumps require mercury stabilization to prevent air pollution by evaporated mercury (Lee and Lee, 2012). A spontaneous recolonization by endogenous plant species is often observed after sediment deposition has ceased, which may impact the local cycling of mercury. Stamenkovic and Gustin (2009) showed that plants are considered as a net sink and that atmospheric mercury is incorporated into the leaf tissue. On the basis of their work, we hypothesized that the plant cover offered by a poplar plantation would intercept part of the volatile mercury, which has been observed for other metals/tree combination (Fantozzi et al., 2013). The use of an aided revegetation strategy would therefore be an appropriate and cost effective method to stabilize the mercury and prevent putative outputs to the local environment and threats to local populations. Molina et al. (2006) hypothesized that variations in Hg uptake by a vegetation cover depend on a large number of factors, including the Hg contents in the soil and atmosphere, plant species, organs, and season. However, results on uptake pathways into plant biomass are also unclear because the data reported in the literature have been obtained from various and mostly artificial exposure conditions using different Hg levels and various plant species.

In the present study, we combined field and laboratory approaches to determine Hg uptake pathways in leaves of *Populus trichocarpa* X *Populus maximowiczii*/var Skado. More precisely, the goal of this work is to evaluate the relative contributions of root and atmospheric pathways by growing poplar cuttings either on control or polluted substrates, which thus emphasizes natural rather than artificial exposure. The age-related accumulation patterns and possible Hg uptake pathways are discussed in detail and compared with the scientific literature, which takes into account the source of variations of the conclusions.

2. Materials and methods

2.1. Site description

The polluted site was a tailings dump located at Saint Symphorien-sur-Saône in the Bourgogne region in France (lat. $47^\circ 5' 5.985''$ N – long. $5^\circ 19' 44.0322''$ E), which has a total surface of 12 ha. The region is characterized by an annual average temperature of 11°C and 75% moisture. From the 1950's to 2003, this site was exploited as a storage area for sediments from the adjacent sedimentation basin. These sediments originated from effluents produced during electrolytic processes based on an Hg cell chlor-alkali process used to produce chlorine until 2012. The tailings dump was confined by 5-m high dikes to preserve the surrounding environment and is composed of a multi-contaminated calcareous and alkaline anthropogenic soil (Zappellini et al., 2015). The control site was located at Montbéliard-France (lat. $47^\circ 29' 42.9''$ N – long. $6^\circ 48' 9.684''$ E), distant from the polluted site of 140 km.

2.2. Field experiment

Cuttings of *Populus trichocarpa* x *Populus maximowiczii*/var Skado were planted in May 2013 in 4-L pots either in control or in polluted substrates (Fig. 1a). The polluted substrate was collected from the polluted site after discarding the roots and surface vegetation cover and after homogenization of the first 20-cm layer. The control substrate was made of a loam (Brill substrate GmbH, Georgsdorf, Germany) and sand mixture (50:50, v:v). Substrate sub-samples were collected and freeze-dried to determine the Hg initial concentrations (T_0). Poplar pots were left for various lengths of time, i.e., 66 days at the polluted site and 142 days at the control site. Pots were left for a longer period at the control site to reach detectable levels of Hg in the leaves. A leaf age of one day was defined when a leaf has a foliar index equal to three (corresponding to expanded leaf), as defined by Larson and Isebrands (1971). Leaf ages are provided in the result section.

2.3. Growth chamber experiments

For the second set of sequential experiments, poplar Skado cuttings were planted in 3-L pots either in control or in polluted substrates (Fig. 1b) and incubated in a growth chamber. The first experiment began in March 2014, which consisted of growing poplar cuttings in control substrates, as detailed above except that 9 g of osmocote fertilizer (N/P/K 11/11/18, osmocote exact, Heerlen, Netherlands) was added to each pot at the beginning of the experiment. Poplar cuttings were grown for 45 days, and the second experiment began immediately after in April 2014, which consisted of growing poplar Skado cuttings in either control or polluted substrates, as described above. Polluted and control pots were mixed in the growth chamber as detailed in Fig. 1b. Poplar cuttings were grown for 46 days. Climatic conditions for the growth chamber experiments were as follows: day illumination duration of 16 h; night time of 8 h; day temperature of 22°C ; night temperature of 18°C ; day and night humidity of 60%; and day illumination intensity of 100% with a photon flux density of $250\text{--}300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Two to three leaves representative of different ages were sampled on each plant as described above. The Hg content of the growth chamber experiments were estimated using coal trap at the end of the experiments and found to be $2.190 \pm 0.356 \text{ ng m}^{-3}$ and $8.775 \pm 0.764 \text{ ng m}^{-3}$ for control and polluted chambers, respectively.

2.4. Hg analysis in substrate and biomass

The extraction of Hg from Hg-contaminated substrates was performed in a 0.5-g aliquot of each substrate sample via mineralization with 2 mL HNO_3 and 5 mL HCl in closed tubes placed in a block digestion system (DigiPREP, SCP Sciences, Courtaboeuf, France). A gradual heating mode was used to achieve a final temperature of 100°C (total run of 265 min). Then, ultrapure water (Millipore Milli-Q Integral 3 system, Molsheim, France) was added to a final volume of 50 mL. Finally, a filtration to $1 \mu\text{m}$ was performed. Hg concentrations were determined using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES, Radial ICAP 6500 Model, Thermo Fischer Scientific, Courtaboeuf, France), and all samples were analysed in triplicate and performed together with a certified reference material (loamy clay soil, CRM052, LGC Promochem, Molsheim, France, $2.40 \pm 0.125 \mu\text{g g}^{-1}$ dry mass, average recovery: 99%). The detection limit was 132 ng g^{-1} dry mass. The control substrates and freeze-dried leaves were analysed after milling using an advanced mercury analyser (AMA 254, Courtage Analyses Services, Mont Saint Aignan, France), and all samples were performed together with a certified reference

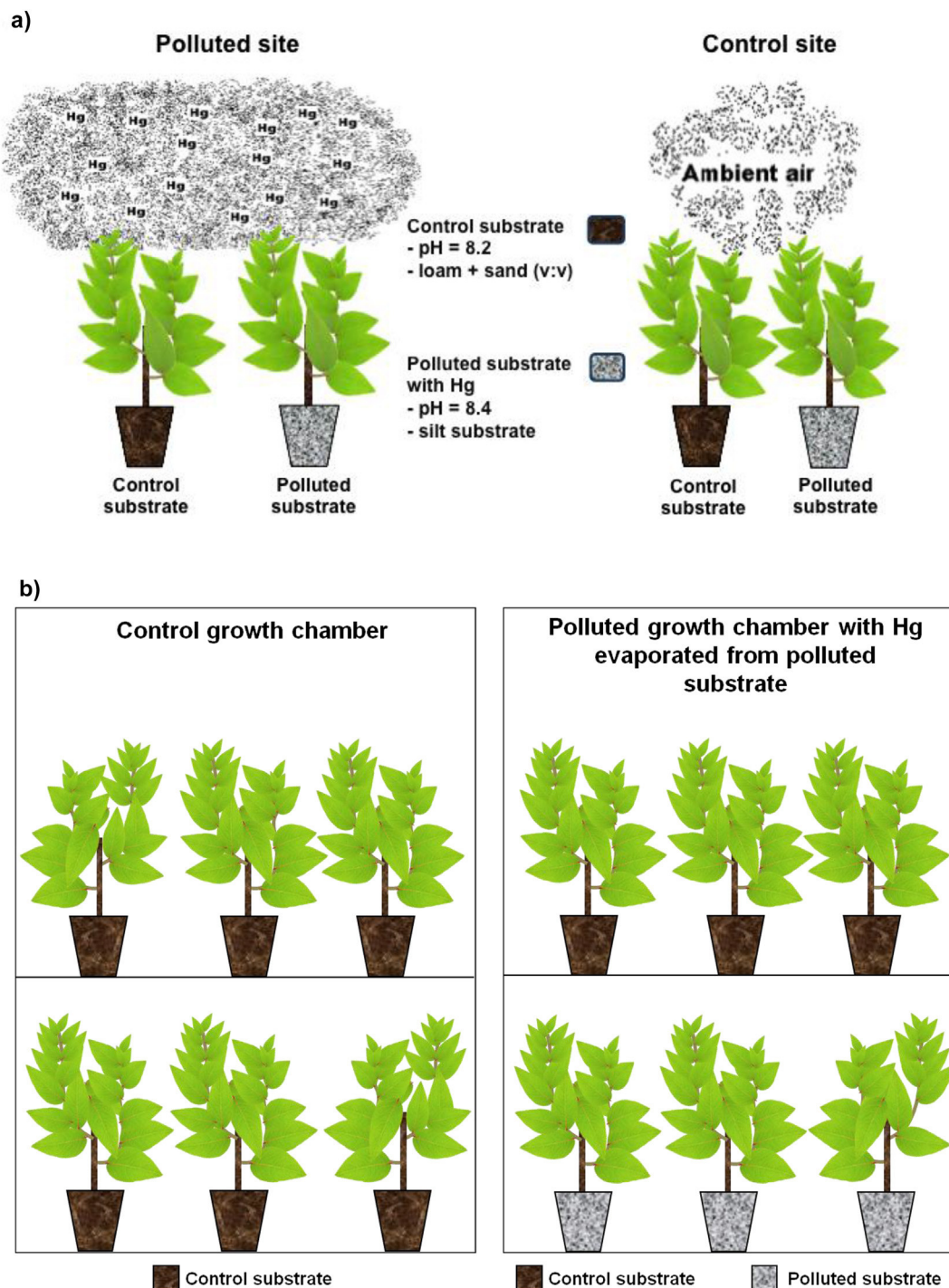


Fig. 1. Schematic representation of the experimental design. a) In the first experiment, Poplar cv Skado cuttings were planted in 3-L pots containing either in a control substrate or polluted substrate and either at the atmospheric control site (right panel) or atmospheric polluted site (left panel). b) In the second experiment, poplar cuttings were planted in either the control substrate or polluted substrate and in a growth chamber.

material (oriental basma tobacco leaves, INCT-OBTL-5, LGC Prochem, Molsheim, France, $20.9 \pm 1.3 \text{ ng g}^{-1}$ dry mass). The detection limit was 0.145 ng g^{-1} .

2.5. Chlorophyll analysis

The chlorophyll content index was estimated from three measurements on each sampled leaf using a chlorophyll content meter (Opti-Sciences, Inc., Hudson, USA). Sampled leaves were washed

with distilled water, stored at -20°C , and then freeze-dried before Hg analysis. Substrate subsamples were collected from each individual pot and dried at room temperature before the final substrate Hg content measurement (T_f).

2.6. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R 2.15.0 software (R Core Team, 2013). All test were considered significant when

$P < 0.05$. For the field experiment, significant differences of the Hg content among the sites, substrate types, and leaf ages were tested according to the following linear model followed by a type I – ANOVA:

- For field experiment: $H_{ij} = \mu + A_i + S_j + L_k + \epsilon_{ijk}$, where H_{ij} is the observed value of the Hg content, μ is the overall mean, A_i is the fixed effect of atmospheric site i , S_j is the fixed effect of substrate type j , L_k is the fixed effect of leaf age k , and ϵ_{ijk} is the error term. To respect the postulates of ANOVA, the Hg content was log transformed. Because all terms of the model were significant, a Tukey–Kramer mean comparison test was performed among all parameters.
- For the growth chamber experiment: $H_{ik} = \mu + A_i + L_k + \epsilon_{ik}$, where H_{ik} is the observed value of the Hg content, μ is the overall mean, A_i is the fixed effect of atmospheric chamber i , L_k is fixed effect of leaf age k , and ϵ_{ik} is the error term. To respect the postulates of ANOVA, the Hg content was log transformed.

3. Results and discussion

3.1. Hg concentrations and poplar leaf Hg accumulation in a field experiment

Hg concentrations were measured in poplar leaves grown in pots on either control or polluted substrates at either the polluted site or control site. At both sites, for the polluted and control substrates, foliar Hg concentrations significantly increased with age (Fig. 2). Our data demonstrated that the actual age of a leaf greatly influenced the observed foliar Hg concentrations, which has already been demonstrated for the deciduous species *Robinia pseudoacacia* (Millhollen et al., 2006a,b). In a recent study, Laacouri et al. (2013) monitored Hg concentrations in leaves of 6 deciduous species from emergence to senescence and showed a strong positive correlation with leaf age. However, in this study, the objective was only to record Hg concentrations in woody tissues under atmospheric exposure in an urban environment and thus, was not linked to soil Hg contamination. Similarly, Ericksen et al. (2003) and Frescholtz et al. (2003) used mesocosms and Hg-enriched soils and found that foliar Hg concentrations in poplar leaves increased as a function of leaf age and levelled off after 2–3 months at

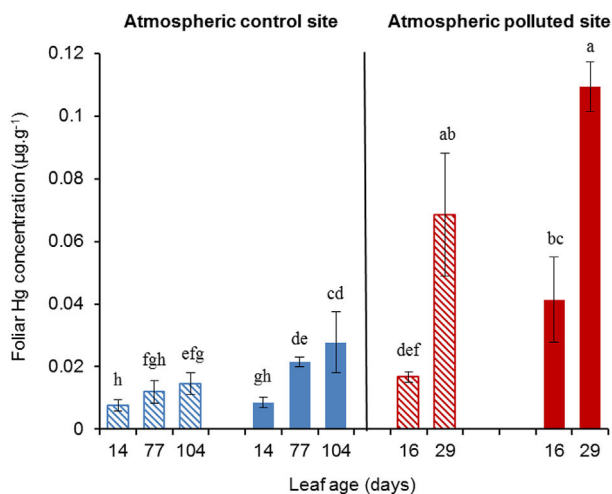


Fig. 2. Foliar Hg concentration in the field experiment as a function of leaf age, substrate pollution, and atmospheric environment. Concentrations were recorded during 104 days at the atmospheric control site (left) and during 29 days at the atmospheric polluted site (right). Dashed bars: control substrate, closed bars: polluted substrate. Bars indicate means \pm standard deviation ($n = 5$) of Hg concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry mass). Significant differences ($p < 0.05$) are indicated through lettering.

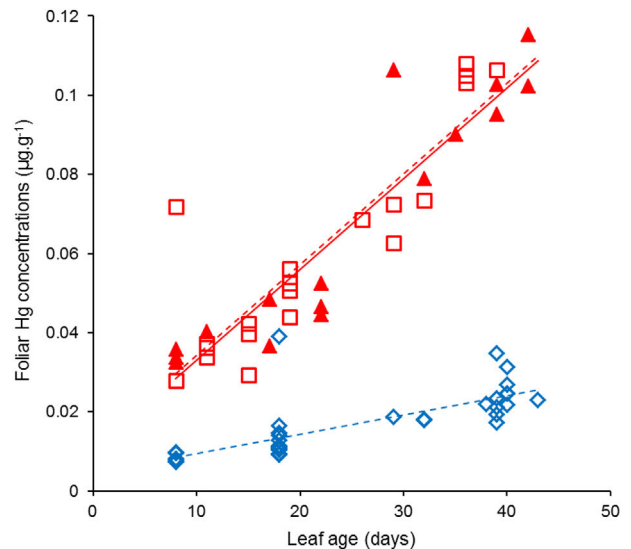


Fig. 3. Line regression for foliar Hg accumulation in leaves of poplar exposed to Hg. In the first experiment, Poplar cv Skado cuttings were planted in 3-L pots containing control substrate and grown for 45 days (\diamond , $[\text{Hg}] = 0.0005 \text{ Leaf age} + 0.0046$, dotted blue line, total of 35 samples). In the second experiment, poplar cuttings were planted in either the control substrate (\square , $[\text{Hg}] = 0.0023 \text{ Leaf age} + 0.0114$, dotted red line, total of 20 samples) or polluted substrate (\blacktriangle , $[\text{Hg}] = 0.0023 \text{ Leaf age} + 0.0099$, full red line, total of 16 samples) and left to grow for 46 days. Polluted and control pots were mixed in the same growth chamber as schematized in Fig. 1b.

approximately 150 ng g^{-1} dry mass. The only case study where a negative effect on leaf age was reported (Dunagan et al., 2007, Table 1) was based on relatively high Hg soil contaminations (naturally or artificially) that may have greatly impacted the tree physiology.

When grown at the control site, Hg concentrations were in the range of $10\text{--}30 \text{ ng g}^{-1}$ dry mass but reached 120 ng g^{-1} dry mass at the polluted site. Poplar Hg concentrations were on the same order of magnitude than those measured in situ in other woody species, ranging from 6 to 120 ng g^{-1} dry mass (Millhollen et al., 2006a,b; Laacouri et al., 2013; Ericksen et al., 2003); however, plant exposure conditions in the referenced studies differed significantly from our experiment (Table 1). At the polluted site, Hg accumulation in poplar leaves occurred significantly faster in the polluted pots ($5.2 \text{ ng g}^{-1} \text{ dry mass day}^{-1}$) than that of the control pots ($4.0 \text{ ng g}^{-1} \text{ dry mass day}^{-1}$). Hg accumulation at the control site was significantly slower than at the polluted site for both substrates, with 0.2 and $0.07 \text{ ng g}^{-1} \text{ dry mass day}^{-1}$ for the polluted and control substrates, respectively. The measured chlorophyll content was significantly higher for poplar leaves from the polluted substrate than from the control substrate at both the control and polluted sites (Table 2). In this first set of experiments, we did not add fertilizers to the substrates and therefore, hypothesized that the physiological status of the plant may have greatly influenced Hg entry into the leaf, where a lower chlorophyll content suggests a lower photosynthesis activity. Millhollen et al. (2006a,b) indeed demonstrated that foliar Hg concentrations were related to atmospheric CO_2 concentrations and hence, to stomatal closure. This interpretation prompted us to add fertilizers to the second set of experiments performed in growth chambers, as described in the material and method section.

3.2. Hg concentrations and poplar leaf Hg accumulation in the growth chamber experiment

Hg concentrations were measured in poplar leaves grown in pots on either the control or polluted substrates in growth

Table 1
Overview of Hg entry pathways into plant biomass as influenced by plant species, local environment, and experimental conditions.

	Experimental conditions	Species	Hg concentrations			Exposure time	Hg origin	Leaf age effect	References
			Soil ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Air (ng m^{-3})	Leaf ($\mu\text{g g}^{-1}$)				
Foliar path	Close system growth chamber	Populus tremuloides	0.03–12.3	2.4–30.4	data not shown	not tested	mine tailings and Hg0 vapor	2 days	Ericksen and Gustin 2004
		Juniperus scopulorum, Pinus ponderosa, Robinia pseudoacacia	0.09 and 0.92		0.13	no effect	HgCl2 to natural soil	4 months	Millhollen et al., 2006a
		Robinia pseudoacacia			0.25 to 0.4	age effect		4 months	Millhollen et al., 2006a
		Chamaecrista nictitans, Sorghastrum nutans, Andropogon gerardii	0.01 and 0.15	3.7 and 10	maximum of 0.1	not tested	HgCl2	29 weeks	Millhollen et al., 2006b
	Open top chamber	Populus tremuloides	12.3	10–50	data not shown	not tested	mill tailing	5-6 months	Gustin Ericksen et al., 2004
	Natural conditions	Pinus resinosa Ait.	0.06 to 0.1	no data	0.028 to 0.017	positive effect	atmospheric and precipitation inputs	2 months	Fleck et al., 1999
		Picea abies	data not shown	no data	data not shown	not tested		–	Bishop et al., 1998
		Pinus sylvestris	(flux measurements)	no data	0.003–0.041	positive effects		from emerging to senescing	Laacouri et al., 2013
	Growth chamber and natural conditions	Ulmus americana, Acer saccharum, Quercus rubra, Larix laricina, Aesulus hippocastanum	no data	no data			atmospheric and precipitation inputs		
		Populus trichocarpa X Populus maximowiczii/var Skado	0.014 to 5.03	no data	0.12	positive effects	industrial contamination	104 days	this study
Foliar and xylem path	Close system growth chamber	Populus tremuloides	0.01, 6.2 and 25.6	1.4, 14.9 and 68.5	from 0.06 to 0.4	positive effects	mill tailings	16 weeks	Frescholtz et al., 2003
		Brassica rapa P.	0.09 to 39.4	no data	0.17 to 4.0	negative effect	HgCl2 industrial contamination	53 days	Dunagan et al., 2007
	Brassica rapa P.	120	no data	0.19 to 1.1	negative effect	53 days		Dunagan et al., 2007	
	Hydroponic system	Salix viminalis x schwerinii clone Bjorn	200 $\mu\text{g L}^{-1}$	1.5	0.7	not tested	HgCl2 to nutrient media	4 days	Greger et al., 2005
	Open top chambers	Zea mays L.	0.025 to 0.552	2 to 50	0.2 to 0.7	not tested	HgCl2	one growing season	Niu et al., 2011
	Natural conditions	Northern mixed-hardwood forests	maximum of 0.21	0.007	from 0,0035 in bud break to 0,04 in litterfall	positive effect	no description	one growing season	Rea et al., 2002
Xylem path	Hydroponic system	Olive trees	maximum of 100	no data	0 to 6	positive effect	mill tailings	two growing seasons	Higueras et al., 2012, 2015
		Rosmarinus officinalis L.	0.008	from 7 to 10	0.008	not tested	city emission		Niu et al., 2011
	Natural conditions	Lupinus albus	0.5–10 μM	no data	0–3000	positive effect	HgCl2	1-4 weeks	Rea et al., 2002

Table 2
Chlorophyll content index (arbitrary units, means \pm standard deviation) for different leaf ages in either the field or growth chamber experiments. Significant changes between the control and polluted treatments ($p < 0.05$) are indicated through lettering.

Experiment		Leaf age (days)	n	Chlorophyll content index	
				Control substrate	Polluted substrate
Field experiment	Control site	77	5	10.0 \pm 1.2 a	32.8 \pm 14.1 b
		104	5	8.1 \pm 1.8 a	26.4 \pm 14.3 b
	Polluted site	16	5	7.0 \pm 2.3 a	12.9 \pm 3.5 a
		29	5	15.5 \pm 5.2 a	26.6 \pm 9.6 b
Growth chamber experiments	Polluted chamber	36–38	5–6	22.1 \pm 4.3 a	24.4 \pm 2.56 a
	Control chamber	40	12	32.8 \pm 6.33 b	–

chambers (Fig. 3). We first grew poplars on the control substrate at ambient atmosphere. Hg concentrations in poplar leaves reached a maximum of 34 ng g⁻¹ dry mass at the end of the incubation period with a significant accumulation of 0.5 ng g⁻¹ dry mass day⁻¹. We hypothesize that the control poplars were able to capture and accumulate a low level of Hg from the atmosphere. We then grew poplars on either the control substrate or polluted substrate in a single growth chamber. Remarkably, we did not observe significantly different Hg concentrations in poplar leaves grown on either the control or polluted substrate under these conditions. Hg concentrations in poplar leaves reached 110–120 ng g⁻¹ dry mass at the end of the incubation period with a significant accumulation of 2.3 ng g⁻¹ dry mass day⁻¹ for each substrate type. We confirmed the age effect as discussed above (Fig. 2). Hg concentrations measured in the control or polluted substrates at the beginning (T₀) and at the end (T_f) of the experiment were not significantly different (Table 3), which indicates that no massive evaporation related to temperature, microbial activity, or substrate moisture had occurred. We also measured Hg in the roots from poplar grown in control substrates and found a value of 15 \pm 4 ng g⁻¹ dry mass for the Hg atmospheric exposed growth chamber, which is not significantly different from the 11 \pm 1 ng g⁻¹ dry mass found for the control growth chambers.

In this growth chamber experiment, we observed that the chlorophyll content was not significantly different for poplar leaves from polluted substrate than for that from the control substrate for both control and polluted sites (Table 2). The addition of fertilizers together with growth in controlled environments indeed suppressed the difference in chlorophyll content and hence, in the physiological status of the leaves.

3.3. Hg uptake pathways

In both our natural exposure and growth chamber experiments, Hg concentrations of control substrates were in the same order of magnitude as those described elsewhere (Kabata-Pendias, 2011; Marschner, 2012). Hg concentrations of polluted substrates were several orders of magnitude greater than those measured in control substrates (Table 3). Despite this, Hg concentrations in leaves were found to be on the same order of magnitude, which suggest that Hg concentrations in leaves were not related to Hg substrate

concentrations. From the second set of experiments, we indeed calculated that the atmospheric environment explained 69% of the total observed variability of the Hg content, whereas the age explained 23%; the treatment (polluted substrate versus control substrate) was not significant with a residual of 8%. The entire set of data prompted us to conclude that Hg entry into poplar leaves was exclusively through the atmospheric pathway when grown on non-mixed substrate from contaminated substrate. Compared to the existing literature (Table 1), our data were obtained from poplar exposed to naturally Hg enriched soils.

In this study, a conclusive demonstration is presented of Hg entry in plants through the root via the xylem pathway, which mostly relied on experiments using HgCl₂ as the source of Hg (Table 1) either in hydroponic systems (Esteban et al., 2008) or in HgCl₂ enriched soils (Millhollen et al., 2006a,b). For hydroponic conditions, it is well documented that the apoplastic barrier is less restrictive than in roots growing in soils (e.g., Redjala et al., 2011). Moreover, high HgCl₂ concentrations were shown to be cytotoxic, which induces membrane leaking (review in Javot and Maurel, 2002). These conditions facilitate Hg radial transfer to xylem cells in roots and then to leaves by xylem sap.

Ericksen et al. (2003), Gustin Ericksen et al., 2004 concluded that Hg entry into poplar leaves was achieved primarily through the atmospheric pathway; however, their data were obtained from experiments in controlled conditions in soil amended with mine tailings and thoroughly mixed to produce desired soil Hg concentrations. Laacouri et al. (2013) reached similar conclusions by showing correlations between stomata density and foliar Hg on a large range of mature deciduous trees exposed to Hg that only originated from the atmosphere. Measuring Hg in various compartments (forest floor, mineral soil, pine wood, and needles), Fleck et al. (1999) interpreted their data as indicating that Hg in plant tissue was derived directly from the atmosphere and not from the soil. However, Hg soil concentrations in their studies were 2–3 orders of magnitude lower than our substrate Hg concentrations. Our data validate these conclusions, though in a natural context with high substrate Hg contamination. However, this conclusion must be taken with caution as our data may not reflect a general situation for any plant–soil combination. Finally, our data suggest that poplar leaves may be a pertinent indicator of Hg contamination in the atmosphere for any Hg content in soil.

Table 3
Initial and final Hg concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry mass, mean \pm standard deviation) in substrate for the field and growth chamber experiments. The number of replicates is indicated in brackets; significant differences ($p < 0.05$) are indicated through lettering.

Experiment		Initial Hg concentration (t ₀)	Final Hg concentration (t _f)	
			Control atmosphere	Polluted atmosphere
Field experiment	Control substrate	0.017 \pm 0.003 (3) a	0.017 \pm 0.003 (5) a	0.014 \pm 0.002 (5) a
	Polluted substrate	4.77 \pm 0.123 (3) b	3.93 \pm 0.628 (5) c	5.03 \pm 0.583 (5) b
Growth chamber experiments	Control substrate	0.011 \pm 0.001 (4) a	0.014 \pm 0.001 (16) a	0.013 \pm 0.002 (8) a
	Polluted substrate	4.25 \pm 0.366 (4) b	–	3.865 \pm 0.286 (8) b

Acknowledgements

This work was supported by the France–Canada ANR–NSERC joint Research Programme (grants: no. ANR BIOFILTREE 2010–INTB–1703–01 to M.C.) and by ADEME (grant: PROLIPHYT no. 1172C0053). Mohamad Assad Ph–D grant was supported by the ministry of higher education of the Syrian Arab Republic. Financial supports from Région Franche-Comté and from Pays de Montbéliard Agglomération to M.C. are acknowledged. We thank Nadia Crini from the environmental and chemical analyses platform (Université de Bourgogne Franche Comté) for her technical assistance.

References

- Bacci, E., Gaggi, C., Duccini, M., Bargagli, R., Renzoni, A., 1994. Mapping mercury vapours in an abandoned cinnabar mining area by azalea (*Azalea indica*) leaf trapping. *Chemosphere* 29, 641–656. [http://dx.doi.org/10.1016/0045-6535\(94\)90036-1](http://dx.doi.org/10.1016/0045-6535(94)90036-1).
- Bishop, K.H., Lee, Y.-H., Munthe, J., Dambrine, E., 1998. Xylem sap as a pathway for total mercury and methylmercury transport from soils to tree canopy in the boreal forest. *Biogeochemistry* 40, 101–113. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1005983932240>.
- Dunagan, S.C., Gilmore, M.S., Verekamp, J.C., 2007. Effects of mercury on visible/near-infrared reflectance spectra of mustard spinach plants (*Brassica rapa* P.). *Environ. Pollut.* 148, 301–311. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2006.10.023>.
- Ericksen, J.A., Gustin, M.S., 2004. Foliar exchange of mercury as a function of soil and air mercury concentrations. *Sci. Total Environ.* 324, 271–279. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.10.034>.
- Ericksen, J.A., Gustin, M.S., Schorran, D.E., Johnson, D.W., Lindberg, S.E., Coleman, J.S., 2003. Accumulation of atmospheric mercury in forest foliage. *Atmos. Environ.* 37, 1613–1622. [http://dx.doi.org/10.1016/S1352-2310\(03\)00008-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1352-2310(03)00008-6).
- Esteban, E., Moreno, E., Peñalosa, J., Cabrero, J.I., Millán, R., Zornoza, P., 2008. Short and long-term uptake of Hg in white lupin plants: kinetics and stress indicators. *Environ. Exp. Bot.* 62, 316–322. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.10.006>.
- European Commission, 2009. Reference Document on Best Available Techniques for Management of Tailings and Waste-rock in Mining Activities.
- Fantozzi, F., Monaci, F., Blanus, T., Bargagli, R., 2013. Holm oak (*Quercus ilex* L.) canopy as interceptor of airborne trace elements and their accumulation in the litter and topsoil. *Environ. Pollut. Sel. Pap. Urban Environ. Pollut.* 2012 (183), 89–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2012.11.037>.
- Fleck, J.A., Grigal, D.F., Nater, E.A., 1999. Mercury uptake by trees: an observational experiment. *Water. Air. Soil Pollut.* 115, 513–523. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1005194608598>.
- Frescholtz, T.E., Gustin, M.S., Schorran, D.E., Fernandez, G.C.J., 2003. Assessing the source of mercury in foliar tissue of quaking aspen. *Environ. Toxicol. Chem. SETAC* 22, 2114–2119.
- Greger, M., Wang, Y., Neuschütz, C., 2005. Absence of Hg transpiration by shoot after Hg uptake by roots of six terrestrial plant species. *Environ. Pollut.* 134, 201–208. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2004.08.007>.
- Guimarães, J.R.D., Meili, M., Malm, O., Maria de Souza Brito, E., 1998. Hg methylation in sediments and floating meadows of a tropical lake in the pantanal floodplain. *Braz. Sci. Total Environ.* 213, 165–175. [http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00089-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00089-8).
- Gustin Ericksen, J.A., Schorran, D.E., Johnson, D.W., Lindberg, S.E., Coleman, J.S., 2004. Application of controlled mesocosms for understanding mercury air–soil–plant exchange. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6044–6050.
- Higuera, P., Amorós, J.A., Esbrí, J.M., García-Navarro, F.J., Pérez de los Reyes, C., Moreno, G., 2012. Time and space variations in mercury and other trace element contents in olive tree leaves from the Almadén Hg-mining district. *J. Geochem. Explor.* 123, 143–151.
- Higuera, P., Amorós, J.A., Esbrí, J.M., Pérez-de-los-Reyes, C., Lopez-Berdonces, M.A., García-Navarro, F.J., 2015. Mercury transfer from soil to olive trees. A comparison of three different contaminated sites. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1–7. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-015-4357-2>.
- Javot, H., Maurel, C., 2002. The role of aquaporins in root water uptake. *Ann. Bot.* 90, 301–313. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcf199>.
- Kabata-Pendias, A., 2011. *Trace Elements in Soils and Plants*, fourth ed. CRC Press, BocaRaton, USA, p. 505.
- Laacouri, A., Nater, E.A., Kolka, R.K., 2013. Distribution and uptake dynamics of mercury in leaves of common deciduous tree species in Minnesota, USA. *Environ. Sci. Technol.* 47, 10462–10470. <http://dx.doi.org/10.1021/es401357z>.
- Larson, P.R., Isebrands, J.G., 1971. The plastochron Index as applied to developmental studies of cottonwood. *Can. J. For. Res.* 1, 1–11. <http://dx.doi.org/10.1139/x71-001>.
- Lee, K.J., Lee, T.G., 2012. A review of international trends in mercury management and available options for permanent or long-term mercury storage. *J. Hazard. Mater.* 241–242, 1–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.09.025>.
- Marschner, P., 2012. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, third ed. Elsevier, Germany.
- Millhollen, A.G., Gustin, M.S., Obrist, D., 2006a. Foliar mercury accumulation and exchange for three tree species. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6001–6006. <http://dx.doi.org/10.1021/es0609194>.
- Millhollen, A.G., Obrist, D., Gustin, M.S., 2006b. Mercury accumulation in grass and forb species as a function of atmospheric carbon dioxide concentrations and mercury exposures in air and soil. *Chemosphere* 65, 889–897. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.008>.
- Molina, J.A., Oyarzun, R., Esbrí, J.M., Higuera, P., 2006. Mercury accumulation in soils and plants in the Almadén mining district, Spain: one of the most contaminated sites on Earth. *Environ. Geochem. Health* 28, 487–498. <http://dx.doi.org/10.1007/s10653-006-9058-9>.
- Moore, C.W., Castro, M.S., 2012. Investigation of factors affecting gaseous mercury concentrations in soils. *Sci. Total Environ.* 419, 136–143. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.12.068>.
- Mukherjee, A.B., Zevenhoven, R., Brodersen, J., Hylander, L.D., Bhattacharya, P., 2004. Mercury in waste in the European Union: sources, disposal methods and risks. *Resour. Conserv. Recycl.* 42, 155–182. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resconrec.2004.02.009>.
- Niu, Z., Zhang, X., Wang, Z., Ci, Z., 2011. Field controlled experiments of mercury accumulation in crops from air and soil. *Environ. Pollut.* 159, 2684–2689. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2011.05.029>.
- Obrist, D., Pokharel, A.K., Moore, C., 2014. Vertical profile measurements of soil air suggest immobilization of gaseous elemental mercury in mineral soil. *Environ. Sci. Technol.* 48, 2242–2252. <http://dx.doi.org/10.1021/es4048297>.
- R Core Team, 2013. R: a Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Rea, A.W., Lindberg, S.E., Scherbatskoy, T., Keeler, G.J., 2002. Mercury accumulation in foliage over time in two northern mixed-hardwood forests. *Water. Air. Soil Pollut.* 133, 49–67. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1012919731598>.
- Redjala, T., Zelko, I., Sterckeman, T., Legué, V., Lux, A., 2011. Relationship between root structure and root cadmium uptake in maize. *Environ. Exp. Bot.* 71, 241–248. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.12.010>.
- Stamenkovic, J., Gustin, M.S., 2009. Nonstomatal versus stomatal uptake of atmospheric mercury. *Environ. Sci. Technol.* 43, 1361–1372.
- Xu, J., Bravo, A.G., Lagerkvist, A., Bertilsson, S., Sjöblom, R., Kumpiene, J., 2015. Sources and remediation techniques for mercury contaminated soil. *Environ. Int.* 74, 42–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2014.09.007>.
- Zappalini, C., Karimi, K., Foulon, J., Lacerat-Didier, L., Maillard, F., Valot, B., Blaudez, D., Cazaux, D., Gilbert, D., Yergeau, E., Greer, C., Chalot, M., 2015. Diversity and complexity of microbial communities from a chlor-alkali tailings dump. *Soil Biol. Biochem.* 90, 101–110. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.08.008>.

5.1.3 Evaluation dendrochimique de l'émission de Hg sur un site industriel chlore-alcali

Bien que les émissions actuelles de Hg provenant des activités industrielles puissent être surveillées avec précision, les preuves de rejets historiques dans l'atmosphère doivent reposer sur un ou plusieurs indices environnementaux. Nous avons utilisé les concentrations de Hg dans des cernes recueillis à partir de peupliers et de saules qui se sont développés spontanément sur une lagune de stockage de sédiments enrichis en Hg, afin d'étudier les changements historiques des émissions de Hg provenant de la décharge des sédiments. Nous les avons comparé à des arbres situés sur une zone contrôle adjacente à cette décharge. Les résultats ont démontré la valeur potentielle de l'utilisation de la dendrochimie pour enregistrer les émissions historiques de Hg provenant des activités industrielles passées. Par ailleurs, plusieurs formes de Hg dans les feuilles de peuplier ont été détectées, la proportion de MMHg mesurée dans les feuilles de peuplier était d'environ 7,5% du Hg total, alors que 14-26% du Hg intracellulaire était lié à la fraction protéique et 40-75% était lié à la paroi cellulaire et membranes. Cela permet de conclure que le Hg volatile a bien pénétré dans les cellules foliaires du peuplier, et n'est pas simplement adsorbé à la surface des tissus foliaires.

Manuscrit 2 : *Je suis en 3^{ème} auteur dans cet article publié. Dans ce travail, j'ai réalisé les analyses du Hg organique (MMHg et fractions chélatées aux protéines et autres composantes de la paroi cellulaire dans les feuilles de peuplier). J'ai également participé aux campagnes d'échantillonnage.*

Manuscrit et statut	Référence
Chapitre 1. Étudier les modes de transfert et de stockage du Hg vers les parties aériennes de végétaux cultivés sur sols enrichis en Hg	
Manuscrit 2. Publié.	Maillard F, Girardclos O, Assad M , Zappellini C, Jung L, Guyeux C, Chrétien S, Bigham G, Cosio C, Chalot M (2016) Dendrochemical assessment of mercury releases from a pond and dredged-sediment landfill impacted by a chlor-alkali plant. <i>Environmental Research</i> 148: 122-12 (IF 2015 : 3,1).



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envres

Case report

Dendrochemical assessment of mercury releases from a pond and dredged-sediment landfill impacted by a chlor-alkali plant



François Maillard^a, Olivier Girardclos^a, Mohamad Assad^a, Cyril Zappelini^a,
Julia Maria Pérez Mena^a, Loïc Yung^a, Christophe Guyeux^b, Stéphane Chrétien^c,
Gary Bigham^d, Claudia Cosio^e, Michel Chalot^{a,f,*}

^a Laboratoire Chrono-Environnement (UMR 6249), Université de Bourgogne Franche-Comté, Pôle Universitaire du Pays de Montbéliard, 4 Place Tharradin, BP 71427, 25211 Montbéliard, France

^b Département d'Informatique des Systèmes Complexes, Institut FEMTO-ST (UMR 6174 CNRS), Université de Bourgogne Franche-Comté, 16 Route de Gray, 25030 Besançon Cedex, France

^c Laboratoire de Mathématiques de Besançon, Université de Bourgogne Franche-Comté, 16 Route de Gray, 25030 Besançon Cedex, France

^d Exponent, Inc., 15375 SE 30th Place, Suite 250, Bellevue, WA 98007, USA

^e Institute F.-A. Forel, University of Geneva, 10 Route de Suisse, CP 416, CH-1290 Versoix, Switzerland

^f Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 November 2015

Received in revised form

9 March 2016

Accepted 24 March 2016

Keywords:

Dendrochemistry

Tree rings

Mercury

Salicaceous species

Chlor-alkali plant

ABSTRACT

Although current Hg emissions from industrial activities may be accurately monitored, evidence of past releases to the atmosphere must rely on one or more environmental proxies. We used Hg concentrations in tree cores collected from poplars and willows to investigate the historical changes of Hg emissions from a dredged sediment landfill and compared them to a nearby control location. Our results demonstrated the potential value of using dendrochemistry to record historical Hg emissions from past industrial activities.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Mercury (Hg) is a contaminant of concern because of its potential human and ecological health impacts. It is also persistent and can be transported great distances in the atmosphere. A recent paper summarized the natural and anthropogenic sources that have contributed to the increase of Hg concentration in soil and reviewed major remediation techniques and their applications to control soil Hg contamination (Xu et al., 2015). Chlor-alkali plants using Hg cell technology are known current and past sources of Hg emissions to the atmosphere and related contamination of sediment and soils (Biester et al., 2002; Esbri et al., 2015). Due to the process characteristics, Hg is released through air emissions, waste water discharges, and solid waste disposal (OSPAR Commission, 2013). Hg emissions from chlor-alkali wastes have been investigated, albeit not using tree rings, one of the earliest such

studies being that of Lindberg and Turner (1977). Sensitive instrumentation and abiotic and biotic passive samplers have been utilized to quantify air concentrations and observe temporal trends (for a review, see Gustin et al. (2015)). However, these data are not representative of past trends.

Stamenkovic and Gustin (2009) showed that plants are net sinks and that atmospheric mercury is incorporated into leaf tissue. We recently demonstrated the role of the poplar above-ground biomass in capturing the atmospheric Hg released from the soil (Assad et al., 2016). Molina et al. (2006) hypothesized that variations in Hg uptake by the vegetation cover depends on a large number of factors, including Hg concentrations in the soil and atmosphere, organs, and season. Additionally, when woody species were compared on a mass basis for Hg concentrations, significant differences were observed among species (Laacouri et al., 2013) and thus tree species is an additional factor that must be taken into account.

Tree-ring analysis is a potentially useful technique in assessing the historical evolution of atmospheric mercury (Wright et al., 2014). Woody tissue Hg may be indeed a valuable proxy for understanding changing global air Hg concentrations as well as

* Correspondence to: Oratoire Chrono-Environnement, UMR 6249, Université de Franche-Comté, Pôle Universitaire du Pays de Montbéliard, 4 Place Tharradin, BP 71427, 25211 Montbéliard, France.

E-mail address: michel.chalot@univ-fcomte.fr (M. Chalot).

impacts of soil contamination (Hojdová et al., 2011; Bigham et al., 2015). This study was designed to investigate the historical evolution of Hg concentrations in tree rings from trees growing on and near a landfill that received dredged sediments from a Hg cell chlor-alkali facility in France. The objective was also to determine whether the sediments are currently a source of Hg emissions.

2. Materials and methods

The site is located in Western Europe along a major river and surrounded by several urban aggregates. Production at the chlor-alkali facility began in 1950 with wastewater discharged directly to a stream. In 1964 a dam was constructed downstream of the discharge. The impoundment, known as the mitigation pond, enhanced sediment deposition to control transport of Hg-contaminated sediment further downstream. By 1972 it became necessary to remove sediment from the mitigation pond to maintain capacity. A 12-ha area with dikes 5-m high was constructed adjacent to the mitigation pond for disposal of the sediment removed by a hydraulic dredge. Wastewater treatment at the plant facility was installed in 1987, which reduced Hg concentrations in sediments settling in the mitigation pond. Chlorine production at the facility was eventually converted to a non-Hg technology in 2004 and the disposal area, now known as the landfill, ceased receiving sediments the same year. The control site is located in undisturbed forest adjacent to the landfill, as shown in Fig. 1. Soil Hg concentrations are shown in Table 1. Details of soil analyses for both site locations are provided in Zappellini et al. (2015). Local

woody species began to recolonize the sediment landfill beginning in the 1980 s.

Two salicaceous species, poplar (*Populus* sp.) and willow (*Salix* sp.), that have naturally colonized the sediment landfill were the primary species sampled for this study. Cores were taken at breast height (1.3 m) from each tree using a stainless steel borer (10 mm diameter). Cores of three other woody species present on the sediment landfill, *Robinia pseudoacacia*, *Rhamnus catharticus* and *Fraxinus excelsior* were also collected at the same period. All samples were frozen at -77°C for 24 h and then freeze-dried (Cosmos 20K, CRYOTEC). To reduce the variability of elemental concentrations within an individual growth ring (Watmough, 1999), seven and eight trees from the Salicaceae family were sampled on the control site and sediment landfill, respectively (Table 1 and Fig. 1) and multiple cores were collected from each tree. Using a new razor blade for each core, a thin layer was shaved from the core surface in order to make annual rings easier to see. Tree ring number and thickness was recorded beginning at the base of the bark tissue. Rings on each tree core were delineated using a microscope (OLYMPUS SZ-CTV Japan, SZ-60) and each annual ring was cut with a razor blade and stored independently of other tree rings.

Hg in every tree ring was measured on an AMA-254 cold vapor atomic absorption (CV-AAS) Hg analyser (Altec Co, Czech Republic), using the standard conditions recommended by the manufacturer (120 s drying, 150 s heating, 45 s cooling). The AMA-254 was regularly calibrated over two ranges, (0.05–40 and 40–500 ng of mercury) before each analysis session. Accuracy was also checked by analysis of a certified reference material (CRM),

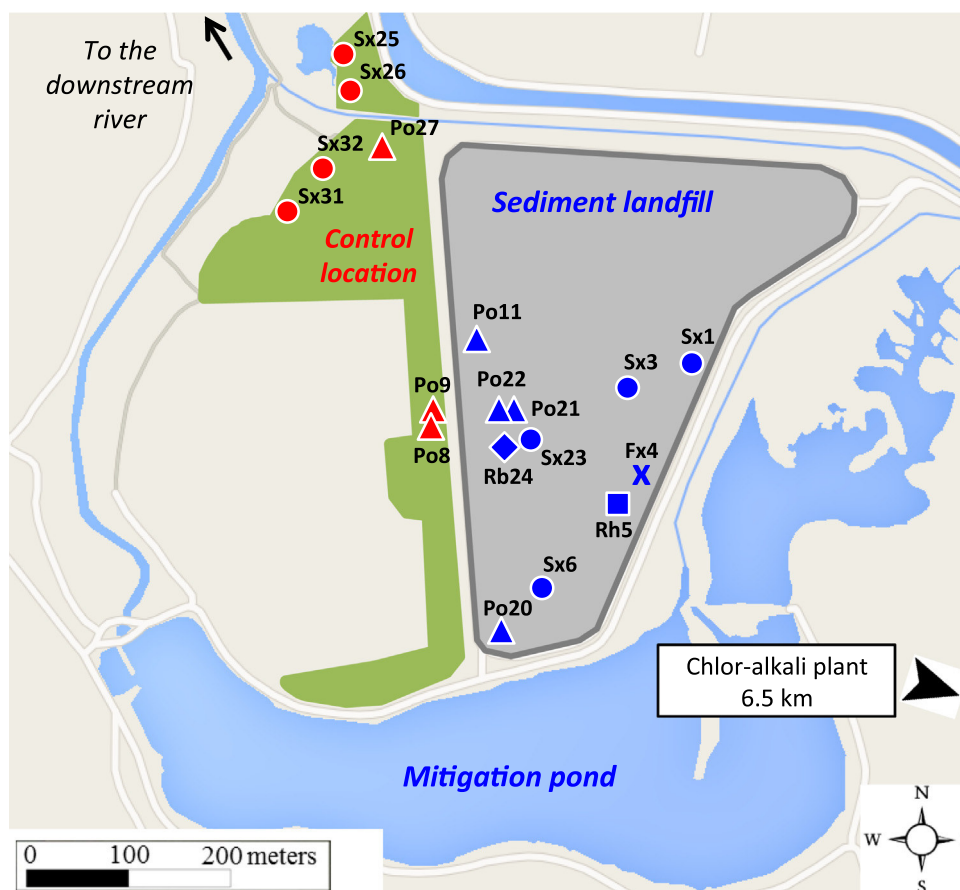


Fig. 1. Schematic view of the landfill and locations of trees sampled. Trees from the sediment landfill and control locations are in blue and red, respectively; *Salix* and *Populus* are represented by circles and triangles, respectively while *Robinia*, *Rhamnus* and *Fraxinus* are represented by diamond, square and cross, respectively. Roads appear as white whereas waterbodies appear in blue. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1
Summary of the characteristics of the sampled trees, and associated soil Hg concentrations. Each collected tree was given an identification code (ID) for further reference in the text. The column “tree cores” indicates the number of cores collected on each sampled tree.

Sample area	Plant Genera	Tree ID	min–max rings [Hg] (ng/g)	Time period	Tree cores	Average soil [Hg] (ng/g)
Control location	<i>Populus</i>	Po8	3.30–38.70	1951–2012	3	210–950
		Po9	3.43–40.17	1959–2013	3	
		Po27	1.43–10.73	1997–2013	2	
	<i>Salix</i>	Sx25	3.21–8.16	2003–2013	1	
		Sx26	3.62–12.5	1995–2013	2	
		Sx31	5.90–18.74	1991–2013	2	
		Sx32	3.18–8.25	1994–2013	2	
Sediment landfill	<i>Populus</i>	Po11	6.32–18.37	2004–2012	2	3250–4590
		Po20	3.75–16.24	2002–2013	1	
		Po21	2.80–9.62	2006–2013	1	
		Po22	3.56–8.30	2006–2012	1	
	<i>Salix</i>	Sx1	1.99–31.11	1998–2011	2	
		Sx3	6.08–19.47	2004–2011	2	
		Sx6	3.90–60.43	1997–2012	1	
		Sx23	6.05–9.41	2005–2013	2	
	<i>Robinia</i>	Rb24	0.75–2.40	2007–2013	1	
	<i>Fraxinus</i>	Fr4	2.54–4.02	2007–2011	2	
<i>Rhamnus</i>	Rh5	1.53–3.88	2005–2011	2		

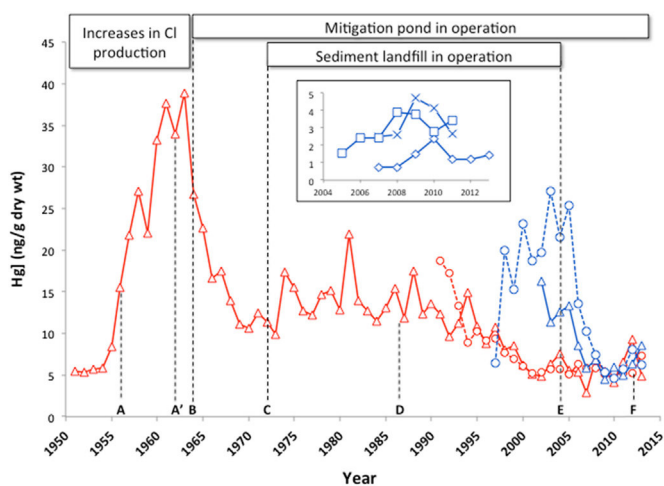


Fig. 2. Yearly Hg concentrations (mean ng/g dry weight) measured in rings of poplar and willow cores from the sediment landfill (blue) and a control location (red). Letters attached to dashed lines indicate the historical events at the site, as detailed in the main text. Major changes at the experimental site are provided in the upper part of the figure. Data corresponding to willow and poplar cores are represented by circles and triangles, respectively. Additional cores were collected and analyzed (insert), from the non-accumulated trees *Robinia pseudoacacia* (diamond), *Rhamnus catharticus* (square) and *Fraxinus excelsior* (cross). Variation was always < 10%. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Oriental Basma Tobacco Leaf (INCT-OBTL-5), with a certified Hg content of 20.9 ± 1.3 ng/g D Wt (Samczyński et al., 2012), at least once a day. The obtained results (peak area) indicate Hg concentrations of $20.2 \pm 0.6\%$ over the entire period of analyses in our laboratory, with recoveries in the range of 98–105%. No sample treatment was required prior the analysis, avoiding interferences during sample preparation. The typical working range for this method is 0.05–600 ng, whereas most of our samples fell within the range 0.1–3.0 ng. Variation during CRM measurements was generally about 6% (relative percent difference between sample and duplicates) and always lower than 10%. The instrument detection limit for this method is 0.006 ng of total mercury. Methylmercury (CH_3Hg , MMHg) was also measured in poplar leaves by GC–CV–AFS as detailed elsewhere (Regier et al., 2013).

Collection of tree cores at control and landfill locations lead to data ranging from year 1951 to year 2013. The resulting matrix included 63 lines (number of years) and 30 columns (number of

measures) and contained 574 nonempty coefficients while all other coefficients were missing values. Missing data did not allow us to achieve a principal component analysis (PCA) to determine the driving factors. We therefore applied an alternating steepest method, and a scaled variant, for matrix completion (Tanner and Wei, 2016), allowing us to apply a sparse PCA analysis (Jolliffe, 2002) for determining the statistical significance of our set of data. A particular disadvantage of ordinary PCA is that the principal components are usually linear combinations of all input variables. Sparse PCA overcomes this disadvantage by finding linear combinations that contain just a few input variables.

3. Results and discussion

Physical analysis showed that soil from the sediment landfill contained a significantly greater proportion of thin silt, whereas control soils contained more clay and coarse sand. Chemical analysis revealed that pH, calcium carbonate (CaCO_3) concentration and exchangeable calcium oxide (CaO_{ex}) and total arsenic (As) were all significantly higher in the soil of the sediment landfill, whereas CEC was significantly enhanced in soil of the control site. A redundancy analysis further showed that silt, CaCO_3 , pH and CaO_{ex} , as well as total Hg and As were all positively correlated in the sediment landfill (p -value=0.04, adjusted $R^2=0.88$; Zappellini et al., 2015).

The Hg concentrations in the dendrochemistry samples collected in 2012 and 2013 are presented in Fig. 2. At the control location, an old poplar tree (Po8) allowed for Hg measurements as early as 1951. Additional poplars (Po9 and Po27) and willows (Sx25, Sx26, Sx31 and Sx32) from the control location provided replicate samples after 1959. Basal Hg levels from one poplar collected at the control location (Po8) were around 5 ng/g (dry weight) in the early fifties, this value appears to represent local background conditions. Hg concentrations in control poplars thereafter peaked at around 35 ng/g dry wood in the early sixties that corresponds to two successive increases in chlorine production capacity at the industrial site in 1956 and 1962 (event A, Fig. 2). Records of atmospheric Hg concentrations are available for the period 1998–2011 (OSPAR Commission, 2013), but there are no available records of atmospheric Hg concentrations for the 1950–1980 period and therefore it is difficult to ascertain the source of Hg in trees during this period. It appears to be most probably through Hg flux from the river to air and then soil through

flooding. Contamination of trees through direct emissions from the plant site is indeed unlikely, given the striking decrease of Hg content in poplar cores observed from 1964 that corresponds to the commissioning of the mitigation pond (Fig. 1) in April 1964 (event B, Fig. 2). This pond was created to ensure final sedimentation of the wastewater before transport further downstream, indicating that the impoundment reduced evasion compared to the river. This suggests that local Hg emissions from the river near the trees were the source of exposure. However, Hg concentrations thereafter leveled off from 1970 until the late eighties to around 12–15 ng/g. This plateau phase that lasted for about 20 years was coincident with the implementation of the sediment landfill (Fig. 1) in 1972 (event C, Fig. 2). Active loading of sediments in the pond may have created a continuous and stable source of volatile Hg to the atmosphere. After the plateau phase, Hg data from both poplar and willow cores revealed a rapid decrease of Hg content for a period of about 10 years, until background concentrations (5 ng/g) were reached in most samples. This period followed the commissioning of an upstream wastewater treatment plant in 1987 (event D, Fig. 2). This might also have been due to the natural revegetation of the sediments surface that started in 1985, as revealed by aerial photographs. This vegetation cap might have intercepted part of the volatilized Hg, as has recently been described for other metals (Sánchez-López et al., 2015). The vegetation cover could also have changed geochemical conditions in the surface soil that reduced the Hg emission rate, and shading by the forest canopy when present may also have reduced emissions.

The oldest tree on the sediment landfill (Sx6) was 17-yr-old at the time of core sampling, residing on a zone close to the access road around the dump, where organic matter, related to vehicle traffic, may have been deposited. Most of the other trees were 10–12 yr-old. This early colonization event reflects the capacity of salicaceous species to colonize unfavorable environments. New trees that colonized the sediments surface revealed Hg concentrations of about 25 ng/g for willow in early 2000, and around 15 ng/g for poplars at the same period. These concentrations were typically 2–5-fold higher than those measured in the trees from the control location at the same period. These trees were indeed in closer contact with the potential source of volatile Hg than their counterpart at the control location. From 2005 to 2013, a reduction of Hg concentrations to background levels (~5 ng/g) was recorded in tree cores of both poplar and willow species from the sediment landfill. This reflects the closure of the sediment landfill in 2004 (event E, Fig. 2). Additionally, we measured Hg content in cores of three other woody species present on the sediments landfill, *Robinia pseudoacacia* (Rb24), *Rhamnus catharticus* (Rh5) and *Fraxinus excelsior* (Fr4). Hg was detected only at background levels, between 2 and 4 ng/g (Fig. 2, insert), as compared to the range 5–25 ng/g in salicaceous species for the same period.

As indicated in the material and methods data matrices have first been completed using an up-to-date and mathematically rigorous statistical method called alternating steepest descent ASD algorithm (Tanner and Wei, 2016). The ASD algorithm specifically solves the fixed-rank matrix completion problem: given a pre-defined rank r (roughly speaking, a number of interdependencies), the algorithm finds the closest completed matrix of rank r that fits known data (for the Frobenius norm). The matrix completion allows recovering a matrix from a subset of its entries thanks to interdependency between the entries, typically through low rank structure. A sparse principal component analysis (PCA) after matrix completion allowed us to conclude that trees in direct contact with the Hg source on the sediment landfill were clearly enriched in Hg as compared to trees from the control location, over the entire period of exposure (data not shown).

Hg values in wood samples reported for the landfill and control sites in our study ranged from 1.7 to 39 ng/g, and are similar to

other studies where Hg concentrations were reported to be in the range from 0.4 to 37 ng/g (Siwik et al., 2010; Wright et al., 2014). An exception was found by Abreu et al. (2008) who reported Hg concentration as high as 280 ng/g dry wood, although collected from an aquatic environment. The Hg concentrations in the soil at control locations were around 400 ng/g, as compared to a ten-fold higher concentration in the sediment landfill in 2013 (Table 1). This indicates that tree core Hg accumulation was not driven by Hg concentration in soils, but rather by Hg emission to the atmosphere near the trees. When dredged sediment disposal stopped in 2004, trees from the landfill location recorded Hg concentrations similar to the trees at the control location. Becnel et al. (2004) and Graydon et al. (2009) hypothesized that Hg was primarily accumulated in trees by way of the atmospheric pathway and not through the soil. High levels of Hg in the trees present at control locations during the landfill operating period and the lack of correlation between Hg in tree rings and Hg in soil confirm this hypothesis. The low Hg concentrations detected in tree cores after closure of the sediment landfill, despite the current high Hg concentration in the soil, suggests that the dredged sediment still might be a source, but not at magnitudes as during the facility operational phase.

Two hypotheses can be proposed to explain the elevated Hg concentrations in tree rings during the period of active disposal to the landfill. First, the dredging in the mediation basin and disposal of the Hg-contaminated sediments on the landfill physically increased the rate of Hg emissions. The second hypothesis relies on the paper from Gustin and Stamenkovic (2005) who hypothesized that the addition of soil water in amounts less than that necessary to saturate the soil surface results in an immediate release of elemental Hg from the soil surface. Active recapture of Hg(II) and/or Hg(0) by poplar leaves is further confirmed by measuring the different forms of Hg into poplar leaves. The proportion of MMHg measured in the leaves of poplar was around 7.5% of total Hg (4 replicates), whereas 14–26% of intracellular Hg was bound to the protein fraction, and 40–75% was bound to the cell wall and membrane components, indicating that Hg was processed within poplar cells, and not only adsorbed onto the surface of leaf tissues. We are currently further investigating the role of intracellular and membrane-bound proteins in the sequestration of Hg in poplar leaves.

We demonstrated, however, the relevance of using dendrochemistry to monitor historical events that reinforces the utility of using tree rings as recorders of past industrial activities.

Funding sources

This study was part of the Pollution Investigation by Trees (PIT), an international research program funded by the French Environment and Energy Management Agency (ADEME), grant no. ADEME 1072C0020 PIT. Financial supports from Région Franche-Comté (programme “Environnement-Homme-Territoire”, grant no. 2014-069) and from Pays de Montbéliard Agglomération (grant no. 13/070-203-2015) to M.C. are acknowledged.

Acknowledgements

We thank Chris Balouet (Environnement International) for fruitful discussions and for coordinating together with MC the PIT project. This study was part of the Pollution Investigation by Trees (PIT), an international research program funded by the French Environment and Energy Management Agency (ADEME), grant no. ADEME 1072C0020 PIT. Financial supports from Région Franche-

Comté (programme “Environnement-Homme-Territoire”, grant no. 2014-069) and from Pays de Montbéliard Agglomération (grant no. 13/070-203-2015) to M.C. are acknowledged. We thank Anaïs Crevoisier and Yannis Misacher for their contributions to Hg analysis, and Nadia Crini from the environmental and chemical analyses platform (UFC) for her technical assistance.

References

- Abreu, S.N., Soares, A.M.V.M., Nogueira, A.J.A., Morgado, F., 2008. Tree rings, *Populus nigra* L., as mercury data logger in aquatic environments: case study of an historically contaminated environment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80, 294–299. <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-008-9366-0>.
- Assad, M., Parelle, J., Cazaux, D., Gimbert, F., Chalot, M., Tatin-Froux, F., 2016. Mercury uptake into poplar leaves. *Chemosphere* 146, 1–7.
- Becnel, J., Falgeust, C., Cavalier, T., Gauthreaux, K., Landry, F., Blanchard, M., Beck, M. J., Beck, J.N., 2004. Correlation of mercury concentrations in tree core and lichen samples in southeastern Louisiana. *Microchem. J.* 78, 205–210. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2004.06.002>.
- Biester, H., Müller, G., Schöler, H.F., 2002. Binding and mobility of mercury in soils contaminated by emissions from chlor-alkali plants. *Sci. Total Environ.* 284, 191–203.
- Bigham, G., Liang, L., Balouet, J.C., Chalot, M., 2015. Phytoscreening-based assessment of mercury in soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-015-5604-2>.
- Esbri, J.M., Lopez-Berdonces, M.A., Fernandez-Calderon, S., Higuera, P., Diez, S., 2015. Atmospheric mercury pollution around a chlor-alkali plant in Flix (NE Spain): an integrated analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 4842–4850. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-014-3305-x>.
- Graydon, J.A., St. Louis, V.L., Hintelmann, H., Lindberg, S.E., Sandilands, K.A., Rudd, J. W., Kelly, C.A., Tate, M.T., Krabbenhoft, D.P., Lehnher, I., 2009. Investigation of uptake and retention of atmospheric Hg (II) by boreal forest plants using stable Hg isotopes. *Environ. Sci. Technol.* 43, 4960–4966.
- Gustin, M.S., Amos, H.M., Huang, J., Miller, M.B., Heidecorn, K., 2015. Measuring and modeling mercury in the atmosphere: a critical review. *Atmos. Chem. Phys.* 15, 5697–5713. <http://dx.doi.org/10.5194/acp-15-5697-2015>.
- Gustin, M.S., Stamenkovic, J., 2005. Effect of watering and soil moisture on mercury emissions from soils. *Biogeochemistry* 76, 215–232.
- Hojdová, M., Navrátil, T., Rohovec, J., Žák, K., Vaněk, A., Chrástný, V., Bače, R., Svoboda, M., 2011. Changes in mercury deposition in a mining and smelting region as recorded in tree rings. *Water Air Soil Pollut.* 216, 73–82. <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-010-0515-9>.
- Jolliffe, I.T., 2002. *Principal Component Analysis*. Springer-Verlag, New York, ISBN 978-0-387-22440-4.
- Laacouri, A., Nater, E.A., Kolka, R.K., 2013. Distribution and uptake dynamics of mercury in leaves of common deciduous tree species in Minnesota, U.S.A. *Environ. Sci. Technol.* 47, 10462–10470. <http://dx.doi.org/10.1021/es401357z>.
- Lindberg, S.E., Turner, R.R., 1977. Mercury emissions from chlorine production solid waste deposits. *Nature* 268, 133–136.
- Molina, J.A., Oyarzun, R., Esbri, J.M., Higuera, P., 2006. Mercury accumulation in soils and plants in the Almadén mining district, Spain: one of the most contaminated sites on Earth. *Environ. Geochem. Health* 28, 487–498. <http://dx.doi.org/10.1007/s10653-006-9058-9>.
- OSPAR Commission, 2013. Mercury losses from the chlor-alkali industry in 2011. ISBN No. 978-1-909159-33-4. Publication Number: 600/2013.
- Regier, N., Larras, F., Bravo, A.G., Ungureanu, V.-G., Amouroux, D., Cosio, C., 2013. Mercury bioaccumulation in the aquatic plant *Elodea nuttallii* in the field and in microcosm: Accumulation in shoots from the water might involve copper transporters. *Chemosphere* 90, 595–602. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.08.043>.
- Samczyński, Z., Dybczyński, R.S., Polkowska-Motrenko, H., et al., 2012. Two new reference materials based on tobacco leaves: certification for over a dozen of toxic and essential elements. *Sci. World J.* <http://dx.doi.org/10.1100/2012/216380> 16 Pages.
- Sánchez-López, A.S., Carrillo-González, R., González-Chávez, M. del C.A., Rosas-Saito, G.H., Vangronsveld, J., 2015. Phytobarriers: plants capture particles containing potentially toxic elements originating from mine tailings in semiarid regions. *Environ. Pollut.* 205, 33–42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.05.010>.
- Siwik, E.I.H., Campbell, L.M., Mierle, G., 2010. Distribution and trends of mercury in deciduous tree cores. *Environ. Pollut.* 158, 2067–2073. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2010.03.002>.
- Stamenkovic, J., Gustin, M.S., 2009. Nonstomatal versus Stomatal uptake of atmospheric mercury. *Environ. Sci. Technol.* 43, 1361–1372.
- Tanner, J., Wei, K., 2016. Low Rank Matrix Completion by Alternating Steepest Descent Methods. *Appl. Comput. Harmon. Anal.* 40, 417–419. <http://dx.doi.org/10.1016/j.acha.2015.08.003>.
- Watmough, S.A., 1999. Monitoring historical changes in soil and atmospheric trace metal levels by dendrochemical analysis. *Environ. Pollut.* 106, 391–403.
- Wright, G., Woodward, C., Peri, L., Weisberg, P.J., Gustin, M.S., 2014. Application of tree rings [dendrochemistry] for detecting historical trends in air Hg concentrations across multiple scales. *Biogeochemistry* 120, 149–162. <http://dx.doi.org/10.1007/s10533-014-9987-9>.
- Xu, J., Bravo, A.G., Lagerkvist, A., Bertilsson, S., Sjöblom, R., Kumpiene, J., 2015. Sources and remediation techniques for mercury contaminated soil. *Environ. Int.* 74, 42–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2014.09.007>.
- Zappalini, C., Karimi, K., Foulon, J., Lacerat-Didier, L., Maillard, F., Valot, B., Blaudez, D., Cazaux, D., Gilbert, D., Yergeau, E., Greer, C., Chalot, M., 2015. Diversity and complexity of microbial communities from a chlor-alkali tailings dump. *Soil. Biol. Biochem.* 90, 101–110. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.08.008>.

5.1.4 **Transfer du Hg dans les parties comestibles d'espèces de la famille des Solanacées**

Les lagunes de stockage de déchets produits par l'activité industrielle chlore-alcali menacent gravement l'environnement et les populations environnantes. Cet environnement spécifique nécessite une stabilisation du Hg pour prévenir la pollution de l'air par le Hg volatilisé, ce qui peut être réalisé par une couverture végétale adéquate. Cependant, le risque de transfert de Hg des lagunes aux cultures agricoles environnantes doit être évalué. En effet, les feuilles des plantes sont considérées comme un puits net pour le Hg atmosphérique. Cependant, la plupart des études relatives à l'absorption du Hg par les cultures ont utilisé des légumes-feuilles, alors que le cas des légumes-fruits et surtout de la famille des Solanacées est moins étudié. De plus, des études antérieures ont exposé les légumes-feuilles à la fois au sol pollué et à l'air sans déterminer la voie d'absorption du Hg. L'objectif de ce travail est d'évaluer les apports relatifs des voies racinaires et atmosphériques en cultivant des légumes-fruits (poivrons, tomates, aubergines) et des plants de tabac sur des substrats contrôlés ou pollués dans des conditions d'exposition contrôlées. Nous avons montré que les concentrations foliaires de Hg augmentaient significativement avec l'âge, atteignant respectivement 543, 572, 368 et 433 ng g⁻¹ de masse sèche pour le poivron, le tabac, la tomate et l'aubergine, alors que tous les fruits affichaient des ordres de grandeur plus faibles que leurs feuilles. Il est intéressant de noter que nous n'avons pas observé de concentrations de Hg significativement différentes dans les feuilles de chaque plante cultivée sur les substrats témoins ou pollués lorsqu'ils sont cultivés ensemble dans des chambres de croissance. En calculant les masses fraîches de fruits à consommer pour atteindre l'apport journalier toléré (TDI) de Hg, nous avons démontré l'absence de risque pour les parties comestibles. Les feuilles de poivron ont été les plus sensibles au Hg atmosphérique, et une autre expérience a été réalisée afin de déterminer les valeurs de fond des feuilles, la limite de détection d'effet (EDL) et la limite de détection biologique (BDL). Cet ensemble de données nous a amené à conclure que l'entrée de Hg dans les feuilles de Solanacées se réalise exclusivement par voie atmosphérique. Nous suggérons également que les feuilles de poivron pourraient être utilisées comme biomoniteur en raison de son faible BDL.

Manuscrit 3 : *Je suis en 1^{er} auteur dans cet article publié, j'ai réalisé les principales étapes de ce travail : mise en place des dispositifs expérimentaux, suivi des expériences de la plantation à la récolte, analyse du Hg dans les différents compartiments (sol, feuille, fruit, racine), traitement statistique des données obtenues, rédaction de l'article, en collaboration avec mes co-auteurs.*

Manuscrit et statut	Référence
Chapitre 1. Étudier les modes de transfert et de stockage du Hg vers les parties aériennes de végétaux cultivés sur sols enrichis en Hg	
Manuscrit 3.	Assad M, Chalot M. (-).Mercury transfer in Solanaceae species.
En préparation.	A soumettre au journal : <i>Ecotoxicology and Environmental Safety</i> (IF 2015 : 3,1).

Mercury transfer in Solanaceae species

Mohamad Assad, Michel Chalot*

Laboratoire Chrono-Environnement, UMR CNRS 6249, Université de Bourgogne Franche-Comté, Pôle Universitaire du Pays de Montbéliard, 4 Place Tharradin, BP 71427, 25211 Montbéliard, France

*: corresponding author: email: michel.chalot@univ-fcomte.fr

Abstract

Tailings dumps at chlor-alkali plants poses serious threaten to the surrounding environment and populations, as they are often enriched in a number of process-derived contaminants such as Hg. This specific environment requires Hg stabilization to prevent air pollution by evaporated Hg, which can be achieved through plant covers and also the selection of non-accumulating Hg crops. However, the risk of Hg transfer to nearby urban gardening crops needs to be evaluated. Plants leaves are considered as a net sink for atmospheric Hg; however, most studies related to Hg uptake by crops have used leaf vegetables, whereas the case of fruit vegetables and especially from the *Solanaceae* family was less studied. In addition previous studies have exposed leaf vegetables to both Hg polluted soil and air without taking into account the Hg uptake pathway. The aim of the present work was to evaluate the relative contributions of root and atmospheric pathways by growing fruit vegetables (pepper, tomato, eggplant) as well as tobacco plant on either control or polluted substrates under controlled exposure conditions. We showed that foliar Hg concentrations significantly increased with age, reaching 543, 572, 368 and 433 ng g⁻¹ dry mass for pepper, tobacco, tomato and eggplant respectively, whereas all fruits showed two orders of magnitude lower Hg accumulation than leaves. Unexpectedly, we did not observe significantly different Hg concentrations in leaves of plant grown either on the control or on polluted substrates when grown at the time in growth chambers. By calculating fresh masses of fruits to be consumed to reach tolerate daily intake (TDI) of Hg, we demonstrated the lack of risk for edible parts. It appeared that pepper was the most sensible plant from the *Solanaceae* family for atmospheric Hg. We conducted a second experiment to determine leaf background values, effect detection limit (EDL) and biological detection limit (BDL). Our set of data prompted us to conclude that Hg entry into *Solanaceae* leaves is exclusively through an atmospheric pathway, that pepper leaves could be used as relevant biomonitor due to its low BDL (1.45 ng m⁻³), and finally that *Solanaceae* fruits can be considered as a safe food in our industrial context.

Keywords:

Biomonitoring, Edible crops, Mercury, Protein chelation, *Solanaceae*

1. Introduction

Gardening in urban areas is becoming increasingly popular all over the world (Kessler 2013) but serious constraints due to soil pollution in the surrounding environment should be taken into account. City gardeners must for instance evaluate how a prospective site was previously used, to identify potential safety hazards, such as lead and other toxic metals, solvents, pesticides, and total petroleum hydrocarbons in the soil. Another potential risk is associated to the presence in the vicinity of urban gardens of potential sources of contaminants that might be conveyed through the atmosphere. For instance, the chlor-alkali activity generated Hg-contaminated wastes (Xu et al. 2015) that are stored in licensed tailings dumps, in the vicinity of human habitats. Environmental contamination by Hg is a major concern because of its hazardous impact on human health, toxicity, cycling and potential bio-concentration (Lindberg et al. 1998). Elemental Hg easily evaporates to the atmosphere due to its low boiling point (357 °C at atmospheric pressure Mukherjee et al. 2004) and is also the dominant Hg species in the atmosphere emitted from the soil (Kim et al. 1995). Hg derived from chlor-alkali dumps is thus a major source of Hg for uptake into edible crops, that depend largely on Hg⁰ foliar uptake (see Patra and Sharma 2000 for a review). Moore and Castro (2012) reported that soil temperature, redox potential and organic matter were significant factors affecting total gaseous Hg concentrations in forest soils. This direct uptake of Hg⁰ from the atmosphere occurs through the plant stomata or as uptake through the cuticle from dry and wet Hg⁰ deposition on the leaf surface, or also as foliar absorption of divalent reactive gaseous specie, e.g. HgO, Hg(OH)₂, HgCl₂, HgBr₂ (Bishop et al. 1998; Shaw and Panigrahi 1986). The uptake through leaves depends mainly on Hg air contamination degree, CO₂ air content and plant species (Millhollen et al. 2006b; Egler et al. 2006). Molina et al. (2006) also hypothesized that variations in Hg uptake by a vegetation cover depend on a large number of factors, including the Hg contents in the soil and atmosphere, plant species, organs, and season. The uptake of Hg into the aboveground plant tissues is proportional to its atmospheric concentrations, even at low ambient levels (Staiger 1983).

Edible plants constitute an important part of the human diet, as they provide carbohydrates and proteins as well as vitamins, minerals (Reis et al. 2009). When humans consume edible plants containing Hg, there is a potential risk that Hg intake exceeds food safety limit set by public policies. There is a large set of data on the accumulation of Hg by leaf and grain vegetables, which highlighted that this potential risk is indeed highly depending on the plant species that are grown and eaten by consumers. For instance maize and rice poorly accumulated Hg in their grains (Niu et al. 2011; Tang et al. 2015), whereas leaf vegetables such as those from *Brassica*, *Allium*, *Spinacia* or *Lactuca* species might accumulate up to 2000 ng of Hg per g of edible tissues (Dunagan et al. 2007; De Temmerman et al. 2009; Miklavčič et al. 2013). In consequence, investigating Hg uptake pathways in edible plants grown on agricultural lands in the vicinity of a chlor-alkali tailings dump is urgently needed to ensure production of safe food by consumers, notably by city gardeners. As Hg can be easily transported and incorporated into terrestrial and aquatic systems due to its dynamic biogeochemical cycle, sensitive and inexpensive biomonitoring systems are needed in the vicinity of atmospheric Hg sources, to reflect the real exposure of crops to atmospheric Hg. An atmospheric Hg biomonitor would be defined as a biological organism that has the capacity to indicate the degree of atmospheric Hg contamination (see Lodenius 2013 for a review).

Given our recent data on the woody specie poplar (Assad et al. 2016), we hypothesized that edible crops would accumulate Hg, mainly through an atmospheric pathway. We used plant species from the *Solanaceae* family, pepper tomato and eggplant that are readily grown by urban gardeners. We also included tobacco from the same plant family, mostly as a reference plant that is known to accumulate some contaminants present in the atmosphere (Ribas and Peñuelas 2003).

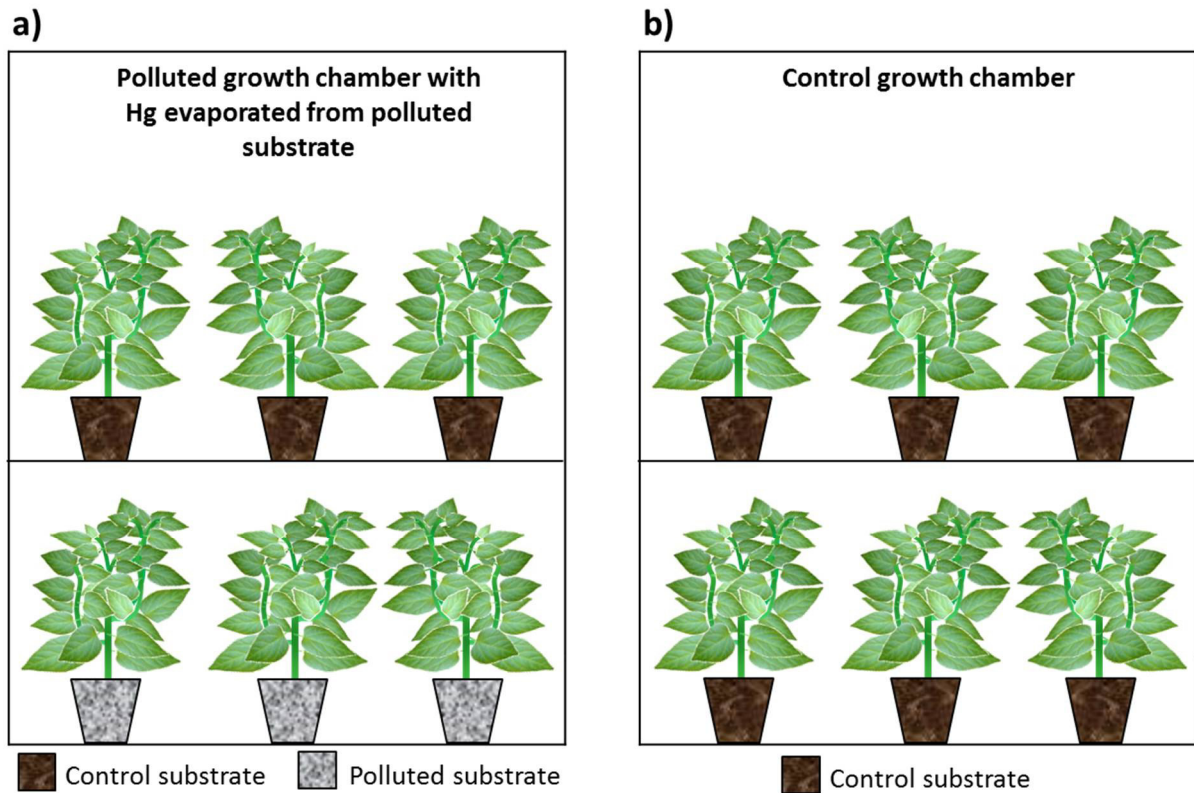


Figure S1: Schematic representation of the experimental design. a) In the first experiment, vegetables seedlings were planted in 0.5 L pots containing either in a control substrate or polluted substrate and at the atmospheric polluted chamber. b) In the second experiment, pepper seedlings were planted in only control substrate in a growth chamber.

We designed the experiment, so that the plants were exposed solely through the atmospheric pathway, or through both root and atmospheric pathways, to mimic as close as possible natural Hg exposures. We also evaluate the risk associated to the consumption of fruit crops and that associated to the consumption of cigarettes made from tobacco leaves grown in a Hg-enriched atmosphere, by comparing Hg concentrations in consumable parts with regulatory intakes.

2. Materials and methods

2.1. Growth conditions

Pepper (*Capsicum annuum*), tomato (*Solanum lycopersicum*), eggplant (*Solanum melongena*) and tobacco (*Nicotiana tabacum*) seeds were directly sown in loam (Brill substrate GmbH, Georgsdorf, Germany) containers and further planted in 0.5 L pots, containing either a control or a Hg-enriched substrate. The control substrate was made of a loam (Brill substrate GmbH, Georgsdorf, Germany) and sand mixture (50:50, v:v). 1.5 g of osmocote fertilizer (N/P/K 11/11/18, osmocote exact, Heerlen, Netherlands) was added to each pot at the beginning of the experiment. The Hg-enriched substrate consisted of sediments that originated from effluents produced during electrolytic processes based on an Hg cell chlor-alkali process used to produce chlorine until 2012, as described in (Assad et al. 2016). A set of sequential experiments was performed; the first experiment began in September 2014, which included pepper, tomato, eggplant and tobacco seedlings. These pots were mixed in the growth chamber as detailed in (Fig. S1a) and incubated in a growth chamber for 90 days. The second experiment began immediately after, which consisted of growing pepper seedlings in only control substrates in another growth chamber (Fig. S1b). Pepper seedlings were grown for 60 days. Climatic conditions for the growth chamber experiments were as follows: day illumination duration of 16 h; night time of 8 h; day temperature of 24 °C; night temperature of 20 °C; day and night humidity of 60%; and day illumination intensity of 100% with a photon flux density of 250–300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Three to four leaves representative of three different ages (young, mature and aged) were sampled on each plant, as well as fruits, when available. Leaves and fruits were rinsed separately with tap and distilled water respectively then collected in plastic self-sealing bags and frozen at -20°C. Substrates were subsampled before and at the end of the experiment. Plant samples and controlled substrate subsamples were dried at 35°C, while polluted substrate subsamples were air-dried. All samples were milled, homogenized and stored in shade at room temperature before analysis. The atmospheric Hg content of the growth chamber experiments were estimated using coal trap at the end of the experiments and found to be 1.3 ± 0.021 and $7.465 \pm 0.468 \text{ ng m}^{-3}$ for control and polluted chambers, respectively. According to (UNEP 2002) these air concentrations for control and polluted chambers considered as rural and urban ambient air concentrations respectively.

2.2. Leaf protein extraction

Leaf proteins were extracted according to Schmidt et al. (2009). Briefly, frozen leaf tissues (25 g) were ground using a blinder with 900 mL of pre-chilled protein 0.05 M Tris-HCl extraction buffer containing 2 mM PMSF and 0.1% (w/v) PVPP. After incubating at 4°C for 16h, the mixture was centrifuged at 30,000 g (Eppendorf, Germany) at 4°C for 10 min and filtrated at 0.22 μm . Aliquots of the protein supernatant were further precipitated using 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA)/acetone with or without 50 mM dithiothreitol, and centrifuged at 30,000 g (Eppendorf, Germany) at 4°C for 30 min. The protein concentration was quantified using Bradford assay with BSA as the standard. Hg was measured in all solid or liquid fractions using an AMA 254 as described below.

2.3. Hg analysis in substrate and biomass

The Hg-enriched substrates or protein fractions were analyzed in duplicate using an advanced mercury analyser (AMA 254, Courtaige Analyses Services, Mont Saint Aignan, France). Validity of the analytical method was checked by mean of the certified reference material (CRM), Oriental Basma Tobacco Leave (INCT-OBTL-5, LGC Promochem, Molsheim, France), with a certified Hg content of 20.9 ± 1.3 ng/g DW (Sameczyński et al. 2012) for the biological material. The detection limit was 0.145 ng g⁻¹. Quality controls were performed as detailed in Maillard et al. (2016). Analysis of substrate samples were performed in parallel with the CRM sewage sludge, (METRANAL, ANALYTIKA, Ltd., Prague, Czech Republic), with a certified Hg content of 5.2 ± 0.4 µg g⁻¹ DW) and on the other hand, the control substrate and plant samples were performed together with a certified reference material (oriental basma tobacco leaves, INCT-OBTL-5, 20.9 ± 1.3 ng g⁻¹ dry mass). Monomethylmercury (CH₃HgCl, mmHg) was also measured in pepper leaves by GC-CV-AFS, as detailed elsewhere (Regier et al. 2013).

2.4. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R 3.1.3 software (R Core Team 2015). All tests were considered significant when $P < 0.05$. For growth chamber experiments, significant differences of the Hg content among species, substrate types, and leaf ages were tested according to the following linear models followed by a type I – ANOVA. For all species in the polluted growth chamber experiment:

$$H_{ij} = \mu + S_p + S_j + L_k + \epsilon_{jpk} \quad (1)$$

where H_{ij} is the observed value of the Hg content, μ is the overall mean, S_p is the fixed effect of species p , S_j is the fixed effect of substrate type j , L_k is the fixed effect of leaf age k , and ϵ_{jpk} is the error term. To respect the postulates of ANOVA, the Hg content was square root transformed. A Tukey-Kramer mean comparison test was performed among all parameters. For pepper in the polluted and control atmosphere growth chamber experiments:

$$H_{ik} = \mu + A_i + S_j + L_k + \epsilon_{ijk} \quad (2)$$

where H_{ik} is the observed value of the Hg content, μ is the overall mean, A_i is the fixed effect of atmospheric chamber i , S_j is the fixed effect of substrate type j , L_k is fixed effect of leaf age k , and ϵ_{ijk} is the error term. Because all terms of the model were significant, a Tukey-Kramer mean comparison test was performed among all parameters.

3. Results and discussion

3.1. Hg entry into leaves of Solanaceae species

Hg concentrations were measured in leaf and fruit tissues of pepper, tomato, eggplant and tobacco plants grown in either the control or Hg-enriched substrate. To mimic a unique atmospheric exposure, plants in the control substrate were grown together with plants in the Hg-enriched substrate. Hg concentrations in leaves of a given species grown on either the control or Hg-enriched substrates and of similar ages were not statistically different (Fig. 1). An exception was found for young leaves of pepper on the control substrate, which can be explained by underdeveloped seedlings grown on polluted substrate as a symptom of Hg toxicity which can provoke reductions in yield (Fernández-Martínez et al. 2015). These differences in toxicity were explained by Patra and Sharma (2000), who reported that the accumulation, toxicity response and Hg distribution differed between plants exposed through shoots or through roots even when internal Hg concentrations in the treated plants were similar.

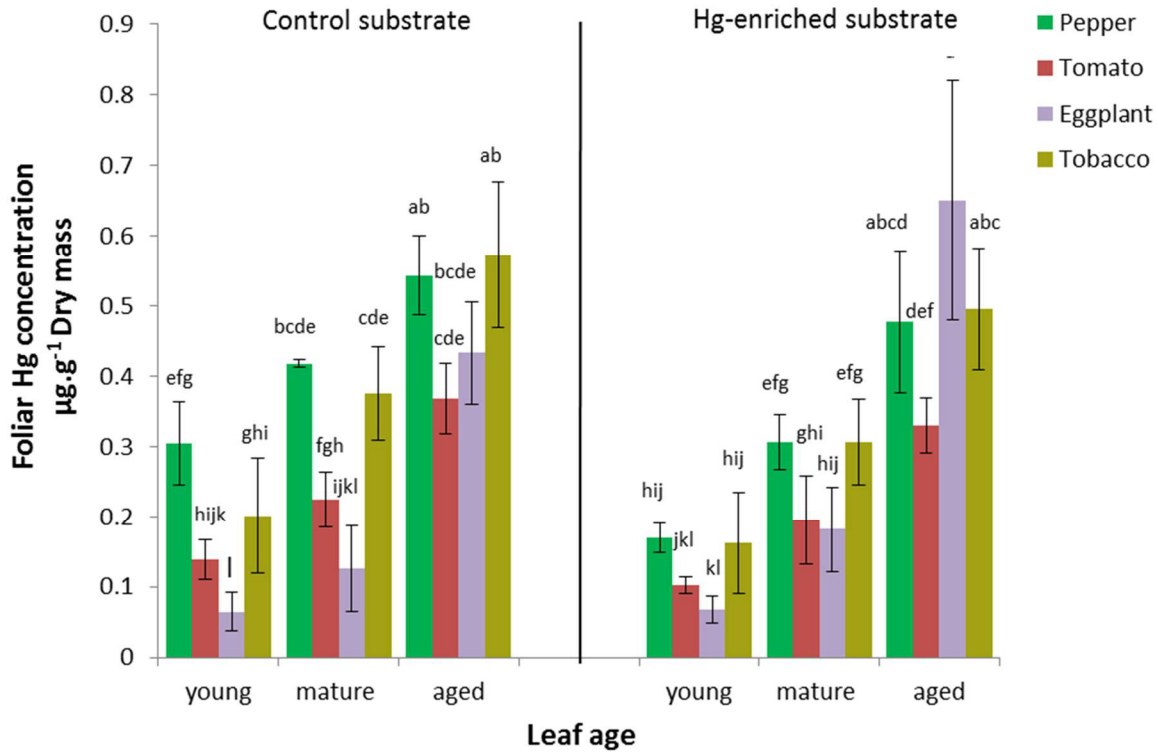


Figure 1: Foliar Hg concentration as a function of leaf age, and substrate pollution. Concentrations were recorded during 90 days at the polluted atmosphere chamber experiment in control substrate (left panel) and polluted substrate (right panel). Bars indicate means \pm standard deviation ($n=8$) of Hg concentrations ($\mu\text{g.g}^{-1}$ dry mass). Significant differences ($p < 0.05$) are indicated through lettering.

Table 1: Initial and final Hg concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry mass, mean \pm standard deviation) in substrates types for growth chamber experiments. The number of replicates is indicated; significant differences ($p < 0.05$) are indicated through lettering.

Experiment	Species	Substrate	N	Final Hg concentration (t_f)	Initial Hg concentration (t_0)	
					Control substrate	Polluted substrate
Polluted atmosphere chamber	Pepper	Control	8	0.0196 \pm 0.0023 a	0.019 \pm 0.0024 a	4.257 \pm 0.587 b
		Polluted	8	3.865 \pm 0.434 b		
	Tomato	Control	8	0.0158 \pm 0.0019 a		
		Polluted	8	4.026 \pm 0.278 b		
	Eggplant	Control	8	0.0191 \pm 0.0022 a		
		Polluted	8	3.612 \pm 0.314 b		
Tobacco	Control	8	0.0192 \pm 0.0017 a			
	Polluted	8	4.103 \pm 0.366 b			
Control atmosphere chamber	Pepper	Control	5	0.0202 \pm 0.0064 a	0.0192 \pm 0.0031 a	---

Another noticeable exception was found for eggplant, for which the Hg concentrations at the final harvest reached 650 ng g⁻¹ dry mass in Hg-enriched substrate, compared with 433 ng g⁻¹ dry mass in the control substrate

Differences were observed between plant species and plant age. Thus, there were significant differences for Hg accumulation between the different plant species at a given age and for a given exposure strategy. Hg accumulation rates for pepper and tobacco fall within the range 9-14 ng g⁻¹ dry mass day⁻¹, for control and Hg-enriched substrates. There were slightly lower for tomato and eggplant, with accumulation rates ranging from 4.6 to 7.4 ng g⁻¹ dry mass day⁻¹. For both control and Hg-enriched substrates, foliar Hg concentrations significantly increased with age (**Fig. 1**). Our data demonstrated that the actual age of the leaf greatly influenced the measured foliar Hg concentrations, which was already highlighted for poplar in our previous study (Assad et al. 2016). Overall, foliar Hg concentrations in tree leaves were found to increase as a function of leaf age in many other deciduous species (Millhollen et al., 2006a,b, Ericksen et al., 2003; Frescholtz et al., 2003), and strong positive correlation between foliar Hg concentration and leaf age from emergence till senescence were evidenced in six deciduous species Laacouri et al. (2013). The only case study reporting a negative effect of leaf age on Hg leaf accumulation was that from Dunagan et al. (2007), which was based on a relatively high Hg soil content (naturally or artificially) that may have greatly impacted the tree physiology.

To determine whether the root system might have been exposed to Hg in the control pots, Hg concentrations were measured in the control substrate at the beginning (t_0) and at the end (t_f) of the experiment. Similar measurements were performed for the Hg-enriched substrate to determine whether there was a significant loss of Hg through the atmospheric evaporation. Hg concentrations of the Hg-enriched pots were several orders of magnitude greater than those measured in control pots (**Table 1**). Overall, there were not significant differences for both substrates between initial and final Hg concentrations (**Table 1**). These data revealed that i) there was no massive evaporation related to temperature, microbial activity, or substrate moisture for the Hg-enriched substrate ii) there was no significant Hg enrichment of the control substrate, which might have supported a root transfer of Hg and hence accumulation in the leaf tissues of the *Solanaceae* plants. Despite these massive differences in substrate Hg content (**Table 1**), Hg concentrations in leaves were found to be in the same order of magnitude, as detailed above (**Fig. 1**).

This dataset strongly support our previous experiments on poplar, which highlighted the preferential atmospheric pathway for Hg entry into poplar leaves (Assad et al. 2016), using a similar experimental design. As discussed in this previous paper, controversial conclusions have been reached in the past, using various plant species and various experimental designs, reflecting various potential process for Hg entry into aboveground tissues of exposed plants. A recent paper, supporting our interpretations, concluded that Hg entry into different herbaceous plant leaves grown on highly Hg contaminated soils from a mine tailing in natural conditions was achieved through the atmospheric pathway (Fernández-Martínez et al. 2015). Conversely, Carrasco-Gil et al. (2013) compared the spatial localization of Hg in roots and leaves of *Marrubium vulgare* and *Medicago sativa* grown on natural or hydroponically conditions, respectively. They showed that under hydroponic exposure, uptake by roots appeared to supply the major fraction of Hg in leaves, probably due to the artificial nature of the growth system employed.

Table 2: Hg concentrations in fruits dry mass (DM) in either polluted chamber or control chamber experiments. Significant changes in fruit Hg concentration between the control and polluted substrates ($p < 0.05$) are indicated through lettering. Water content was measured then Hg concentrations in their fresh mass and fresh mass (kg) to be eaten daily by an adult of 60 kg to reach tolerate daily intake (TDI) for mercury were calculated.

Experiment	Fruit	Substrate	N	[Hg] ng.g ⁻¹ DM	Water content (%)	[Hg] ng.g ⁻¹ FM	TDI: ng/day/60 kg corporal mass	Fresh mass (kg)
Polluted atmosphere chamber	Pepper	Control	4	2.60 ± 0.358 a	95	0.13	12000	92.3
		Polluted	4	3.37 ± 0.244 a		0.168		71.4
	Tomato	Control	5	2.44 ± 0.496 a	93.4	0.161		74.5
		Polluted	6	2.76 ± 0.493 a		0.182		65.9
	Eggplant	Control	1	4.01	92.4	0.304		39.4
	Control atmosphere chamber	Pepper	Control	3	2.34 ± 1.49 a	92.3		0.18

Table 3: Overview of Hg concentration in edible plant biomass as influenced by plant species, local environment, and experimental conditions.

Experimental conditions	Species	Hg concentrations		Hg origin	Exposure time	References
		Soil ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Air (ng m^{-3})			
Natural conditions	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>acephala</i>			edible part (ng g^{-1})	56 days	
		450				
	<i>Allium ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i> L.			230	56 days	
	<i>Spinacia oleracea</i> L.			400	14 days	De Temmerman et al. 2009
	<i>Lactuca sativa</i> L.	10 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	20	100	14 days	
	<i>Cichorium endivia</i> L. subsp. <i>endivia</i>			200	28 days	
	<i>(Valerianella locusta</i> (L.) Laterr			280	28 days	
	<i>Cabbage Brassica oleracea</i>			228		
	<i>Chicory Cichorium intybus</i>			1,950	two growing seasons	
	<i>Parsley Petroselinum crispum</i>	33 to 484	not measured	373		Miklavčić et al. 2013
<i>Mangold Beta vulgaris</i>			362			
<i>Lettuce Lactuca sativa</i>			489	one growing season		
Close system growth chamber	<i>Oryza sativa</i>	2.8	19.6	81		
	<i>Oryza sativa</i>	1.3	21.1	20		
	<i>Zea mays</i> L.	1.2	15.5	68		
	<i>Glycine max</i>	0.8	9.3	43		Tang et al. 2015
	<i>Oryza sativa</i>	0.1	7.2	12		
	<i>Olea europaea</i> , L. (<i>Olive trees</i>)	6 to 8,889	2 to 6,892	18 to 162	mill tailings	Higueras et al., 2006, 2012
	<i>Brassica rapa</i> P.	0.09		210 to 430	control soil	
	<i>Brassica rapa</i> P.	39.4	not measured	170 to 900	HgCl ₂	Dunagan et al., 2007
	<i>Brassica rapa</i> P.	120		250 to 340	industrial contamination	
	<i>Zea mays</i> L.	0.025 to 0.552	2 to 50	0.6 - 2.7	HgCl ₂	Niu et al., 2011
<i>Triticum aestivum</i> L.						

Table 4: Hg in protein fractions of pepper leaves. Total Hg in the initial fresh biomass = 1570 ng. Protein concentrations were measured in the supernatant fractions by the Bradford method, but only estimated in the precipitate fractions ([Protein] precipitate = [Protein] total - [Protein] supernatant). Nd : not determined. Percentages of Hg in the different fractions (related to the total Hg) are provided in brackets.

Purification step	Additional treatment	Extract	Protein (mg)	Total Hg (ng)	Total Hg (ng/mg protein)
Step 1 : Extraction - centrifugation	---	Supernatant	144 mg	459 (29%)	3.2
	---	Pellet	nd	530 (34%)	nd
Step 2 : Acetone/TCA Precipitation	-DTT	Supernatant	25.5 (measured)	382.5 (56%)	15
		Precipitate	118.5 (estimated)	300.6 (44%)	2.53
	+DTT	Supernatant	22.8 (measured)	783 (95.1 %)	34.8
		Precipitate	121.2 (estimated)	40.5 (4.9%)	0.33

3.2. Evaluating the risk of consuming *Solanaceae* exposed to Hg

In the present work, we aimed at mimicking the transfer of Hg into aboveground tissues of *Solanaceae* plants in a urban and industrial environment context, to study the risk of growing edible crops in the vicinity of potentially Hg-contaminated atmospheric environments. We also included tobacco as a model plant for cigarette consumption. We further focused our work on the transfer of Hg into the edible part of species from the *Solanaceae* family. Hg concentrations in fruits (**Table 2**) reached ca. 3 ng g⁻¹ dry mass (equivalent to 0.1-0.3 ng g⁻¹ fresh mass), which was two orders of magnitude lower than concentrations measured in leaves (**Fig. 1**). As already found for leaf tissues, we did not notice significant differences in Hg concentrations of fruits grown on either the control or Hg-enriched substrate, under either the control or the Hg-enriched atmospheric condition in growth chambers. Similar Hg concentrations have been reported by [de Temmerman et al. \(1986\)](#) in tomato fruits (0.6 ng g⁻¹ fresh mass), sampled in urban gardens within a radius distance of 500-2000 m from a chlor-alkali plant. Similar Hg concentrations were also found in cereals, the content in grains of barley and wheat being about 3- to 10- times lower (1-2 ng g⁻¹) than that of the straw ([Patra and Sharma 2000](#)). Most of the studies reported that leaf edible crops (cabbage, chicory, lettuce) accumulated Hg at higher concentrations than seed (maize, soya, rice) edible crops, when grown in industrial /urban areas with Hg air concentrations (> 2 ng m⁻³) (**Table 3**).

We hypothesized that the low Hg content of fruit tissues might be due to the morphological structure of the epidermis in *Solanaceae* fruits. Indeed, [Weryszko-Chmielewska and Michałojć \(2012\)](#) showed that stomata areas are relatively rare at the surface of the fruit, which is also covered by a massive layer of cuticle, whereas surface of the leaves is covered by a higher stomata density. [Laacouri et al. \(2013\)](#) reached similar conclusions by showing correlations between stomata density and foliar Hg on a large range of mature deciduous trees exposed to Hg that only originated from the atmosphere. [De Temmerman et al. \(2009\)](#) have also hypothesized that the thick wax layer of leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum* L.) leaves plays probably a role in preventing direct Hg entry through the fruit epidermis. Root and stem tissues, as well as developing fruits are examples of organs and tissues that normally function as sinks ([Hopkins and Huner 2008](#)). Even though fruits are known to import photo-assimilates through phloem from the mature leaves, our data revealed that no massive translocation of Hg had occurred from plant mature leaves (source) to their fruits (sinks), which indicates that Hg would mostly be retained in leaf tissues and would be sequestered or chelated with biomolecules (i.e. amino acids, hydro soluble proteins, membrane proteins).

We therefore developed a protocol to measure Hg in the various fractions obtained from pepper leaves. We found that around 30% of the initial Hg was captured by pepper leaf tissues in the form of protein-chelated Hg, as revealed by differential extraction and purification (**Table 4**). As thiolate protein groups bond strongly with Hg compounds, we further tested the effect of DTT to a pepper leaf protein solution. In the absence of DTT, 44% of the Hg was recovered in the precipitated protein fraction (**Table 4**). When DTT was added to the protein fraction, less than 5% of the total initial Hg was detected in the protein precipitate, whereas the supernatant comprised more than 95% of the initial Hg. These data further support the fact that Hg is indeed actively incorporated into pepper tissues, through chelation mechanisms involving thiolate groups of proteins. We also measured inorganic methyl-Hg in the leaves of pepper and found that it was always under the detection limit. This contrast with poplar leaves, where around 7.5% of total Hg was in the form of methyl-Hg ([Maillard et al. 2016](#)). Additionally, we found a relatively low proportion (<1%) of Hg bound to the amino acid fraction.

Mench and Baize (2004) set the maximum regulatory Hg concentrations in plant commodities for food to 30 ng per g of fresh mass. Further, the acceptable human intakes for inorganic Hg compounds derived by ATSDR, IPCS and CSHPF provided a guidance value of 0.2 ng g⁻¹ body weight per day (USA ATSDR 1999 ; WHO/IPCS 2002 ; CSHPF 1996). Based on these assumptions, tolerate daily intake (TDI) of Hg for moderate adult corporal mass (60 kg) and fresh fruit mass (kg) to be eaten were calculated and reported in **Table 2**. Despite Hg accumulation in leaf tissues (**Fig. 1**), Hg contents of pepper, tomato and eggplant fruits were rather low, resulting in very high values for the quantities of fresh fruits to be eaten to reach the Hg TDI. As a plant of the *Solanaceae* family and major source of leaves for cigarette manufacturing, we also evaluated the risk of Hg-enriched tobacco leaves for cigarette consumption. Considering that i) a single cigarette may contain 1g of dry mass tobacco leaves and 2) the Hg concentrations measured in tobacco leaves (**Fig.1**), the TDI of Hg for moderate adult corporal mass (60 kg) can be easily reached by consuming only 21 cigarettes per day.

These data prompted us to conclude that the consumption of *Solanaceae* fruits grown in Hg-enriched environments represents no risk, as far as the Hg concentrations (around 2 ng m⁻³) in the atmosphere are similar to those reached in our experimental design (Assad et al. 2016). We however strongly recommend choosing the cultivation of fruit vegetable crops instead of leaf vegetables for urban gardening, in urban area potentially contaminated by Hg. Additionally, we do not recommend using the non-edible parts (i.e. leaves) of these fruit crops for feedstuff. The maximum Hg level allowed in animal feed is indeed 0.11 µg g⁻¹ dry mass (Directive, 2002), and this threshold value is clearly reached in our experimental design (**Fig. 1**), which would induce the transfer of Hg and its accumulation in the higher trophic levels of the food chain and hence causes indirect impacts on human health. Given other sources of Hg intake by humans (sea food, leaf vegetables, air respiration, and water tap), we also do not recommend the cultivation of tobacco in urban environment exposed to Hg for local consumption or tobacco industry purposes.

3.3. *Solanaceae* as biomonitors for atmospheric Hg ?

In the present study, we found that pepper leaves had the highest Hg content, especially under short exposure periods (**Fig. 1**). De Temmerman et al. (2007) reported that perennial ryegrass (*Lolium perenne* L. cv *Vigor*) exposed to Hg contaminated air (20 ng m⁻³) from June till November and sampled every 28 days accumulated an average of 200 ng Hg.g⁻¹ dry mass (except for October month reached to 550 ng.g⁻¹ dry mass) and considered this plant as a relevant biomonitor for Hg. Hg content of pepper leaves were 3-fold greater than those measured in ryegrass and 5-fold higher than those measured in woody species (for a review on that point, see our recent paper (Assad et al. 2016). These Hg concentrations in our species were also in the same range as those measured in other plants such as spinach and curly kale grown in the vicinity of a chlor-alkali plant, and are also considered as relevant accumulators to be used for biomonitoring purposes (De Temmerman et al. 2009). Although spinach and curly kale reached similar values obtained in our study, these vegetables were grown under an atmosphere containing 20 ng m⁻³ of Hg, whereas our *Solanaceae* plants were grown under an atmosphere containing 3-fold lower Hg concentrations. Pepper leaves might probably be considered as a more accurate plant species to reflect low Hg contamination levels than curly kale.

We used the method of De Temmerman et al. (2007) to determine the effect detection limits (EDL) and the biological detection limit (BDL). The EDL was three times the standard deviation added to the background value (considering that Hg concentration in pepper leaves grown in atmospheric Hg concentration below 2ng m⁻³ as a background value).

Table 5: Correlation between atmospheric Hg concentration in ambient air and the mercury concentration in different pepper leaves. Average background concentrations and standard deviation (Sd) (background = [Hg] in pepper leaves during exposure $<2 \text{ ng m}^{-3}$), effect detection limit (EDL) of Hg in pepper, and biological detection limit (BDL) of atmospheric Hg concentrations.

Pepper leaf age	n	Slope equation	R ²	Background (ng g ⁻¹)	Sd (ng g ⁻¹)	EDL (ng g ⁻¹)	BDL (ng m ⁻³)
young	5	$y = 0.0425x - 0.0302$	0.985	26.4	2.3	33.3	1.494
mature	5	$y = 0.0602x - 0.0514$	0.99	28.4	2.7	36.5	1.460
aged	5	$y = 0.0741x - 0.0625$	0.954	37.8	2.2	44.4	1.443

Calculating the averages and standard deviations for the three leaf ages, we found EDL values (**Table 5**) in the range (30–40 ng g⁻¹) of Italian ryegrass as mentioned in [De Temmerman et al. \(2007\)](#). From the regression equations provided in **Table 5**, BDL were derived from EDL values (**Table 5**). While the BDL of ryegrass exposed to an average Hg contaminated air of 20 ng m⁻³ for 28 days reached to 3.2 ng m⁻³, the BDL values for pepper (exposed to a 2 ng m⁻³ Hg-enriched atmosphere for 28 days) were much lower (**Table 5**), indicating that pepper leaves might be a more efficient biomonitor than ryegrass. In addition, as ryegrass is growing near the soil surface, it could be easily contaminated by soil particles, providing that the plants are growing on or in the neighbor of a Hg-enriched tailings dump, where Hg-contaminated particles might have been deposited. Indeed, Hg⁰ concentration in the air decreases with the height above the soil surface following a function ([Garcia-Sanchez et al. 2006](#); [Wallschläger et al. 2000](#)). According to this function, the Hg⁰ concentration in the air 1 m above the topsoil is almost half of that present in the first 5 cm above the soil surface. The selection of an adequate biomonitor should therefore be based on the structure of the aboveground part of the plant.

4. Conclusions

Our set of data revealed that plants from the *Solanaceae* family actively incorporate Hg from the atmospheric pool into their leaves, and solely through their leaves as already demonstrated for poplar. However, Hg levels in their fruits remained low and most of the time under detection limit of the Hg analyzer, which makes the consumption of these *Solanaceae* fruits within safety limits set by authorities, whereas the non-edible parts (i.e. leaves) cannot be used for feedstuff purposes because of exceeding the maximum Hg level allowed in animal feed. Based on our data, pepper leaves could be considered as a relevant Hg biomonitor in an urban ambient atmosphere, potentially contaminated by Hg, a scenario that might occur at the vicinity of e.g. chlor-alkali industrial site. However, the biomonitor status of pepper plants would need to be more fully elaborated under known and increasing Hg concentrations.

Acknowledgements

This work was supported by the French ANR Research Program (grant n° ANR ANR13-CD2I-0005 PHYTOCHEM) and by the ADEME (grant n° PROLIPHYT 1172C0053). Financial supports from the Région Franche-Comté and from the Pays de Montbéliard Agglomération to M.C. are acknowledged. M. Assad Ph-D grant was supported by the ministry of higher education of the Syrian Arab Republic. The authors declare no conflict of interest.

References

- Assad M, Parelle J, Cazaux D, et al (2016) Mercury uptake into poplar leaves. *Chemosphere* 146:1–7. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.11.103
- Bishop KH, Lee Y-H, Munthe J, Dambrine E (1998) Xylem sap as a pathway for total mercury and methylmercury transport from soils to tree canopy in the boreal forest. *Biogeochemistry* 40:101–113. doi: 10.1023/A:1005983932240
- Carrasco-Gil S, Siebner H, LeDuc DL, et al (2013) Mercury Localization and Speciation in Plants Grown Hydroponically or in a Natural Environment. *Environ Sci Technol* 47:3082–3090. doi: 10.1021/es303310t

- CSHPF (1996) Lead, Cadmium and Mercury in the diet: assessment and risk management. Tec &Doc, Lavoisier, Paris: p. 236 (in French).
- De Temmerman L, Claeys N, Roekens E, Guns M (2007) Biomonitoring of airborne mercury with perennial ryegrass cultures. *Environ Pollut* 146:458–462. doi: 10.1016/j.envpol.2006.07.002
- de Temmerman L, Vandeputte R, Guns M (1986) Biological monitoring and accumulation of airborne mercury in vegetables. *Environ Pollut Ser Ecol Biol* 41:139–151. doi: 10.1016/0143-1471(86)90089-9
- De Temmerman L, Waegeneers N, Claeys N, Roekens E (2009) Comparison of concentrations of mercury in ambient air to its accumulation by leafy vegetables: An important step in terrestrial food chain analysis. *Environ Pollut* 157:1337–1341. doi: 10.1016/j.envpol.2008.11.035
- Directive, (2002) /32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed.
- Dunagan SC, Gilmore MS, Varekamp JC (2007) Effects of mercury on visible/near-infrared reflectance spectra of mustard spinach plants (*Brassica rapa* P.). *Environ Pollut* 148:301–311. doi: 10.1016/j.envpol.2006.10.023
- Egler SG, Rodrigues-Filho S, Villas-Bôas RC, Beinhoff C (2006) Evaluation of mercury pollution in cultivated and wild plants from two small communities of the Tapajós gold mining reserve, Pará State, Brazil. *Sci Total Environ* 368:424–433. doi: 10.1016/j.scitotenv.2005.09.037
- Ericksen JA, Gustin MS, Schorran DE, et al (2003) Accumulation of atmospheric mercury in forest foliage. *Atmos Environ* 37:1613–1622. doi: 10.1016/S1352-2310(03)00008-6
- Fernández-Martínez R, Larios R, Gómez-Pinilla I, et al (2015) Mercury accumulation and speciation in plants and soils from abandoned cinnabar mines. *Geoderma* 253–254:30–38. doi: 10.1016/j.geoderma.2015.04.005
- Frescholtz TE, Gustin MS, Schorran DE, Fernandez GCJ (2003) Assessing the source of mercury in foliar tissue of quaking aspen. *Environ Toxicol Chem SETAC* 22:2114–2119.
- García-Sánchez A, Contreras F, Adams M, Santos F (2006) Airborne total gaseous mercury and exposure in a Venezuelan mining area. *Int J Environ Health Res* 16:361–373. doi: 10.1080/09603120600869315
- Higueras P, Amorós JA, Esbrí JM, et al (2012) Time and space variations in mercury and other trace element contents in olive tree leaves from the Almadén Hg-mining district. *J Geochem Explor* 123:143–151. doi: 10.1016/j.gexplo.2012.04.012
- Higueras P, Oyarzun R, Lillo J, et al (2006) The Almadén district (Spain): Anatomy of one of the world's largest Hg-contaminated sites. *Sci Total Environ* 356:112–124. doi: 10.1016/j.scitotenv.2005.04.042
- Hopkins WG, Huner NPA (2008) Introduction to Plant Physiology, 4th Edition. Wiley Global Education
- Kessler R (2013) Urban Gardening: Managing the Risks of Contaminated Soil. *Environ Health Perspect* 121:A326–A333. doi: 10.1289/ehp.121-A326
- Kim K-H, Lindberg SE, Meyers TP (1995) Micrometeorological measurements of mercury vapor fluxes over background forest soils in eastern Tennessee. *Atmos Environ* 29:267–282. doi: 10.1016/1352-2310(94)00198-T
- Laacouri A, Nater EA, Kolka RK (2013) Distribution and Uptake Dynamics of Mercury in Leaves of Common Deciduous Tree Species in Minnesota, U.S.A. *Environ Sci Technol* 47:10462–10470. doi: 10.1021/es401357z
- Lindberg SE, Hanson PJ, Meyers TP, Kim K-H (1998) Atmospheric Transport, Chemistry and Deposition of Mercury/Air/surface exchange of mercury vapor over forests—the need for a reassessment of continental biogenic emissions. *Atmos Environ* 32:895–908. doi: 10.1016/S1352-2310(97)00173-8
- Lodenius M (2013) Use of plants for biomonitoring of airborne mercury in contaminated areas. *Environ Res* 125:113–123. doi: 10.1016/j.envres.2012.10.014
- Maillard F, Girardclos O, Assad M, et al (2016) Dendrochemical assessment of mercury releases from a pond and dredged-sediment landfill impacted by a chlor-alkali plant. *Environ Res* 148:122–126. doi: 10.1016/j.envres.2016.03.034
- Mench M, Baize D (2004) Contamination des sols et de nos aliments d'origine végétale par les éléments en traces. *Courr Environ INRA* 52:31–56.
- Miklavčič A, Mazej D, Jačimović R, et al (2013) Mercury in food items from the Idrija Mercury Mine area. *Environ Res* 125:61–68. doi: 10.1016/j.envres.2013.02.008
- Millhollen, Obrist D, Gustin MS (2006b) Mercury accumulation in grass and forb species as a function of atmospheric carbon dioxide concentrations and mercury exposures in air and soil. *Chemosphere* 65:889–897. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.03.008

- Molina JA, Oyarzun R, Esbrí JM, Higuera P (2006) Mercury accumulation in soils and plants in the Almadén mining district, Spain: one of the most contaminated sites on Earth. *Environ Geochem Health* 28:487–498. doi: 10.1007/s10653-006-9058-9
- Moore CW, Castro MS (2012) Investigation of factors affecting gaseous mercury concentrations in soils. *Sci Total Environ* 419:136–143. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.12.068
- Mukherjee AB, Zevenhoven R, Brodersen J, et al (2004) Mercury in waste in the European Union: sources, disposal methods and risks. *Resour Conserv Recycl* 42:155–182. doi: 10.1016/j.resconrec.2004.02.009
- Niu Z, Zhang X, Wang Z, Ci Z (2011) Field controlled experiments of mercury accumulation in crops from air and soil. *Environ Pollut* 159:2684–2689. doi: 10.1016/j.envpol.2011.05.029
- Patra M, Sharma A (2000) Mercury toxicity in plants. *Bot Rev* 66:379–422. doi: 10.1007/BF02868923
- R Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Regier N, Larras F, Bravo AG, et al (2013) Mercury bioaccumulation in the aquatic plant *Elodea nuttallii* in the field and in microcosm: Accumulation in shoots from the water might involve copper transporters. *Chemosphere* 90:595–602. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.08.043
- Reis AT, Rodrigues SM, Araújo C, et al (2009) Mercury contamination in the vicinity of a chlor-alkali plant and potential risks to local population. *Sci Total Environ* 407:2689–2700. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.10.065
- Ribas A, Peñuelas J (2003) Biomonitoring of tropospheric ozone phytotoxicity in rural Catalonia. *Atmos Environ* 37:63–71. doi: 10.1016/S1352-2310(02)00696-9
- Samczyński Z, Dybczyński RS, Polkowska-Motrenko H, et al (2012) Two New Reference Materials Based on Tobacco Leaves: Certification for over a Dozen of Toxic and Essential Elements. *Sci World J*. doi: 10.1100/2012/216380
- Schmidt A-C, Steier S, Otto M (2009) Evaluation of the arsenic binding capacity of plant proteins under conditions of protein extraction for gel electrophoretic analysis. *Talanta* 77:1830–1836. doi: 10.1016/j.talanta.2008.10.027
- Shaw BP, Panigrahi AK (1986) Uptake and tissue distribution of mercury in some plant species collected from a contaminated area in India: Its ecological implications. *Arch Environ Contam Toxicol* 15:439–446. doi: 10.1007/BF01066412
- Staiger K (1983) On the Evaluation of Mercury Uptake by the Plant Shoot. *Arch Acker Pflanzenbau Bodenkd-Arch Agron Soil Sci* 27:279–286.
- Tang W, Cheng J, Zhao W, Wang W (2015) Mercury levels and estimated total daily intakes for children and adults from an electronic waste recycling area in Taizhou, China: Key role of rice and fish consumption. *J Environ Sci* 34:107–115. doi: 10.1016/j.jes.2015.01.029
- UNEP (2002) (United Nations Environment programme) Chemicals: Global mercury assessment. Geneva, Switzerland.
- USA ATSDR (1999) (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) Toxicological profile for mercury. Atlanta, USA.
- Wallschläger D, Herbert Kock H, Schroeder WH, et al (2000) Mechanism and significance of mercury volatilization from contaminated floodplains of the German river Elbe. *Atmos Environ* 34:3745–3755. doi: 10.1016/S1352-2310(00)00083-2
- Weryszko-Chmielewska E, Michałojć Z (2012) Anatomical traits of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) fruit. *Acta Agrobot* 64:181–188. doi: 10.5586/aa.2011.059
- WHO/IPCS (2002) (World Health Organisation, International Programme on Chemical Safety) Elemental mercury and inorganic mercury compounds. Concise International Chemical Assessment Document No 50, Geneva, Switzerland.
- Xu J, Bravo AG, Lagerkvist A, et al (2015) Sources and remediation techniques for mercury contaminated soil. *Environ Int* 74:42–53. doi: 10.1016/j.envint.2014.09.007

5.1.5 Conclusions

Dans ces études, nous avons clairement montré que l'entrée du Hg dans les plantes se fait exclusivement par voie atmosphérique. Les études précédentes concluaient que l'entrée de Hg se faisait par les racines via la voie du xylème, ces études s'étant essentiellement appuyées sur des expériences utilisant le HgCl₂ comme source du Hg (Tableau 1 dans l'article) soit dans des systèmes hydroponiques (Esteban et al., 2008), soit dans les sols enrichis en HgCl₂ (Millhollen et al., 2006a, b). Pour les conditions hydroponiques, il est bien documenté que la barrière apoplastique est moins sélective que dans les racines se développant dans des sols (Redjala et al., 2011). De plus, des concentrations élevées en HgCl₂ se sont révélées cytotoxiques, ce qui induit une perméabilité accrue des membranes cellulaires (revue dans Javot et Maurel, 2002). Ces conditions de cultures facilitent le transfert radial du Hg vers les cellules du xylème dans les racines puis aux feuilles par la sève du xylème. Ericksen et al. (2003), Gustin Ericksen et al., (2004) ont conclu que l'entrée du Hg dans les feuilles de peuplier s'est effectuée par la voie atmosphérique; cependant, leurs données ont été obtenues à partir d'expériences réalisées dans des conditions contrôlées dans un sol modifié avec des résidus miniers et mélangés pour produire les concentrations souhaitées du Hg dans ce sol.

Laacouri et al. (2013) ont formulé des conclusions similaires aux nôtres en montrant des corrélations entre la densité des stomates et le Hg foliaire sur une large gamme d'arbres à feuilles caduques matures exposés au Hg exclusivement atmosphérique. En mesurant le Hg dans divers compartiments (plancher forestier, sol minéral, bois et aiguilles de pin), Fleck et al. (1999) ont interprété leurs données comme indiquant que le Hg dans le tissu végétal provenait directement de l'atmosphère et non du sol. Cependant, les concentrations du Hg dans le sol dans leurs études étaient de 2 à 3 fois inférieures à nos concentrations en Hg dans le substrat étudié. Nos données valident ces conclusions dans un contexte naturel et ce malgré une contamination élevée en Hg du substrat. Cependant, cette conclusion doit être prise avec précaution car nos données peuvent ne pas refléter une situation générale pour toute combinaison sol/plante. Enfin, nos données suggèrent que les feuilles de peuplier peuvent être un indicateur pertinent de la contamination du Hg dans l'atmosphère, que le sol soit ou non contaminé en Hg.

La recapture active du Hg (0) et/ou du Hg (II) par les feuilles de peuplier est confirmée en mesurant les différentes formes du Hg dans les feuilles de peuplier.

La proportion de MMHg mesurée dans les feuilles de peuplier était d'environ 7,5% du Hg total. De plus, 14 à 26% du Hg intracellulaire était lié à la fraction protéique et 40-75% était

lié à la paroi cellulaire et aux composants membranaires, ce qui indiquait que le Hg a bien pénétré dans les cellules des feuilles de peuplier, et n'était donc pas simplement adsorbé à la surface des tissus foliaires.

En ce qui concerne la voie du transfert du Hg dans les feuilles des Solanacées étudiées, nous avons obtenu des conclusions similaires à celles obtenues avec le peuplier, à savoir une entrée du Hg exclusivement par voie atmosphérique. De plus, dans cette espèce et surtout pour le poivron et le tabac, les feuilles ont montré de très bonnes capacités pour l'accumulation du Hg atmosphérique. Par conséquent, la culture du tabac devrait être évitée dans les zones urbaines et industrielles. De même, les feuilles de poivron pourraient être considérées comme un biomoniteur pertinent de la contamination en Hg atmosphérique, et notamment en milieu urbain où subsistent des activités industrielles potentiellement émettrices de Hg. La réglementation récente qui impose la réduction des émissions de Hg (par exemple remplacement des électrodes à Hg par des membranes) laisse à penser que le risque associé diminuera dans les prochaines décennies. Seules les zones de stockage de résidus enrichis en Hg pourraient constituer des sources potentielles de Hg et leur surveillance pourraient passer par la mise en place de dispositifs de biosurveillance (plants de Solanacées), dont il reste à démontrer la supériorité en terme de sensibilité par rapport aux méthodes de mesures actuelles.

La recapture active du Hg (0) et/ou du Hg (II) par les feuilles de poivron est confirmée par la mesure des différentes formes du Hg dans ces tissus foliaires. En effet, la quantité de MMHg dans les feuilles de poivron reste indétectable, à l'inverse des données obtenues pour les feuilles de peuplier, plus 30% du Hg total dans les feuilles de poivron était lié à la fraction protéique et moins de 1% du Hg total était lié à la fraction d'acides aminés. En revanche, étant données leurs très faibles teneurs en Hg qui ne sont pas liées aux teneurs en Hg atmosphérique, les fruits des Solanacées ne présentent pas de risque quant à leur consommation, pour peu que les conditions soient similaires à celles qui prévalent dans nos expérimentations, et donc dans des limites de sécurité fixées par les autorités. Inversement, les parties non comestibles (i.e. les feuilles) des Solanacées ne devraient pas être utilisées pour le fourrage car elles dépassent le niveau maximal de Hg autorisé dans l'alimentation animale ([Directive, 2002](#)).

5.2 **Chapitre 2** : Mettre en évidence le **transfert d'ETMs** à partir de sols contaminés chez des **espèces d'intérêt agronomique**.

5.2.1 Préambule

Nous avons montré que les habitants aux alentours des sites pollués sont potentiellement exposés aux poussières chargées en ETMs et issues de ces sites. Cette exposition pourrait être obtenue par inhalation ou par l'ingestion de plantes d'intérêt agronomique. Les jardins urbains ont récemment connu un développement rapide. Cependant, le risque lié au transfert d'éléments toxiques de sites potentiellement émetteurs doit être évalué. L'exposition par l'ingestion pourrait être obtenue par deux processus 1) consommation de légumes exposés et non ou mal lavés (Izquierdo et al., 2015) ou 2) consommation de légumes contaminés ayant absorbés les ETMs stockés à l'intérieur des tissus comestibles. En effet, l'accumulation des ETMs dans les légumes dépend de plusieurs facteurs : l'espèce végétale, l'organe et l'environnement auquel ils sont exposés (Douay et al. 2012; Finster et al. 2004). De ce fait, nous avons effectué une analyse multi-élémentaire sur deux sites différemment contaminés (Thann : une décharge de minerai du titane contaminé par le Cr et Mn ; Fresnes : zones utilisées pour un dépôt des sédiments de curage contaminé par le Pb, le Cd et le Zn), avec plusieurs espèces végétales comestibles à fruits et/ou à feuilles (concombre, poivron, chou et laitue), et cultivées directement, soit sur substrat de Thann comparé à un substrat contrôle soit sur deux types de sol de Fresnes (sol 1 et sol 2 faiblement et fortement contaminés, respectivement). Pour ces expériences, nous avons également utilisé le peuplier comme espèce modèle ligneuse, implantée sur ces sites dans le cadre des projets ANR-BIOFILTREE et ADEME-PROLIPHYT. Les données recueillies pour cette espèce ligneuse nous serviront de données de base pour l'interprétation des données de terrain, sur des arbres plus âgés. Nous avons également émis l'hypothèse que les feuilles de peuplier refléteraient quantitativement le risque global observé sur l'ensemble d'espèces pour tous les éléments. Cette expérience en pots a été conduite en conditions contrôlées et est considérée comme un scénario maximisé d'exposition aux ETMs. Le but du travail est d'étudier la capacité des différentes espèces végétales à incorporer des ETMs dans leur biomasse comestible et d'estimer le risque sanitaire lié à l'ingestion de leurs parties comestibles. Nos résultats ont été présentés et discutés dans deux manuscrits, le manuscrit 4 concerne le site de Thann et le manuscrit 5 concerne le site de Fresnes, présentés dans les pages suivantes.


5.2.2 Accumulation d'ETMs chez des espèces végétales comestibles et chez le peuplier cultivés sur substrat issu d'un site de dépôt de déchets industriels

Le jardinage urbain a récemment connu un développement rapide. Cependant, le risque de transfert d'éléments toxiques de sites industriels voisins doit être évalué. Nous avons réalisé une analyse multi-élémentaire avec plusieurs espèces végétales comestibles (concombre, poivron, chou et laitue) et le peuplier cultivé directement sur une décharge de minerai de titane comme scénario maximal d'exposition. En dépit des concentrations élevées de Ca, Fe, Mn et Ti dans le sol résultant du procédé industriel, nous n'avons pas enregistré d'accumulation plus élevée de ces éléments dans les parties comestibles des cultures ou dans les feuilles de peuplier cultivées sur du gypse rouge, comparativement au sol témoin. Seules les concentrations de soufre étaient plus élevées dans les plantes cultivées sur le gypse rouge, en particulier pour le chou. L'analyse des composantes principales pour les plantes cultivées sur du gypse rouge indique que le soufre et le Mn sont accumulés par des espèces végétales différentes de celles qui accumulent le Cd, le Cu et le Zn. Le peuplier a un transfert significativement plus élevé de S et Cr que le témoin et apparaît comme une espèce d'arbre appropriée pour la surveillance du transfert d'élément à la végétation dans ce contexte industriel. En comparant nos données aux recommandations de dose journalière admissible, nous avons démontré le faible risque de culture directement sur le substrat industriel dans un scénario maximal d'exposition, à l'exception du Cr pour lequel la toxicité dépend de la forme biodisponible. Cependant, nous n'avons pas tenu compte des effets cumulatifs des divers éléments car il n'existe pas de recommandations directrices actuelles et des recherches supplémentaires sont nécessaires pour aborder cette question.

Manuscrit 4 : *Je suis en 1^{er} auteur dans cet article publié, j'ai réalisé les principales étapes de ce travail : mise en place des dispositifs expérimentaux, suivi des expériences de la plantation à la récolte, traitement statistique des données obtenues, rédaction de l'article, en collaboration avec mes co-auteurs.*

Manuscrit et statut	Référence
Chapitre 2. Mettre en évidence le transfert d'ETMs à partir de sols contaminés chez des espèces d'intérêt agronomique	
Manuscrit 4. Publié.	Assad M, Tatin-Froux F, Chalot M., Parelle J, (2017) Accumulation of trace elements in edible crops and poplar grown on a titanium ore landfill. Environmental Science and Pollution Research. Sous presse (IF 2015 : 2,8).

Accumulation of trace elements in edible crops and poplar grown on a titanium ore landfill

Mohamad Assad¹ · Fabienne Tatin-Froux² · Damien Blaudez³ · Michel Chalot^{1,4}  · Julien Parelle²

Received: 11 June 2016 / Accepted: 11 December 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Urban gardening has recently experienced rapid development; however, the risk of the transfer of toxic elements from neighboring industry needs to be evaluated. We performed a multi-elemental analysis with several common edible crops (cucumber, pepper, cabbage, and lettuce) and poplar grown directly on a titanium ore landfill as a maximized scenario of exposure. Despite elevated concentrations of soil Ca, Fe, Mn, and Ti resulting from the industrial process, we did not register higher accumulation of these elements in the edible parts of crops or in poplar leaves grown on red gypsum compared with the control soil. Only S concentrations were higher in plants grown on the red gypsum, especially for cabbage. The principal component analysis among elements for plants grown on red gypsum indicated that S and Mn were accumulated by different plant species than Cd, Cu, and Zn.

The poplar clone had a significantly higher transfer of S and Cr than the control and is a suitable tree species for monitoring element transfer to vegetation in this industrial context. By comparing our data with tolerable daily intake (TDI) recommendations, we demonstrated the low risk of cultivating edible crops directly on an industrial substrate in a maximized scenario of exposure, except for Cr, for which the toxicity depends on the bioavailable form. However, we did not consider the cumulative effects of the various elements because there are no current guidelines, and further research is needed to address this question.

Keywords Titanium industry · Urban gardening · Trace metals · ICP-AES · Transfer · Tolerable daily intake · Vegetable crops · Poplar

Responsible editor: Elena Maestri

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11356-016-8242-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Julien Parelle
michel.chalot@univ-fcomte.fr

- ¹ Laboratoire Chrono-Environnement, UMR CNRS 6249, Université de Bourgogne Franche-Comté, Pôle Universitaire du Pays de Montbéliard, 4 Place Tharradin, BP 71427, 25211 Montbéliard, France
- ² Laboratoire Chrono-Environnement, UMR CNRS 6249, Université de Bourgogne Franche-Comté, 16 Route de Gray, 25030 Besançon Cedex, France
- ³ Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, Faculté des Sciences et Technologies, UMR 7360 CNRS-Université de Lorraine, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France
- ⁴ Faculté des Sciences et Technologies, Université de Lorraine, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France

Introduction

Urban gardening has recently experienced rapid development worldwide (Kessler 2013). It provides urban citizens with access to cheaper food crops and physical activity and fosters the development of social relations (Tei et al. 2010) and is therefore expected to be healthy. However, food crops from urban sites can be exposed to higher levels of trace metals (TMs) than rural vegetable crops (Shinn et al. 2000; Alloway 2004) because soil pollution can originate from the local background (Jean-Soro et al. 2014), industrial activities (Douay et al. 2012), traffic burden (Säumel et al. 2012), or prevailing wind, which carries soil particles from polluted sites to the city (Dragović et al. 2014). Accumulation of TMs in soils can have adverse effects on environmental health, crop growth, and food quality and is a major concern because of the potential health risk to the local population if directly ingested or

transferred through food (Alam et al. 2003; Hough et al. 2004; Bermudez et al. 2011).

Plants can take up TMs from soil through their root systems, transport them through the xylem to their shoots, and accumulate them in the tissues of all organs. TM sources, accumulation, transfer, health risk, and the effects of TMs on the nutritional status of food plants have been widely studied and recently reviewed (Khan et al. 2015). In most cases, TM transfer to the edible parts of vegetables is poor. For instance, McBride et al. (2014) found a weak relationship between vegetables and soil metal concentrations (Pb, Ba, and Cd), while soil characteristics, such as pH, organic matter content, and other soil properties, were the most influential on metal bioavailability. Douay et al. (2012) reported heterogeneous TM contents when comparing different crop species exposed to Cd, Pb, and Zn in urban gardens in northern France. Similar results were described by Säumel et al. (2012) with various vegetables exposed to traffic pollution. Moreover, Finster et al. (2004) found that the Pb content depended on the edible part of the vegetables. Patra and Sharma (2000) concluded, when comparing the TM contents of seeds from different origins and varieties, that a complex pattern of environmental and genetic factors contribute to the specific metal contents of individual harvests. At the level of varieties, environmental factors (i.e., pollution nature and degree) have a stronger impact on the specific accumulation of TMs than do genetic factors. Conversely, at the species or genus level, the accumulation of TMs was essentially dominated by genetic factors.

When humans consume metal-enriched food plants, the metal contents can exceed the food safety limits set by authorities. The potential risks of TMs on health, which is highly variable among TMs, have to be taken into consideration. An important factor of human contamination is the direct ingestion of particles from the plant growth substrate from unwashed or poorly washed vegetables (Izquierdo et al. 2015). For washed vegetables growing on potentially polluted substrates, contradictory results have been reported. Several studies addressing the consumption of vegetables grown on, or near, contaminated sites concluded that exposure through vegetable consumption can lead to an intake above toxicological threshold levels (Cui et al. 2004; Xu et al. 2013). Highly studied TMs, such as Cd, can be transferred to the edible part of plants and become potentially toxic (Jolly et al. 2013). Conversely, studies on other elements indicate that this exposure does not result in intake above the safety limit, even in areas with significant pollution (Sipter et al. 2008; Pelfrène et al. 2013; Adamo et al. 2014). However, many authors concluded that garden soils should be analyzed for TM contents before cultivating vegetables.

Potential transfer from soil to vegetable edible parts is commonly described for Pb, Cd, Zn, and As (Finster et al. 2004; Defoe et al. 2014; Massaquoi et al. 2015; Xu et al. 2015), but other elements, such as Cr, Ti, and S, are less studied.

Pollution by Ti and its impact on human health are poorly documented, although Ti is widely used in microtechnics, cosmetics, and pigments in paints. The extraction of Ti by the sulfuric process (such as that developed by the Cristal Company in France) leads to the production of red gypsum, produced by limestone neutralization of wastewater from the TiO₂ plant, which contains mainly gypsum (CaSO₄), Fe oxides/hydroxides, and other metal (e.g., Mn, Cr) oxides/hydroxides. Residual TMs are also present in red gypsum originating from the ore used in this industry, reflecting the content of the ore extracted in the mines. Red gypsum is stored in open landfills, and TMs contained in red gypsum may be emitted into the air, largely as aerosols or associated with the particulate fraction (Alloway 2004), and further deposited in neighboring suburban/urban areas by precipitation in rainfall or by gravitational fallout. Air, therefore, provides a route for the contamination of adjacent gardens used for the production of edible vegetables.

The major objective of our study was to compare the accumulation patterns of TMs in different vegetables grown directly onto red gypsum to maximize the exposure route. In this context, we designed an experiment with two leafy vegetables (lettuce and cabbage) and two fruit vegetables (pepper and cucumber). In addition, as one of the major ecological concerns around the TiO₂ industrial site is the reduction of dust emission enriched in TMs, a large-scale field trial using woody species (including poplar) has been recently implemented onto the industrial site, to test the impact of the woody cover on the phytostabilization potential. However, as there was no background information on uptake of TMs from such a substrate, we have added poplar to the list of studied plants, as the present work might represent a first step towards the understanding of TM transfer from soil to aboveground woody biomass. We will also consider poplar as a control to test whether this model plant would reflect the transfer of TMs in the different vegetables. Poplar proved indeed to be a useful bioindicator to assess pollution of the urban environment (Laureysens et al. 2004; Celik et al. 2010; Sluchyk et al. 2014). We hypothesized that the pattern of TM accumulation could vary among vegetable species exposed to red gypsum. We monitored the major macronutrients, micronutrients, and TMs to further estimate the exposure risk and compared our data with the recommended tolerable daily intake (TDI) values provided by public agencies.

Materials and methods

Substrate preparation and physicochemical analyses

Red gypsum, produced by the neutralization of wastewaters with limestone from a TiO₂ plant (Cristal Thann, France, sulfuric process), was collected on a landfill. This red gypsum-enriched

substrate was diluted with sand (1/1, v/v) prior to use to limit compaction in pot experiments, and this sand/red gypsum mixture is referred to as “red gypsum” throughout the text, tables, and figures. The control substrate was composed of loam (Brill Soil GmbH, Georgsdorf, Germany) and sand (1/1, v/v) and is referred to as the “loam” control substrate throughout the text. Fertilizers (N/P/K 11/11/18, Osmocote Exact®, Heerlen, Netherlands, detailed composition: N 11%, P 4.8%, K 14.9%, Fe 0.25%, Mn 0.03%, B 0.01%, Cu 0.05%, Mo 0.01%, Zn 0.01%) were added to each pot (1.5 g/pot) at the beginning of the experiment to ensure non-limiting plant nutrition in the different substrates. Substrate subsamples were collected before adding fertilizers and dried for further physicochemical analysis, as described below.

The physicochemical characteristics that were measured in the present study included the particle size fractions (French Norm X 31-107), pH (ISO 10390 French Norm), organic status (OM, ISO 14235 French Norm), and exchangeable elements (Online Resource 1). To determine the available fractions of elements from the two substrates (Table 1), 5 g of 2 mm sieved soil was dried at 60 °C for 48 h and incubated with 50 mL of 10 mM calcium chloride under agitation (40 rpm) for 2 h at room temperature. The mixture was first filtered with ash-free filters, passed through a 0.45- μ m mesh, and acidified at 2% (v/v) with HNO₃ prior to inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES, Thermo Fischer Scientific, Inc., Pittsburg, USA) analysis.

Growth and sampling conditions

Seeds from two leafy food crops, lettuce (*Lactuca sativa* Batavia kamikaze) and cabbage (*Brassica oleracea* var. Mozart F1), and two fruit food crops, cucumber (*Cucumis sativus* var. Raider F1) and pepper (*Capsicum annuum* var. Alby F1), were allowed to germinate for 2 weeks in a loam substrate and planted after clearing the roots to ensure root contact with the new substrate. Poplar cuttings (*Populus trichocarpa* \times *Populus maximowiczii* var. Skado) were directly planted in the new substrate. Twelve plants per species were planted in 0.5-L pots in both loam and red gypsum substrates. The climatic conditions of the growth chamber were as follows: daylight for 16 h (250–300 μ mol/m²/s), day temperature of 22 °C, night temperature of 18 °C, and day and night humidity of 30%. One half of the plants were collected after 32 days of growth and the other half after 56 days. The whole leaves of the five species and the fruits for cucumber and pepper were sampled. The fruit and leaf tissues were carefully washed in deionized water to remove potential substrate particles, placed in separate paper bags, and dried at 40 °C before analysis.

Elemental analysis

The extraction of TMs from plant tissues (using 1.75 mL HNO₃ + 0.5 mL H₂O₂) and substrates (using 2 mL HNO₃ +

5 mL HCl) was performed after milling the samples (125 mg) and mineralization in closed tubes placed in a block digestion system (DigiPREP, SCP Sciences, Courtaboeuf, France). Gradual heating was used to achieve a final temperature of 100 °C (total run of 265 min). Then, ultrapure water (Millipore Milli-Q Integral 3 system, Molsheim, France) was added to a final volume of 12.5 mL. Finally, filtration to 1 μ m was performed. The element concentrations were determined using ICP-AES (Radial ICAP 6500 Model, Thermo Fischer Scientific, Courtaboeuf, France), and all samples were analyzed in triplicate with certified reference materials, including oriental basma tobacco leaves (INCT-OBTL-5, LGC Promochem, Molsheim, France), *Cucumis sativus* fruits (IPE-817, LGC Promochem, Molsheim, France), and loamy clay soil (CRM052, LGC Promochem, Molsheim, France). The quantification limits and percent recoveries are given in Online Resource 2.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R 3.2.0 software (R Development Core Team 2015). All tests were considered significant when $p < 0.05$. Differences in element contents among species, sampling dates, organs (leaf and fruit), and soil types were analyzed by a two-way ANOVA followed by Tukey-Kramer mean comparison test. To respect the postulates of ANOVA, the element contents were log transformed. All categories containing at least one individual below the limit of quantification (LQ) were removed from the statistical analysis according to Helsel (2010), who considered that replacement methods induce statistical bias, particularly when the sample size is small ($n = 6$ in this study). The removed data were denoted “<LQ” in the “Results and discussion” section, and the mean and the number of samples above the LQ were noted. When fruit or leave production was too low ($n \leq 2$), the category was removed from the statistical analysis, and the mean and the number of samples were noted. For all of the categories included in the statistical analysis, we reported the mean \pm the standard deviation.

For the principal component analysis, all data from the fruits and leaves were pooled into two data frames (one per soil type), and data below the LQ were considered to be null.

Results and discussion

Substrate characterization

The industrial process led to the production of red gypsum that was characterized by elevated levels of macronutrients Ca and S, micronutrients Mn and Fe, and TMs Cr, Ni and Ti, whereas it was heavily depleted in P and K (Table 1). The macronutrients Ca and S were found at much higher concentrations

Table 1 Mean element concentrations (mg/kg) in the red gypsum and in the loam, CaCl₂-extractable fractions, and worldwide means in soils

	Al	Ca	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn
Red gypsum (5)	5384 ± 64	125,524 ± 2020	<LQ	19.6 ± 0.3	174 ± 2	49.9 ± 0.3	45,799 ± 655	584 ± 10	977 ± 9	2955 ± 33
CaCl ₂ -extractable fraction in the red gypsum (5)	<LQ	nd	<LQ	<LQ	1.09 ± 0.02	<LQ	0.245 ± 0.04	112.8 ± 3.4	7.03 ± 0.12	<LQ
Loam (4)	2739 ± 470	21,753 ± 1277	0.23 ± 0.02	4.2 ± 0.49	4.11 ± 0.83	23.36 ± 2.05	5839 ± 1317	1889 ± 82.34	1081 ± 45.87	219.4 ± 17.06
Indicative world means in soils	10,000–50,000 ^a	400–35,000 ^b	0.41 ^a	11.3 ^a	60 ^a	38.9 ^a	35,000 ^a	400–5000 ^b	600–15,000 ^b	488 ^a
	Mg	Na	Ni	P	S	Si	Ti	Zn		
Red gypsum (5)	977 ± 9	48.7 ± 0.7	21.0 ± 0.1	103 ± 3	90,869 ± 858	328 ± 20	6245 ± 90	99.5 ± 0.8		
CaCl ₂ -extractable fraction in the red gypsum (5)	7.03 ± 0.12	10	<LQ	<LQ	3714 ± 122	nd	nd	<LQ		
Loam (4)	1081 ± 45.87	193.7 ± 10.6	6.29 ± 1.07	705.29 ± 53.89	1640 ± 81.81	504.1 ± 13.52	23.61 ± 2.84	35.53 ± 6.41		
Indicative world means in soils	600–15,000 ^b	na	2.9 ^a	100–5000 ^b	100–10,000 ^b	257,000 ^a	7038 ^a	70 ^a		

Means ± standard deviation. The number of replicates is indicated in brackets. Data below the limit of quantification are denoted <LQ
nd not determined, *na* no available data (Na is mainly measured as exchangeable fraction in most studies)

^a Indicative worldwide means in soils were reported from Kabata-Pendias (2011)

^b Indicative worldwide means in soils were reported from Logsdon (2008)

(Table 1) than those in the loam substrate (21,753 and 1640 mg/kg dry weight (dw) for Ca and S, respectively) and the worldwide averages (Table 1). However, only 4% of the total S content of the red gypsum was measured in the CaCl₂ extractable (this fraction was not determined for Ca because the extraction method used CaCl₂ as extractant). K and P were present in lower concentrations in the red gypsum (Table 1) than in the loam (1889 and 705 mg/kg dw for K and P, respectively). Additionally, P was not detected in the CaCl₂-extractable fraction of the red gypsum (Table 1).

The micronutrient Mn was found at much higher concentrations in the red gypsum than with the worldwide average (Table 1) and in loam (219 mg/kg dw) by at least one order of magnitude. Fe was also present at much higher concentrations in the red gypsum than loam (5839 mg/kg dw), but on the same order of magnitude as the worldwide average. To a lesser extent, Cu was also more concentrated in the red gypsum than in the loam (23 mg/kg dw). The Zn concentration was higher than the worldwide average but was within the range of natural variability. Co and Ni were found at levels comparable to the worldwide average. Among all micronutrients, only Fe showed a quantifiable CaCl₂-extractable fraction (Table 1).

The TMs Cr and Ti from the industrial process were more highly concentrated in the red gypsum than the loam (4 and 24 mg/kg dw for Cr and Ti, respectively) by at least one order of magnitude (Table 1). Ti was measured in the same range as the worldwide average, while the Cr concentration in the red gypsum was 3-fold higher than the worldwide average (Table 1). However, in red gypsum, a detectable CaCl₂-extractable fraction was found only for Cr. The TM Al was found in a lower concentration in the red gypsum than in the control, and the CaCl₂-extractable fraction was less than the LQ value. Similarly, no detectable Cd was measured in the red gypsum (Table 1).

Overall, the addition of fertilizers, as described in the “Materials and method” section, counteracted the depletion of both macronutrients and micronutrients necessary for plant growth. There was no significant difference in pH, ranging from 7.6 to 7.9, between loam and red gypsum.

Element concentrations in plant tissues

The concentrations of leaf Ca, K, Mg, and Na were not significantly different between plants grown on loam or red gypsum (Online Resource 3). The addition of fertilizer prevented nutritional deficiencies and may have counteracted the negative effects of TMs, as often observed (Matraszek et al. 2016). The results were of the same order of magnitude as those provided in the Ciqual tables (French food composition table) for edible tissues of salad, cabbage, pepper, and cucumber for nutritional elements (Ca, K, Mg, Na, P) (Anses 2013). However, we observed significantly higher concentrations of S in the leaves of all plant species, from 2 to 10 g/kg dw for

plants grown on loam to 3–24 g/kg dw when grown on red gypsum (Table 2 and Online Resource 3). This result is in agreement with the bioavailability of S in red gypsum (Table 1). Cabbage had a significantly higher S concentration than other species, reaching 24 g/kg dw after 32 days of growth (Table 2). Plants from the *Brassicaceae* family, i.e., cabbage, are known for their capacity to accumulate S compounds (e.g., Ishida et al. 2014). The Na concentrations were significantly higher in the leafy vegetables cabbage and lettuce than in non-leafy edible crops or poplar.

We did not find noticeable differences between vegetables grown on loam or red gypsum substrate, regardless of plant species, for the accumulation of the micronutrients Co, Cu, Mn, Si, and Zn (Table 3 and Online Resource 3), despite high differences, e.g., for Mn, between substrates. These values were comparable to those from the Ciqual tables for plant edible tissues for Mn, Cu, and Zn (Anses 2013). Those elements were mostly provided by the fertilizer (and the sand for Si) in our experimental context. The Fe content was significantly higher in poplar and pepper leaves and cucumber fruits when grown on red gypsum compared with loam (Table 3 and Online Resource 3). However, the recorded values were on the same order of magnitude and were comparable to data from the Ciqual tables for edible tissues (Anses 2013). The Mn concentrations were significantly lower in the poplar leaves and fruit tissues of pepper and cucumber compared with the leaf tissues of edible plants (Online Resource 3). In contrast with other micronutrients, the Ni concentration was significantly higher in plants grown on red gypsum, with concentrations ranging from 1 to 3 mg/kg for poplar, lettuce, cucumber leaves, and fruit, compared with plants grown on loam substrate (<LQ, 0.53 mg/kg dw) in most samples (Online Resource 3).

Cr was significantly differentially accumulated among species and substrates (Table 4 and Online Resource 3). The Cr concentrations in plants (leaves and fruits) were at detectable levels when grown on red gypsum and were below the LQ (0.6 mg/kg dw) in most of the samples grown on the loam substrate. Cr was partly CaCl₂ extractable on the red gypsum. When measured in detectable amounts, Cr was significantly higher in cucumber fruits after 56 days of growth (26 mg/kg dw) than for other plants and sampling times (Table 4 and Online Resource 3). Concerning Ti, we observed a 14-fold increase in the red gypsum compared with loam, although the maximum increase in plants was found for cucumber leaves with a 1.7-fold increase in Ti content, when grown on red gypsum (Table 4). The plants do not seem to accumulate significant amounts of Ti, which is generally considered as poorly bioavailable (Cornelis et al. 2014). However, these data need to be taken with caution, as there is no certified Ti in the reference materials. Two other TMs, Cd and Al, although less relevant to our industrial context, were detected in some instances but did not differ between plants growing on red gypsum or loam.

Table 2 Median (min–max) concentration values of macronutrients (g/kg) in the leaves of food crops and poplar and in the fruits of cucumber and pepper

Species	Substrate	Organ	Age (days)	Ca	K	Mg	Na	P	S
Poplar	Loam	Leaves	32	8.4 (6.4–9.1) e	21.3 (18.5–34.4) defg	1.9 (1.7–2.3) j	<LQ	2.5 (2.0–5.9) efgh	3.1 (2.5–4.0) hi
	Red gypsum	Leaves	56	7.6 (6.4–10.1) e	16.2 (13.4–28.8) gh	1.7 (1.3–2.7) j	<LQ	1.4 (1.0–3.4) h	<LQ
Cabbage	Loam	Leaves	32	10.5 (6.5–12.4) de	17.9 (11.6–23.4) gh	2.1 (1.4–2.9) ij	<LQ	2.1 (1.4–3.5) gh	3.8 (2.3–5.4) fgh
	Loam	Leaves	56	10.8 (1.2–107.3) cde	25.6 (18.1–35.1) cdefg	<LQ	<LQ	1.9 (1.1–3.3) gh	4.0 (3.3–8.3) efgh
Lettuce	Loam	Leaves	32	30.9 (28.1–35) ab	20.4 (16.7–23.9) fgh	3.5 (3.3–4) fg	1.7 (1.2–2.3) b	4.0 (3.2–5.4) cdef	7.6 (7.1–8.2) cde
	Red gypsum	Leaves	56	26 (21.4–34.9) abc	17.8 (14.8–27.8) gh	3.1 (2.4–4.2) fgh	2.5 (2.0–2.7) ab	2.8 (2.3–3.6) efgh	6.7 (5.0–8.6) cde
Pepper	Loam	Leaves	32	43.1 (29.8–55) a	19.3 (17–28.2) fgh	3.2 (2.6–4.2) fgh	1.6 (1.3–2.2) b	3.1 (2.7–3.5) efgh	23.7 (16.8–32.3) a
	Loam	Leaves	56	7.9 (7.0–8.9) n = 2	12.3 (11.4–13.2) n = 2	4.0 (3.0–5.0) n = 2	1.3 (0.9–1.8) n = 2	1.5 (1.4–1.6) n = 2	40.2 (19.8–60.6) n = 2
Cucumber	Loam	Leaves	32	9.2 (8.4–10.8) e	32.8 (27.2–42.9) bcdef	3.0 (2.8–3.8) ghi	2.8 (2.3–4.5) ab	5.1 (4.2–6.0) cde	2.1 (1.7–2.3) i
	Red gypsum	Leaves	56	16.4 (13.6–18.1) bcde	22.3 (15.4–29.8) efg	4.8 (4.3–5.5) def	4.3 (3.2–5.2) a	4.6 (3.2–5.3) cdef	<LQ
Pepper	Loam	Leaves	32	10.9 (8.5–14.5) cde	63.3 (35.6–78.8) a	3.5 (2.3–5.9) efg	2.2 (0.9–4.1) ab	4.7 (2.7–6.3) cde	3.6 (2.6–4.3) gh
	Loam	Leaves	56	18.1 (8.1–46.2) abcde	37.4 (29.3–47.2) abcde	2.9 (2.6–4.1) ghi	2.5 (2.4–3.4) ab	3.5 (2.2–4.6) defg	3.2 (2.7–3.8) hi
Cucumber	Loam	Leaves	32	11.8 (10.1–15.2) de	38.4 (34.6–42.2) abcde	3.5 (3.2–4.2) fg	0.01 (0.01–0.04) g	6.0 (4.6–7.0) cd	3.2 (3.0–3.8) hi
	Loam	Fruits	56	24.7 (17.8–31.7) abcde	47.3 (39.6–56.5) ab	6.0 (5.2–7.1) bcd	0.01 (0.005–0.01) g	14.8 (8.9–18.5) a	6.0 (4.7–7.8) def
Pepper	Loam	Leaves	32	2.6 (2.1–3.1) f	36.1 (34.1–37.6) abcde	2.1 (2.0–2.4) hij	0.06 (0.03–0.07) f	5.4 (5.3–5.8) cde	2.9 (2.6–3.2) hi
	Red gypsum	Leaves	56	26.9 (22.2–32.2) abc	55.8 (45.1–72.4) a	5.3 (4.4–7.2) cde	0.05 (0.03–0.06) f	2.0 (1.4–2.5) gh	8.0 (6.2–9.2) bcd
Cucumber	Loam	Leaves	32	12.0 (9.6–14.3) n = 2	34.4 (32.8–35.9) n = 2	1.8 (1.6–2.0) n = 2	<LQ	3.6 (3.0–4.1) n = 2	3.6 (3.1–4.2) n = 2
	Loam	Fruits	56	17 (13.3–20.4) bcde	10.7 (6.4–13.3) ij	4.6 (3.8–5.6) defg	0.11 (0.09–0.28) e	2.0 (1.5–3.0) gh	5.8 (4.7–7.1) defg
Pepper	Loam	Leaves	32	43.6 (26–72.1) a	6.1 (4.1–10.5) j	10.6 (7.6–13.4) a	0.11 (0.04–0.21) ef	2.2 (1.6–3.0) gh	10.2 (8.6–12.5) bc
	Loam	Fruits	56	32.3 (26.6–40.8) ab	49.8 (43.7–55.7) ab	11.5 (10.5–12) a	0.3 (0.2–0.5) cd	11.4 (9.4–13.6) ab	8.1 (6.5–11.4) bcd
Cucumber	Loam	Leaves	32	13.4 (10.9–25.2) bcde	46.9 (25.1–57.4) abc	5.9 (4.0–7.7) bcde	0.5 (0.3–0.6) c	9.1 (5.9–9.6) abc	5.1 (2.8–5.8) efgh
	Loam	Fruits	56	24.1 (18.1–43.4) abc	12.5 (8.9–20.3) hi	8.7 (7.2–11.9) ab	0.2 (0.1–0.3) de	2.1 (1.3–5.5) fgh	13.7 (9.3–16.7) b
Pepper	Loam	Leaves	32	10.7 (3.1–17.2) e	14.3 (7.9–22.9) ghi	7.3 (6.7–10.0) abc	<LQ	2.1 (1.3–2.4) gh	10.1 (8.1–19.1) bc
	Loam	Fruits	56	20.3 (15.0–24.9) abcde	59.9 (48.3–87.8) a	8.6 (7.9–12.1) ab	0.5 (0.2–0.8) c	6.8 (3.0–9.9) bcd	8.7 (7.9–13.7) bcd

Data are shown as a function of substrate type (loam or red gypsum) after 32 and 56 days of growth. Different letters indicate significant differences among categories for the element (two-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test). For each of the following cases, the category was removed from the statistical analysis and noted in italics (according to the recommendation of Helsel 2010): When all of the values were below the limit of quantification, the data are denoted <LQ; when a part of the values were below the limit of quantification, the mean and the number of plants above and below the limit of quantification are noted; when the number of samples was too low ($n \leq 2$), the mean and the number of plants are noted

Table 3 Median (min–max) concentration values of micronutrients (mg/kg) in the leaves of food crops and poplar and in the fruits of cucumber and pepper

Species	Substrate	Organ	Age (days)	Co	Cu	Fe	Mn	Ni	Si	Zn
Poplar	Loam	Leaves	32	0.54 <i>n</i> = 1	8.3 (6.2–21.8) ab	33.6 (25.7–56.9) efg	27.2 (10.1–29.3) i	0.67 (0.57–3.61) <i>n</i> = 3 <LQ <i>n</i> = 3	56.8 (38.0–60.2) cdef	48.1 (31.2–136.9) abc
				<LQ <i>n</i> = 5	4.6 (2.2–10.9) cdef	24.4 (18.3–46.1) i	43.0 (28.5–54.2) fgh	1.13 (0.61–1.66) <i>n</i> = 2 <LQ <i>n</i> = 4	60.2 (52.2–66.0) bcde	23.3 (20.5–55.8) efg
Red gypsum	Leaves	32	0.50 <i>n</i> = 1	9.1 (6.1–15.4) ab	36.9 (17.0–90.0) efg	32.2 (20.1–56.6) hi	1.4 (0.7–3.2) b	48.6 (37.5–58.5) def	41.1 (31.0–94.2) bcd	
			<LQ <i>n</i> = 5	6.3 (4.6–17.4) abcd	64.6 (48.7–122.2) bcde	43.8 (19.8–48.8) fghi	1.4 (1.2–2.2) ab	61.5 (51.5–70.8) bcde	25.5 (15.6–29.9) efg	
Cabbage	Loam	Leaves	32	0.51 (0.45–0.57) <i>n</i> = 2	2.3 (1.8–2.7) g	28.6 (23.8–33) ghi	98.6 (68.2–108.1) abcd	<LQ	55.8 (50.8–61.7) bcde	22.8 (16.4–27.6) fghi
				<LQ <i>n</i> = 2	2.0 (1.8–2.8) g	26.0 (16.3–58.2) hi	67.1 (51.8–80.1) cdef	<LQ	57.6 (52.7–59.9) bcde	14.6 (11.4–21.2) i
Red gypsum	Leaves	32	0.42 <i>n</i> = 1	3.1 (2.8–4.3) efg	29.4 (27.7–43.1) fghi	90.1 (83.4–128.0) abcd	0.72 (0.60–0.84) <i>n</i> = 2 <LQ <i>n</i> = 4	43.7 (34.9–67.2) ef	13.4 (13.1–14.2) i	
			<LQ <i>n</i> = 5	2.9 (2.6–3.1) <i>n</i> = 2	62.4 (37.9–86.9) <i>n</i> = 2	142.4 (119.5–165.3) <i>n</i> = 2	1.21 <i>n</i> = 1 <LQ <i>n</i> = 1	59.9 (51.7–68.0) <i>n</i> = 2	10.9 (8.5–13.4) <i>n</i> = 2	
Lettuce	Loam	Leaves	32	<LQ	3.4 (3.0–4.5) efg	68.6 (57.0–102.9) bcd	122.2 (102.2–157.3) ab	<LQ	63.0 (56.2–73.1) bcd	30.7 (26.8–35.9) cdefg
				<LQ	2.9 (2.5–3.5) fg	48.5 (33.9–66.0) cdefgh	98.9 (80.7–164.6) abc	<LQ	67.1 (60.2–87.0) bc	18.3 (14.2–22.1) ghi
Red gypsum	Leaves	32	<LQ	8.3 (5.1–12.5) abc	85.5 (60.7–164.6) abc	95.9 (77.3–159.4) abc	1.0 (0.8–1.5) b	40.3 (28–54.7) f	27.3 (25.4–39.1) defg	
			<LQ	4.9 (3.9–6.1) bcdef	93.5 (73.2–123.1) abc	89.5 (61.7–116.1) abcd	1.7 (1.1–2.3) ab	48.9 (43.1–72.9) bcdef	16.7 (10.2–22.0) hi	
Pepper	Loam	Leaves	32	0.77 (0.49–0.90) b	2.2 (1.6–2.6) g	48.6 (39.1–61.9) defghi	55.7 (48.5–67.8) defg	0.63 <i>n</i> = 1 <LQ <i>n</i> = 5	59.0 (51.8–69.8) bcde	43.5 (32.6–50.7) bcde
				<LQ <i>n</i> = 5	1.69 (1.39–2.41) a	52.1 (43.7–61.0) cdefg	146.2 (122.4–168.6) a	<LQ	63.6 (57–74.9) bcd	87.5 (72.0–130.4) a
Red gypsum	Leaves	32	0.75 (0.49–1.07) b	7.8 (7.4–17.0) abc	104.9 (89.3–166.6) ab	95.1 (77.1–159.9) abc	1.3 (0.9–2.0) b	42.1 (35.1–67.8) ef	40.0 (31.2–46.7) bcdef	
			<LQ <i>n</i> = 2	7.9 (6.7–9.1) <i>n</i> = 2	71.7 (65.2–78.3) <i>n</i> = 2	17.8 (15.1–20.5) <i>n</i> = 2	0.7 (0.6–0.7) <i>n</i> = 2	4.3 <i>n</i> = 1 <LQ <i>n</i> = 1	15.2 (15.2–15.3) <i>n</i> = 2	
Cucumber	Loam	Leaves	32	<LQ	3.3 (2.5–8.7) defg	31.1 (25.4–43.0) fghi	42.1 (34.1–49.7) efg	<LQ	60.5 (56.1–75.9) bcde	29.6 (22.1–47.1) cdefg
				<LQ	2.7 (2.4–3.5) fg	45.7 (33.1–58.7) defghi	118.1 (71.4–167.2) abc	<LQ	55.0 (50.6–71.3) bcde	47.7 (40.4–62.4) bcd
Red gypsum	Leaves	32	0.48 <i>n</i> = 1	7.3 (6.9–10) abc	68.6 (59.5–79.3) bcde	40.7 (33.9–49.4) fgh	<LQ	102.2 (81.1–152.8) a	70.9 (63.1–78.5) ab	
			<LQ <i>n</i> = 5	5.9 (4.6–6.4) abcdef	46.4 (28.8–58.5) efg	39.2 (21.2–51.0) ghi	0.55 <i>n</i> = 1 <LQ <i>n</i> = 3	81.6 (63.9–97.5) ab	38.5 (28.1–43.6) bcdef	
Red gypsum	Leaves	32	<LQ <i>n</i> = 5	4.4 (3.2–8.6) bcdef	43.1 (39.1–66.7) defghi	69.9 (42.9–135.6) bcde	1.4 (0.7–3.7) ab	64.2 (45.6–71.4) bcde	32.2 (18.4–47.3) cdefg	
			<LQ	4.2 (3.8–5.8) cdefg	92.2 (63.6–131.5) abcd	45.8 (33.5–58.3) efg	1.5 (0.95–1.96) ab	60.1 (55.9–70.5) bcde	18.6 (13.0–25.5) ghi	
Red gypsum	Leaves	32	<LQ	10.7 (8.5–13.1) a	145.6 (114.6–239.4) a	26.7 (23.5–38.9) hi	3.4 (1.9–3.6) a	67.1 (58.3–79.1) bcd	60.5 (29.8–63.9) abcd	

Data are shown as a function of substrate type (loam or red gypsum) after 32 and 56 days of growth. Different letters indicate significant differences among categories for the element (two-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test). For each of the following cases, the category was removed from the statistical analysis and noted in italics (according to the recommendation of Helsel 2010): When all of the values were below the limit of quantification, the data are denoted <LQ; when a part of the values were below the limit of quantification, the mean and the number of plants above and below the limit of quantification are noted; when the number of samples was too low (*n* ≤ 2), the mean and the number of plants are noted

Table 4 Median (min–max) concentration values of trace elements (mg/kg) in the leaves of food crops and poplar and in the fruits of cucumber and pepper

Species	Substrate	Organ	Age (days)	Al	Cd	Cr	Ti
Poplar	Loam	Leaves	32	2.97 <i>n</i> = 1 <LQ <i>n</i> = 5	0.41 (0.36–0.65) a	<LQ	1.02 (0.84–1.05) h
			56	4.14 <i>n</i> = 1 <LQ <i>n</i> = 5	0.23 (0.20–0.42) abc	<LQ	1.05 (0.86–1.31) gh
Cabbage	Red gypsum	Leaves	32	4.3 (4.0–4.8) bc	0.41 (0.32–0.52) a	<LQ	1.1 (0.7–1.2) gh
			56	4.7 (3.2–21.1) <i>n</i> = 3 <LQ <i>n</i> = 1	0.28 (0.27–0.39) abc	4.8 (3.4–8.1) bc	1.8 (1.5–1.9) bcdef
Lettuce	Loam	Leaves	32	6.7 (5.1–7.1) abc	0.07 (0.06–0.18) e	<LQ	2.2 (2.1–2.3) abc
			56	4.9 (3.8–6.2) bc	0.06 (0.05–0.07) <i>n</i> = 2 <LQ <i>n</i> = 4	<LQ	2.2 (2.0–2.3) abc
Pepper	Red gypsum	Leaves	32	5.7 (5.0–7.2) abc	0.07 (0.06–0.08) e	2.5 (2.2–4.6) c	2.5 (2.3–2.9) ab
			56	8.4 (7.5–9.4) <i>n</i> = 2	0.06 (0.05–0.06) <i>n</i> = 2	11.6 (4.8–18.4) <i>n</i> = 2	3.9 (3.4–4.3) <i>n</i> = 2
Cucumber	Loam	Leaves	32	4.8 (4.1–49.3) abc	0.15 (0.14–0.17) cde	<LQ	1.2 (1.1–4.4) defg
			56	6.1 (4.4–22.1) abc	0.13 (0.09–0.81) bcd	<LQ	1.8 (1.6–2.3) abcde
Pepper	Red gypsum	Leaves	32	3.8 (3.4–5.0) c	0.21 (0.18–0.24) bcd	0.89 <i>n</i> = 1 <LQ <i>n</i> = 5	1.2 (1.0–1.4) fgh
			56	4.4 (3.6–5.6) bc	0.1 (0.08–0.13) de	6.1 (4.4–13.1) bc	2.0 (1.5–2.3) abcde
Cucumber	Loam	Leaves	32	4.4 (3.0–5.3) bc	0.16 (0.11–0.24) cd	<LQ	1.3 (1.2–1.5) efigh
			56	7.0 (5.8–8.3) abc	0.18 (0.17–0.27) bcd	<LQ	2.1 (1.7–2.3) abcd
Pepper	Fruits	Fruits	56	5.2 (3.8–6.5) <i>n</i> = 2 <LQ <i>n</i> = 3	<LQ	<LQ	<LQ
			32	6.5 (5.6–8.9) abc	0.33 (0.24–0.40) ab	0.90 (0.89–0.93) d	2.1 (1.8–2.5) abc
Cucumber	Loam	Leaves	32	3.50 <i>n</i> = 1 <LQ <i>n</i> = 1	0.08 (0.07–0.09) <i>n</i> = 2	4.7 (4.4–5.0) <i>n</i> = 2	0.8 (0.6–1.0) <i>n</i> = 2
			56	5.2 (4.4–5.4) bc	<LQ	<LQ	1.7 (1.5–1.9) cdef
Pepper	Loam	Leaves	32	11.1 (7.4–14.5) a	<LQ	<LQ	2.5 (2.0–3.0) ab
			56	6.3 (5.2–8.8) abc	<LQ	2.18 <i>n</i> = 1 <LQ <i>n</i> = 4	<LQ
Cucumber	Red gypsum	Leaves	32	4.8 (4.3–4.9) <i>n</i> = 3 <LQ <i>n</i> = 1	<LQ	0.66 (0.64–0.69) <i>n</i> = 2 <LQ <i>n</i> = 2	<LQ
			56	6.9 (5.9–11.2) abc	0.19 (0.07–0.27) cd	1.12 (0.91–1.33) <i>n</i> = 2 <LQ <i>n</i> = 4	2.3 (1.8–2.7) abc
Pepper	Loam	Leaves	32	6.9 (5.4–8.5) abc	<LQ	9.3 (5.3–15.3) bc	2.6 (2.5–3.3) a
			56	10.3 (6.9–15.1) ab	<LQ	20.3 (12.3–49.0) a	2.4 (1.8–3.2) abc

Data are shown as a function of substrate type (loam or red gypsum mix) after 32 and 56 days of growth. Different letters indicate significant differences among categories for the element (two-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test). For each of the following cases, the category was removed from the statistical analysis and noted in italics (according to the recommendation of Helsel 2010): When all of the values were below the limit of quantification, the data are denoted <LQ; when a part of the values were below the limit of quantification, the mean and the number of plants above and below the limit of quantification are noted; when the number of samples was too low (*n* ≤ 2), the mean and the number of plants are noted

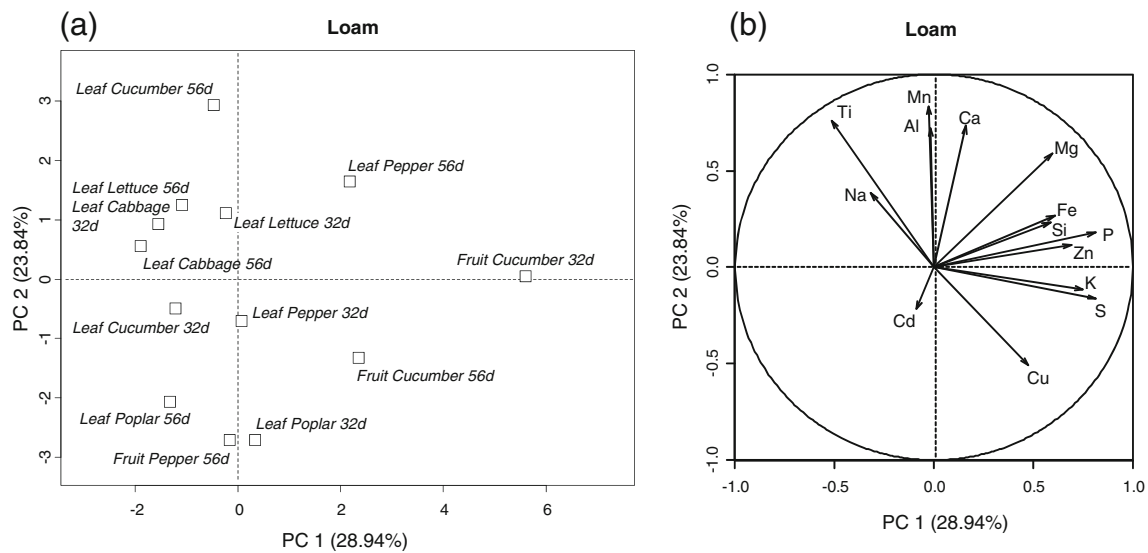


Fig. 1 Principal component analysis among elements for plants grown on loam. **a** Projection of plant species, organ, and times series on principal components 1 and 2. **b** Projections of element vectors on principal components 1 and 2

With regard to our data, we could postulate that the selection of edible plants for urban gardening in the vicinity of industry should favor those plants that do not accumulate Cr and S, which have the strongest potential to transfer to the edible tissues. We effectively observed differences among species for these elements, but none of the tested species could be selected for gardening because of the low transfer of Cr.

Correlation among elements

The two principal components of the PCA indicate that some elements strongly drove the dispersion of the plant species (Figs. 1a, b and 2a, b). For instance, the presence of high S

in the red gypsum separates cabbage from the rest of the species (Fig. 2a, b). The presences of elevated amounts of Cr in the red gypsum also separate the cucumber fruits from the rest of the species and tissues. The presence of higher amount of Cd in the poplar leaves also isolated this species from the other species. We observed a correlation between S and Ti; however, the lack of certified values for Ti in the reference materials does not allow us to conclude on this correlation. Clustering of Al, S, Si, and Ti was also found by Pii et al. (2015) with barley, tomato, and cucumber shoots.

We also observed that species with high levels of Cd and Zn (leaves of poplar, pepper, and lettuce) differed from those accumulating S (and possibly Ti) (leaves of cabbage, fruits,

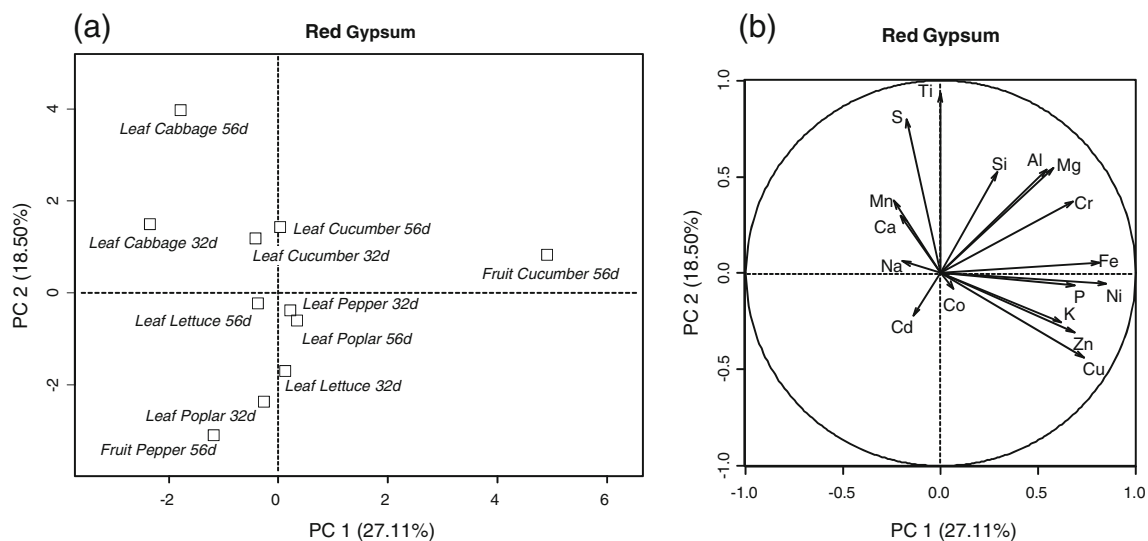


Fig. 2 Principal component analysis among elements for plants grown on red gypsum. **a** Projection of plant species, organ, and times series on principal components 1 and 2. **b** Projections of element vectors on principal components 1 and 2. Elements in red are relevant to the industrial context

and leaves of cucumber). As observed in a previous study (McBride et al. 2014), Cu, Ni, and Zn are positively correlated because of the existence of membrane transporters that non-specifically carry these elements. Other antagonisms between elements were observed. As supported by our data (Figs. 1 and 2), Ca and Mn have antagonistic effects on Cu and Zn uptake (Kabata-Pendias 2011); however, the synergetic effect of Ca on Mg suggested by Baxter et al. (2009, 2012) was not evidenced. Although we classified Ti in the TM category, Ti has been shown to improve the quality and yield of several fruits and vegetables, e.g., by compensating N deficiency (Haghighi et al. 2012). These authors found that the application of Ti to tomato plants increased nutrient uptake under suboptimal (N deficient) conditions.

We therefore found that the selection of food crops based on their capacity to prevent accumulation of toxic elements, such as Cd and Zn, found in common industrial contexts would allow the selection of plants accumulating less-studied elements, such as Mn and S, for urban gardening in the vicinity of this specific industrial context.

Tolerable daily intake of elements

Titanium, mainly present as TiO₂ in our industrial context, has no toxicological reference values due to a lack of data. However, carcinogen and genotoxic effects on reproduction have been proposed and require further investigation (see ANSES 2014, for a detailed report). For S, the absence of a TDI is because, until 2014, no toxic effect was demonstrated due to ingestion of this element. Most of the safety datasheets for elemental commercial sulfur preparations indicate an LD₅₀ for rats up to 5000 mg S/kg corporal mass. The risk of ingestion of Ti has not been clearly established to date and should consider the same species that accumulate S.

Approximately 600–1000 g fresh mass of cabbage consumption would be necessary to reach the TDI for Ca and Mn. This value did not significantly change for plants grown on the red gypsum compared with the control (Table 5). These results indicate a species effect and not an effect of excess Ca and Mn in the polluted substrate. Despite of its high concentration in red gypsum, the Fe (with a low bioavailability) concentrations did not reach the TDI in vegetables. Cr reached the TDI, particularly in cucumber, but the toxicity of this element is highly dependent on its redox state, which was not addressed in the present study. For the other measured elements with high concentrations in the red gypsum, consumption of more than kilograms of vegetables per day would be required to reach the TDIs (Table 5). We therefore did not find any risk to human health resulting from direct ingestion of the studied food crops for the analyzed elements, for which a TDI has been defined by public agencies. Our results are in agreement with Adamo et al. (2014), who did not find a risk to human health due to vegetables grown in soil containing a high

Table 5 Fresh mass (kg) to be eaten daily by an adult of 60 kg to reach the tolerable daily intake (TDI) for each element

Substrate	Al	Ca	Cd	Co	Cr VI	Cr III	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Ni	P	Si	Zn
Cabbage fresh mass (kg)	77	0.568	4.2	>1.4	>2.19	>938	24	11	1.644	1019	0.936	5	>8	6	9	10
Red gypsum	36	1.184	>2.2	>1.4	0.467	200	16	10	1.504	1015	0.635	7	>8	6	11	12
Lettuce fresh mass (kg)	97	2.198	3.6	>3.2	>5.00	>2143	41	14	3.165	1564	1.285	7	>19	10	17	20
Red gypsum	19	1.651	8.6	>3.2	0.408	175	26	7	1.902	2385	1.605	10	6	12	21	21
Cucumber fresh mass (kg)	>77	3.189	>7.1	>4.4	>1.25	>3000	30	22	2.269	1802	5.311	82	30	7	18	13
Red gypsum	116	1.546	>7.1	>4.4	0.164	67, 644	15	6	1.582	1149	6.899	82	5	9	25	9
Dry air bone (g)	60	2500	0.06	0.084	0.21	90	8.4	30	5000	530	10	2000	0.72	3000	84	25
TDI mg/day/60 kg corporal mass	60	2500	0.06	0.084	0.21	90	8.4	30	5000	530	10	2000	0.72	3000	84	25
Source	FAO/WHO (1989)	EFSA (2006)	EFSA (2009)	Baars et al. (2001)	INERIS (2005)	Baars et al. (2001)	Baars et al. (2001)	EFSA (2006)	EFSA (2006)	SCF (1993)	WHO (2003)	WHO (2003)	WHO (2003)	EFSA (2005)	EFSA (2006)	EFSA (2006)

The value and source of the TDI used for the calculation are shown at the bottom of the table. The water contents used for the calculation were recorded on a subset of samples (*n* = 6, cabbage 84%, lettuce 93%, cucumber 95%). Data are shown after 56 days of growth, except for cabbage (32 week of growth) because it did not grow sufficiently on the polluted substrate (*n* < 6). No data are provided for S and Ti as there are no reported TDI. When at least one measurement was below the limit of quantification, the fresh mass is noted as higher than the fresh mass for the mean of quantifiable data; when all data were below the limit of quantification, the fresh mass is noted as higher than the fresh mass for the limit of quantification (see Tables 2 and 3 for details). Only total Cr was measured in our study but appears as Cr VI and Cr III in this table, as there are two distinct TDIs. Shading indicates <1 kg of fresh mass. Italic numbers indicate the dry mass (g) of airborne deposits of the polluted soil to be accidentally ingested daily by an adult of 60 kg to reach the TDI for each element

concentration of toxic metal for a set of agricultural and polluted soils. However, we did not consider the cumulative effects or other forms of the various elements because there are no current guidelines, and further research is needed to address this question.

Concerning the industrial soil used in our study, by calculating the quantity of soil needed to reach the TDI for Co, Cr, and Mn through direct ingestion of soil particles, we found that low quantities might induce risk to human health (Table 5). Warming et al. (2015) found that ingestion of polluted soil causes health risks, which can be avoided by covering polluted bare soil and washing and/or peeling vegetables grown on the substrate. In addition, Nabulo et al. (2010) suggested that hazard quotient values depend on site-specific factors, including trace metal loading, vegetable type, and whether the harvested material is washed prior to consumption. Similarly, Ferri et al. (2015) demonstrated that unwashed spinach had high metal concentrations compared to washed spinach. Therefore, to lower the risk of urban gardening, the selection of vegetables should be accompanied by a public awareness of the importance of washing and peeling vegetables.

In contrast with the antagonism found in food crop species for S and Cd, poplar leaves significantly accumulated S compared with plants growing on loam, and a high transfer of Cd (on loam and red gypsum) was found. This is in agreement with previous studies, where poplar leaves were proposed as suitable monitors of TM transfer at the seasonal level in plants (e.g., Madejón et al. 2004; Abreu et al. 2008; Migeon et al. 2009).

Conclusions

The ICP-AES multi-element approach demonstrates that different edible plants (and the model poplar plant) have different patterns of accumulation of potentially toxic elements in the industrial context of titanium extraction. This approach, which was designed to maximize the transfer from soil particles to plants, indicates that the selection of plants for urban gardening would affect the associated risk to human health. In our study, the highest values of TMs accumulated from the gypsum red were recorded in cucumber fruits for Cr and in cabbage leaves for S. A detailed speciation of Cr forms would be required in this industrial context to precisely assess the risk of ingestion. In addition, the risk of direct ingestion should be investigated in further studies. In addition, the patterns of element transfer to poplar leaves indicate that this tree species is a suitable candidate to monitor element transfer to vegetation in this industrial context. The present data on poplar will be very useful for further interpretations of the large-scale field trial and are also clearly of relevance for comparisons with edible plant species.

Acknowledgments This work was supported by the French National Research Agency [PHYTOCHEM ANR-13-CDII-0005-01], the French Environment and Energy Management Agency [PROLIPHYT ADEME-1172C0053], the Région Franche-Comté [Environnement-Homme-Territoire 2014-069], and the Pays de Montbéliard Agglomération [13/070-203-2015]. M. Assad's PhD grant was supported by the Ministry of Higher Education of the Syrian Arab Republic. We acknowledge Dr. Nadia Morin-Crini and Caroline Amiot for the ICP-AES analysis and Dr. Lisa Ciadamidaro for the soil pH measurements. We thank Jean Michel Colin (CRISTAL Co.) for providing us with access to the experimental site.

Compliance with ethical standard

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Abreu SN, Soares AMVM, Nogueira AJA, Morgado F (2008) Tree rings, *Populus nigra* L., as mercury data logger in aquatic environments: case study of an historically contaminated environment. *Bull Environ Contam Toxicol* 80:294–299. doi:10.1007/s00128-008-9366-0
- Adamo P, Iavazzo P, Albanese S et al (2014) Bioavailability and soil-to-plant transfer factors as indicators of potentially toxic element contamination in agricultural soils. *Sci Total Environ* 500–501:11–22. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.08.085
- Alam MGM, Snow ET, Tanaka A (2003) Arsenic and heavy metal contamination of vegetables grown in Samta village, Bangladesh. *Sci Total Environ* 308:83–96. doi:10.1016/S0048-9697(02)00651-4
- Alloway BJ (2004) Contamination of soils in domestic gardens and allotments: a brief overview. *Land Contamination & Reclamation* 12: 179–188. doi:10.2462/09670513.658
- ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire) (2013) Tables CiquaL. French food composite table. <https://pro.anses.fr/TableCIQUAL/>. Accessed 29 February 2016.
- ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire) (2014) Évaluation des risques liés aux nanomatériaux. Enjeux et mise à jour des connaissances. <http://www.alimentation.sante.org/wp-content/uploads/2014/05/AP2012sa0273Ra.pdf>. Accessed 29 February 2016.
- Baars AJ, Theelen RMC, Janssen PJCM, Hesse JM, van Apeldoorn ME, Meijerink MCM, Verdam L, Zeilmaker MJ (2001) Re-evaluation of human-toxicological maximum permissible risk levels. *RIVM Report* 711701025.
- Baxter I, Hermans C, Lahner B et al (2012) Biodiversity of mineral nutrient and trace element accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0035121
- Baxter I, Hosmani PS, Rus A et al (2009) Root Suberin forms an extracellular barrier that affects water relations and mineral nutrition in *Arabidopsis*. *PLoS Genet*. doi:10.1371/journal.pgen.1000492
- Bermudez GMA, Jasan R, Plá R, Pignata ML (2011) Heavy metal and trace element concentrations in wheat grains: assessment of potential non-carcinogenic health hazard through their consumption. *J Hazard Mater* 193:264–271. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.07.058
- Celik S, Yuçei E, Celik S et al (2010) Carolina poplar (*Populus x canadensis* Moench) as a biomonitor of trace elements in Black Sea region of Turkey. *J Environ Biol Acad Environ Biol India* 31: 225–232
- Cornelis G, Hund-Rinke K, Kuhlbusch T et al (2014) Fate and bioavailability of engineered nanoparticles in soils: a review. *Crit Rev Environ Sci Technol* 44:2720–2764. doi:10.1080/10643389.2013.829767

- Cui YJ, Zhu YG, Zhai RH, Chen DY, Huang YZ, Qiu Y, Liang JZ (2004) Transfer of metals from soil to vegetables in an area near a smelter in Nanning, China. *Environ Int* 30(6):785–791. doi:10.1016/j.envint.2004.01.003
- Defoe PP, Hettiarachchi GM, Benedict C, Martin S (2014) Safety of gardening on lead- and arsenic-contaminated urban brownfields. *J Environ Qual* 43:2064–2078. doi:10.2134/jeq2014.03.0099
- Douay F, Pelfrène A, Planque J et al (2012) Assessment of potential health risk for inhabitants living near a former lead smelter. Part 1: metal concentrations in soils, agricultural crops, and homegrown vegetables. *Environ Monit Assess* 185:3665–3680. doi:10.1007/s10661-012-2818-3
- Dragović R, Gajić B, Dragović S et al (2014) Assessment of the impact of geographical factors on the spatial distribution of heavy metals in soils around the steel production facility in Smederevo (Serbia). *J Clean Prod* 84:550–562. doi:10.1016/j.jclepro.2014.03.060
- EFSA (European Food Safety Authority) (2006) Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals by the scientific panel on dietetic products. Nutrition and allergies (NDA) and Scientific Committee on Food (SCF).
- EFSA (European Food Safety Authority) (2009) Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European commission on cadmium in food. *The EFSA Journal* 980:1–139
- FAO/WHO (1989) Aluminium. In: Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. Thirty-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food additives. World Health Organization (WHO Food Additives Series 24), Geneva, pp113–154.
- Ferri R, Hashim D, Smith DR et al (2015) Metal contamination of home garden soils and cultivated vegetables in the province of Brescia, Italy: implications for human exposure. *Sci Total Environ* 518–519: 507–517. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.02.072
- Finster ME, Gray KA, Binns HJ (2004) Lead levels of edibles grown in contaminated residential soils: a field survey. *Sci Total Environ* 320: 245–257. doi:10.1016/j.scitotenv.2003.08.009
- Haghighi M, Hediarian S, Texeira da Silva JA (2012) The effect of titanium amendment in N-withholding nutrient solution on physiological and photosynthesis attributes and micronutrient uptake of tomato. *Biol Trace Elem Res* 150:381–390
- Helsel D (2010) Much ado about next to nothing: incorporating nondetects in science. *Ann Occup Hyg* 54:257–262. doi:10.1093/annhyg/mep092
- Hough RL, Breward N, Young SD et al (2004) Assessing potential risk of heavy metal exposure from consumption of home-produced vegetables by urban populations. *Environ Health Perspect* 112:215–221. doi:10.1289/ehp.5589
- INERIS (2005) Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques : Chrome et ses dérivés. DRC-01-05590-00DF253.doc, Version N°2. www.ineris.fr/substances/fr/substance/getDocument/2739, Accessed 29 February 2016.
- Ishida M, Hara M, Fukino N et al (2014) Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. *Breed Sci* 64:48–59. doi:10.1270/jsbbs.64.48
- Izquierdo M, De Miguel E, Ortega MF, Mingot J (2015) Bioaccessibility of metals and human health risk assessment in community urban gardens. *Chemosphere* 135:312–318. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.04.079
- Jean-Soro L, Guern CL, Bechet B et al (2014) Origin of trace elements in an urban garden in Nantes, France. *J Soils Sediments* 15:1802–1812. doi:10.1007/s11368-014-0952-y
- Jolly YN, Islam A, Akbar S (2013) Transfer of metals from soil to vegetables and possible health risk assessment. *SpringerPlus* 2:1–8. doi:10.1186/2193-1801-2-385
- Kabata-Pendias A (2011) Trace elements in soils and plants, 4 edn. CRC Press, Boca Raton
- Kessler R (2013) Urban gardening: managing the risks of contaminated soil. *Environ Health Perspect* 121:A326–A333. doi:10.1289/ehp.121-A326
- Khan A, Khan S, Khan MA, Qamar Z (2015) The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrients, and associated health risk: a review. *Environ Sci Pollut Res* 22:13772–13799. doi:10.1007/s11356-015-4881-0
- Laureysens I, Blust R, De Temmerman L et al (2004) Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: I. Seasonal variation in leaf, wood and bark concentrations. *Environ Pollut* 131:485–494. doi:10.1016/j.envpol.2004.02.009
- Logsdon S (2008) Encyclopedia of soil science. *Soil Sci Soc Am J* 72: 862–862. doi:10.2136/sssaj2008.0003br
- Madejón P, Marañón T, Murillo JM, Robinson B (2004) White poplar (*Populus alba*) as a biomonitor of trace elements in contaminated riparian forests. *Environ Pollut* 132:145–155. doi:10.1016/j.envpol.2004.03.015
- Matraszek R, Hawrylak-Nowak B, Chwil S, Chwil M (2016) Macronutrient composition of nickel-treated wheat under different sulfur concentrations in the nutrient solution. *Environ Sci Pollut Res* 23:5902–5914. doi:10.1007/s11356-015-5823-6
- Massaquoi LD, Ma H, Liu XH et al (2015) Heavy metal accumulation in soils, plants, and hair samples: an assessment of heavy metal exposure risks from the consumption of vegetables grown on soils previously irrigated with wastewater. *Environ Sci Pollut Res* 22:18456–18468. doi:10.1007/s11356-015-5131-1
- McBride MB, Shayler HA, Spliethoff HM et al (2014) Concentrations of lead, cadmium and barium in urban garden-grown vegetables: the impact of soil variables. *Environ Pollut* 194:254–261. doi:10.1016/j.envpol.2014.07.036
- Migeon A, Richaud P, Guinet F et al (2009) Metal accumulation by woody species on contaminated sites in the north of France. *Water Air Soil Pollut* 204:89–101
- Nabulo G, Young SD, Black CR (2010) Assessing risk to human health from tropical leafy vegetables grown on contaminated urban soils. *Sci Total Environ* 408:5338–5351. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.06.034
- Patra M, Sharma A (2000) Mercury toxicity in plants. *Bot Rev* 66:379–422. doi:10.1007/BF02868923
- Pelfrène A, Waterlot C, Douay F (2013) Influence of land use on human bioaccessibility of metals in smelter-impacted soils. *Environ Pollut* 178:80–88. doi:10.1016/j.envpol.2013.03.008
- Pii Y, Cesco S, Mimmo T (2015) Shoot ionome to predict the synergism and antagonism between nutrients as affected by substrate and physiological status. *Plant Physiol Biochem* 94: 48–56. doi:10.1016/j.plaphy.2015.05.002
- R Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Santé Canada (Health Canada). 2007. Multi-vitamin/mineral supplement monograph. http://webprod.hc-sc.gc.ca/nhpid-bdipn/atReq.do?atid=multi_vitmin_suppl, Accessed 29 February 2016.
- Säumel I, Kotsyuk I, Hölscher M et al (2012) How healthy is urban horticulture in high traffic areas? Trace metal concentrations in vegetable crops from plantings within inner city neighbourhoods in Berlin, Germany. *Environ Pollut* 165:124–132. doi:10.1016/j.envpol.2012.02.019
- SCF (Scientific Committee for Food) (1993). Nutrient and energy intakes for the European community (Opinion expressed on 11 December 1992). In office for official publications of the European communities. Reports of the scientific committee for food (thirty-first series), Luxembourg, pp 1–248
- Shinn NJ, Bing-Canar J, Cailas M et al (2000) Determination of spatial continuity of soil lead levels in an urban residential neighborhood. *Environ Res* 82:46–52. doi:10.1006/enrs.1999.4004

- Sipter E, Rózsa E, Gruiz K et al (2008) Site-specific risk assessment in contaminated vegetable gardens. *Chemosphere* 71:1301–1307. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.11.039
- Sluchyk V, Sluchyk I, Shyichuk A (2014) Assessment of both environmental cytotoxicity and trace metal pollution using *Populus simonii* Carr. As a bioindicator. *Environ Monit Assess* 186:6645–6650. doi:10.1007/s10661-014-3879-2
- Tei F, Benincasa P, Farneselli M, Caprai M (2010) Allotment gardens for senior citizens in Italy: current status and technical proposals. *Acta Hort* 881:91–96. doi:10.17660/ActaHortic.2010.881.8
- Warming M, Hansen MG, Holm PE et al (2015) Does intake of trace elements through urban gardening in Copenhagen pose a risk to human health? *Environ Pollut* 202:17–23. doi:10.1016/j.envpol.2015.03.011
- WHO (World Health Organization) (2003) Sodium in drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. World Health Organization (WHO/SDE/WSH/03.04/15), Geneva.
- WHO (World Health Organization) (2005) Nickel in drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality. World Health Organization (WHO/SDE/WSH/05.08/55), Geneva.
- Xu D, Zhou P, Zhan J et al (2013) Assessment of trace metal bioavailability in garden soils and health risks via consumption of vegetables in the vicinity of Tongling mining area, China. *Ecotoxicol Environ Saf* 90:103–111. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.12.018
- Xu L, Lu A, Wang J et al (2015) Accumulation status, sources and phytoavailability of metals in greenhouse vegetable production systems in Beijing, China. *Ecotoxicol Environ Saf* 122:214–220. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.07.025

5.2.3 Accumulation d'ETMs chez des espèces végétales comestibles cultivées sur substrat issu d'un site de dépôt de sédiments

Les amendements ont largement été utilisés pour enrichir les sols agricoles en matières organiques et en nutriments essentiels, mais ces additifs peuvent contenir des composants nuisibles tels que les éléments traces (ET). Par exemple, les sédiments issus du dragage des canaux et rivières ajoutés aux terres agricoles avoisinantes ont été très expérimentés en Europe sans tenir compte du transfert potentiel d'ET à la végétation. Une analyse multi-élémentaire a été réalisée avec plusieurs cultures comestibles (concombre, poivre, chou et laitue) et peuplier cultivé directement sur deux sols, faiblement (sol 1) ou très fortement (sol 2) enrichis en sédiments contaminés principalement par Cd, Pb et Zn. Nous n'avons pas enregistré d'accumulation plus élevée de Zn dans les parties comestibles des cultures, alors que le Cd a montré une plus forte accumulation surtout dans les légumes-feuilles cultivés sur le sol 2. Les feuilles de peuplier ont montré une accumulation plus élevée de Cd et Zn dans les deux sols et significativement plus élevée dans le sol 2, ce qui suggère que le peuplier est une espèce d'arbre appropriée pour surveiller le transfert d'éléments vers la végétation dans ce contexte. Fait intéressant, nous n'avons enregistré aucune accumulation de Pb dans aucune des espèces végétales étudiées. En comparant nos données avec les recommandations de dose journalière admissible (TDI), nous avons démontré le risque élevé de cultiver des cultures comestibles de feuilles seulement pour le Cd dans le contexte cité. Cependant, nous n'avons pas tenu compte des effets cumulatifs des divers éléments car il n'existe pas de recommandations directrices actuelles et des recherches supplémentaires sont nécessaires pour aborder cette question.

Manuscrit 5 : Je suis en 1^{er} auteur dans cet article publié, j'ai réalisé les principales étapes de ce travail : mise en place des dispositifs expérimentaux, suivi des expériences de la plantation à la récolte, traitement statistique des données obtenues, rédaction de l'article, en collaboration avec mes co-auteurs.

Manuscrit et statut	Référence
Chapitre 2. Mettre en évidence le transfert d'ETMs à partir de sols contaminés chez des espèces d'intérêt agronomique	
Manuscrit 5. En préparation.	Assad M , Parelle J, Chalot M., Tatin-Froux F (2016) Trace metal accumulation in edible crops and poplar grown on dredged sediments. A soumettre au journal : <i>Ecotoxicology and Environmental Safety</i> (IF 2015 : 3,1).

Trace metal accumulation in edible crops and poplar grown on dredged sediments

Mohamad Assad^a, Fabienne Tatin-Froux^b, Michel Chalot^{a,c}, Julien Parelle^{b,*}

^aLaboratoire Chrono-Environnement, UMR CNRS 6249, Université de Bourgogne Franche-Comté, Pôle Universitaire du Pays de Montbéliard, 4 Place Tharradin, BP 71427, 25211 Montbéliard, France

^bLaboratoire Chrono-Environnement, UMR CNRS 6249, Université de Bourgogne Franche-Comté, 16 Route de Gray, 25030 Besançon Cedex, France

^cUniversité de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, Vandoeuvre-les-Nancy, 54506 France

*Corresponding author: Laboratoire Chrono-Environnement, UMR 6249, Université de Bourgogne Franche-Comté, Pôle Universitaire du Pays de Montbéliard, 4 place Tharradin, BP 71427, 25211 Montbéliard, France
Tel: +33 3 81 99 46 76 Email: michel.chalot@univ-fcomte.fr

Abstract

Soil amendments have been always used to enrich agricultural soils with organic matter, and essential nutrients, however, these additions may contain harmful components such as trace metals (TMs). For instance dredged sediments added to the neighboring agricultural lands has been highly experienced in Europe without taking into account the potential transfer of TMs to the vegetation. A multi-elemental analysis was performed with several common edible crops (cucumber, pepper, cabbage and lettuce) and poplar grown directly on two soils, either weakly (soil 1) or highly (soil 2) enriched with dredged sediments contaminated mainly by Cd, Pb and Zn. We did not register higher accumulation of Zn in the edible parts of crops, whereas Cd showed a higher accumulation especially in leafy vegetables grown on soil 2. Poplar leaves showed higher accumulation of both Cd and Zn in the two soils and significantly higher in soil 2, which suggests that poplar is a suitable tree species for monitoring element transfer to vegetation in this context. Interestingly we did not register any accumulation of Pb in any of studied plant species. By comparing our data with tolerable daily intake (TDI) recommendations, we demonstrated the high risk of cultivating edible leafy crops only for Cd in such context. However, we did not consider the cumulative effects of the various elements because there are no current guidelines, and further research is needed to address this question.

Keywords

Dredged sediments, Agricultural soils, Trace metals, ICP-AES, Transfer, Tolerable daily intake, Vegetable crops, Poplar

1. Introduction

A large amount of sediments is dredged every year from ports and waterways in order to maintain adequate depths for ship navigation. Sediment is the compartment where contaminants mostly accumulate (for a review see [Akcil et al. 2015](#)). Usually, dredged sediments are disposed in specific facilities but more recently they have been used as amendments on agricultural soils to provide P and N fertilization. While the organic compounds can be degraded by soil microorganisms, the TMs have high persistence, although depending of soil properties, that may induce environmental problems. Previous studies showed that TMs contained in these amendments may end up in plants, whereas the accumulation rate highly depends on species and organs. In grapevine grown in polluted urban/industrial contexts in Serbia, all plant tissues contain large amount of Cu except the fruit, the edible part ([Alagić et al. 2014](#)). Concerning dredged sediment, similar observations were made by [Ebbs et al. \(2006\)](#) on bean, broccoli, carrot, pepper, and tomato and by [Canet et al. \(2003\)](#) on tomatoes and lettuce developed on dredging of a lake, adding positive sediment effects on nutrients content. The authors concluded that dredged sediments could be utilized for the production of vegetables intended for human consumption. However each specific context should be taken in consideration in order to take local decisions.

In this context the development of a biomonitor might be needed, to indicate the potential toxicity of the soil. The biomonitor should indeed reflect the quantity of toxic elements in the edible parts of a large variety of crop vegetables, and this indirect quantification should have a sufficient accuracy to indicate whether the concentrations measured in the plant tissues would suggest a concentration above the safety limits defined by the public agencies in the edible crops grown at the vicinity. The use of plant as biomonitor has been described for atmospheric pollution evaluation using moss ([Ares et al. 2012](#)) or trees (for a review, see [Tarricone et al., 2015](#)). The use of trees has somehow been also suggested for biomonitoring of TMs in soils. For instance, white poplar, known for its ability of phytoextraction of Cd and Zn in its leaves, has been used as a biomonitor [Madejón et al. 2006](#) in contaminated riparian forests ([Madejón et al. 2004](#)). However, TM accumulation in plants is highly depending on environmental bioavailability of metals to plants, hereafter called metal bioavailability. It can be defined as the flux of metals across a given root surface area of a target plant species for a determined period of time ([Harmsen 2007; ISO, 2006](#)). Metal bioavailability is distinct from environmental availability, currently estimated by physico-chemical methods (based on the utilization of extractants such as CaCl_2 or NaNO_3 extraction methods, ([Menzies et al. 2007](#)). The determination of metal bioavailability is indeed crucial for assessing food chain contamination and phytotoxicity, i.e. the toxicological bioavailability ([Peijnenburg et al. 1997](#)). Recently, a plant-based biotest has been developed for estimation of the bioavailability of soil contaminants [Bravin et al. 2010](#)), and has now been validated as the International Standard ISO 16198:2015. This biotest is applicable to the assessment of environmental bioavailability of trace elements to plants, and suggests three plant species (cabbage, *Brassica oleracea*; tall fescue, *Festuca arundinacea*; tomato, *Lycopersicon esculentum*) in the standardized biotest procedure.

Table 1: Mean element concentrations (mg/kg) in the soil 1 & soil 2 (total recoverable concentration and CaCl₂ extractible fractions), and indicative world means in soils (from Kabata-Pendias 2011). The number of replicates is indicated in brackets, data are noted as mean and range values. When all of the data were below the limit of quantification they are noted <LQ.

		As	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
Soil 1 (3)	total recoverable concentration	13.3 (11-19)	<LQ	12.7 (11-15)	56.7 (50-68)	28.5 (28-29)	24.3 (21-29)	49.5 (47-52)	154.5 (137-172)
	CaCl ₂ extractible fraction	0.02 (0.01-0.03)	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Soil 2 (2)	total recoverable concentration	24 (23-25)	7.5 (7-8)	17.5 (16-19)	79.5 (72-87)	95.5 (87-104)	37 (37-37)	366.5 (328-405)	1895.5 (1720-2071)
	CaCl ₂ extractible fraction	0.01 (0.01-0.01)	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0.1 (0.1-0.1)
Indicative world means in soil (Kabata-Pendias, 2011)		6.8	0.41	11.3	60	38.9	29	27	70

Supplementary data 1: Limit of quantification for elements and recovery percentage for the certified material and cucumber fruits.

Element	mean LQ (mg/kg DM)	Recovery percentage		
		Cucumber Fruits	Tabaco leaves	Loamy Clay Soils
Al	2.90	<LQ	45	158
As	1.24	<LQ	<LQ	109
Ca	2.45	99	99	102
Cd	0.18	<LQ	119	90
Co	0.35	<LQ	98	100
Cr	0.59	<LQ	<LQ	101
Cu	0.50	93	94	89
Fe	0.55	98	<LQ	106
K	11.24	95	98	100
Mg	2.11	97	100	97
Mn	0.09	92	92	69
Na	3.17	81	<LQ	99
Ni	0.47	105	90	99
P	1.09	123	107	150
Pb	1.24	<LQ	101	102
Zn	0.06	93	89	143

In the present study we estimated the element transfers from a soil that has received dredged sediments to various edibles crops, in controlled conditions. Two leafy vegetables (salad and cabbage) and two fruits vegetables (pepper and cucumber) were tested. In addition, as one of the major ecological concerns around the experimental site is the production of woody biomass, a large-scale field trial using woody species (including poplar) has been recently implemented onto the site, to test the impact of the woody cover on the phytostabilisation potential. However, as there was no background information on uptake of TMs from such a substrate, we have added poplar to the list of studied plants, as the present work might represent a first step towards the understanding of TM transfer from soil to aboveground woody biomass. We will also consider poplar as a control to test whether this model plant would reflect the transfer of TMs in the different vegetables. Poplar proved indeed to be a useful bio-indicator to assess pollution of the urban environment (Laureysens et al. 2005; Celik et al. 2010; Sluchyk et al. 2014). We compared the plant element content to the tolerate daily intake (TDI) defined by public agencies (Baars et al. 2001; EFSA, 2006; EFSA, 2009; INERIS, 2005; WHO, 2005) and to element soil content, as estimated by total and CaCl₂ extractable fraction). We hypothesized that the poplar leaves would reflect quantitatively the global risk observed on the overall species for all elements.

2. Materials and methods

2.1. Soils preparation and physico-chemical analyses

Two types of soils were collected on a landfill that has received dredged sediments, the first one (soil 1) was weakly polluted and used as a control soil. While the second soil (soil 2) was highly polluted by Cd and Zn. These soils was diluted with sand (1/1, v/v) prior to use to limit compaction in pot experiments and these sand/soil1 and sand/soil2 mixtures are referred to as “soil 1” and “soil 2” throughout the text, tables and figures. Fertilizers (N/P/K 11/11/18, Osmocote Exact®, Heerlen, Netherlands, detailed composition: N: 11%, P: 4.8 %, K: 14.9%, Fe: 0.25%; Mn: 0.03%, B: 0.01%, Cu: 0.05%, Mo: 0.01%, Zn: 0.01%) were added to each pot (1.5 g/pot) at the beginning of the experiment to ensure non-limiting plant nutrition in the different soils. Soil sub-samples were collected before adding fertilizers and dried for further physico-chemical analysis, as described below.

The physico-chemical characteristics that were measured in the present study included the particle size fractions (French Norm X 31-107), pH (ISO 10 390 French Norm), organic status (OM, ISO 14 235 French Norm) and exchangeable elements (PHANTHAVONGSA et al., unpublished results). To determine the available fractions of elements from the two soils (Table 1), five grams of 2-mm sieved soil was dried at 60°C for 48 h and incubated with 50 mL of 10 mM calcium chloride under agitation (40 rpm) for 2 h at room temperature. The mixture was first filtered with ash-free filters, passed through a 0.45-micrometer mesh and acidified at 2% (v/v) with HNO₃ prior to inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES, Thermo Fischer Scientific, Inc., Pittsburg, USA) analysis.

2.2. Growth and sampling conditions

Seeds from two leafy food crops, lettuce (*Lactuca sativa* Batavia kamikaze) and cabbage (*Brassica oleracea* var Mozart F1), and two fruit food crops, cucumber (*Cucumis sativus* var Raider F1), and pepper (*Capsicum annuum* var Alby F1) were allowed to germinate for 2 weeks in a loam substrate, and planted after clearing the roots to ensure root contact with the new soils. Poplar cuttings (*Populus trichocarpa* x *Populus maximowiczii* var Skado) were directly planted in the new soils. Twelve plants per species were planted in 0.5 L pots in both loam and red gypsum substrates. The climatic conditions of the growth chamber were as follows: day light for 16 h ($250\text{--}300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); day temperature of 22 °C; night temperature of 18 °C; day and night humidity of 30%. One half of the plants were collected after 32 days of growth and the other half after 56 days. The whole leaves of the five species and the fruits for cucumber and pepper were sampled. The fruit and leaf tissues were carefully washed in deionized water to remove potential substrate particles, placed in separate paper bags, and dried at 40°C before analysis.

2.3. Elemental analysis

The extraction of TMs from plant tissues (using 1.75 mL HNO₃ + 0.5 mL H₂O₂) and substrates (using 2 mL HNO₃ + 5 mL HCl) was performed after milling the samples (125 mg) and mineralization in closed tubes placed in a block digestion system (DigiPREP, SCP Sciences, Courtaboeuf, France). Gradual heating was used to achieve a final temperature of 100°C (total run of 265 min). Then, ultrapure water (Millipore Milli-Q Integral 3 system, Molsheim, France) was added to a final volume of 12.5 mL. Finally, filtration to 1 µm was performed. The element concentrations were determined using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES, Radial ICAP 6500 Model, Thermo Fischer Scientific, Courtaboeuf, France), and all samples were analyzed in triplicate with certified reference materials, including oriental basma tobacco leaves (INCT-OBTL-5, LGC Promochem, Molsheim, France), *Cucumis sativus* fruits (IPE-817, LGC Promochem, Molsheim, France), and loamy clay soil (CRM052, LGC Promochem, Molsheim, France). The quantification limits and percent recoveries are given in **Supplementary data 1**.

2.4. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R 3.2.0 software (R Development Core Team, 2015). All tests were considered significant when $p < 0.05$. Differences in element contents among species, sampling dates, organs (leaf and fruit), and soil types were analyzed by a two-way ANOVA followed by Tukey-Kramer mean comparison test. To respect the postulates of ANOVA, the element contents were log transformed. All categories containing at least one individual below the LQ were removed from the statistical analysis according to (Helsel 2010) who considered that replacement methods induce statistical bias, particularly when the sample size is small ($n=6$ in this study). The removed data were denoted '< LQ' in the results section, and the mean and the number of samples above the LQ were noted. When fruit or leaf production was too low ($n \leq 2$), the category was removed from the statistical analysis, and the mean and the number of samples were noted. For all of the categories included in the statistical analysis, we reported the mean \pm the standard deviation.

For the principal component analysis, all data from the fruits and leaves were pooled into two data frames (one per soil type), and data below the LQ were considered to be null.

3. Results and discussion

3.1. Soil characteristics

Soils were taken from two distinct areas at the Fresnes experimental site (Phanthavongsa et al., unpublished results). Although the overall area received dredged sediment in the early 60's, these two areas were clearly distinct from the contamination point of view (**Table 1**). The total soil concentrations of the major contaminants (Cd, Cu, Pb, Zn) were 12-fold (Zn), 7-fold (Pb), 1.4-fold (Cu) higher in soil 2, compared with soil 1, whereas Cd was not detected in soil 1. As, Co, Cr, and Ni were in the same order of magnitude, slightly above the indicative world means (**Table 1**). None of these TMs (except Cr and Zn at area 2) could be recovered in the CaCl₂-extractible fraction of soil 1.

3.2. Element transfer to the plants

The principal component analysis revealed that none of the plant species accumulated all of the studied TMs (**Fig 1**). The various plant species tested could be grouped into 3 categories: those accumulating mainly Cd and Zn (PC1): mainly the poplar and pepper leaves growing on the polluted substrate, those accumulating As, Cr, Co and Ni (PC2): mainly the fruits of cucumber, and finally those that did not accumulate any TMs: mainly plants growing on the soil 1. The detailed plant analysis (**Table 2**) revealed 3 groups of elements. For the first group (As, Co, Cr, Pb, mainly resumed on PC2 of the PCA, excepted for Pb, fig 1), we did not evidence massive transfer from the soil to the plant tissues in any of the two soils, which agreed with the CaCl₂ extractible fractions measured for these elements. A noticeable exception is the presence of As, Co, Cr and Pb in some cucumber and pepper fruits. As has been reported to be accumulated in the edible part of different taxa (Li et al. 2016). McBride et al. (2015) also found significant accumulation of As for carrot, lettuce, green bean, and tomato, however the tested concentrations were much higher than those measured in the present studied soils. Rosas-Castor et al. (2014) observed As accumulation in maize, when grown at a soil As concentration comparable to our soils, but the recorded values in the shoot part was mainly below our limit of quantification for As (1.24 mg/kg, **supplementary data 1**). The elevated total and CaCl₂-extractible fractions of As were therefore not reflected by As content in plants. The lack of detectable Pb in most of the studied plants from our study confirmed the low Pb CaCl₂-extractible fraction in soils from both areas. Yadav et al. (2015) found that Pb could be detected in many edible crops (wheat, fenugreek, radish, spinach, bean, clover and sorghum). However the plants were irrigated with contaminated sewage industrial effluents, which could have induced a much higher bioavailability (as the authors measured the DTPA extractable fraction a direct comparison with our results is not possible). Co was only detected in cucumber fruits and in pepper leaves although at much lower levels, independently of the soil origins. Since Co may also have been brought to the soil by the fertilizer that was used in our study, we cannot conclude on the risk associated to the transfer of Co from the dredged sediment.

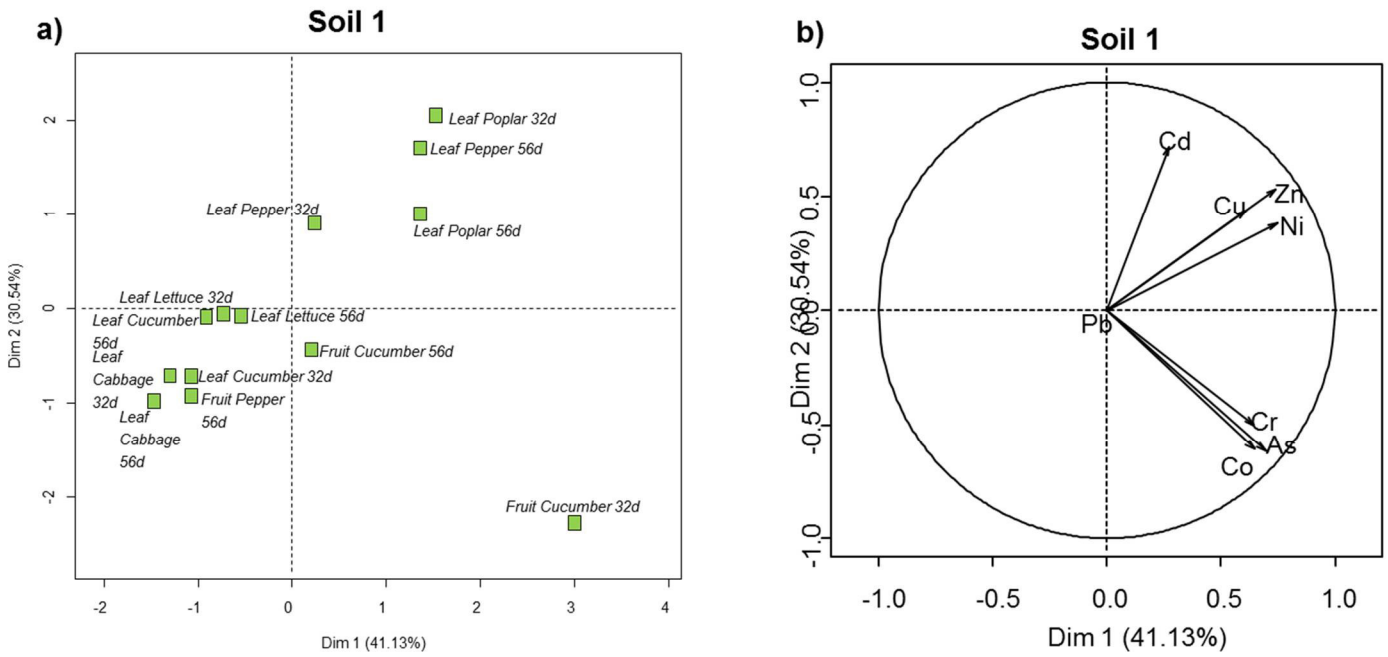


Figure 1: Principal component analysis among elements for plants grown on soil 1. a. Projection of plant species, organ and times series on principal component 1 and 2. b. Projections of elements vectors on principal component 1 and 2.

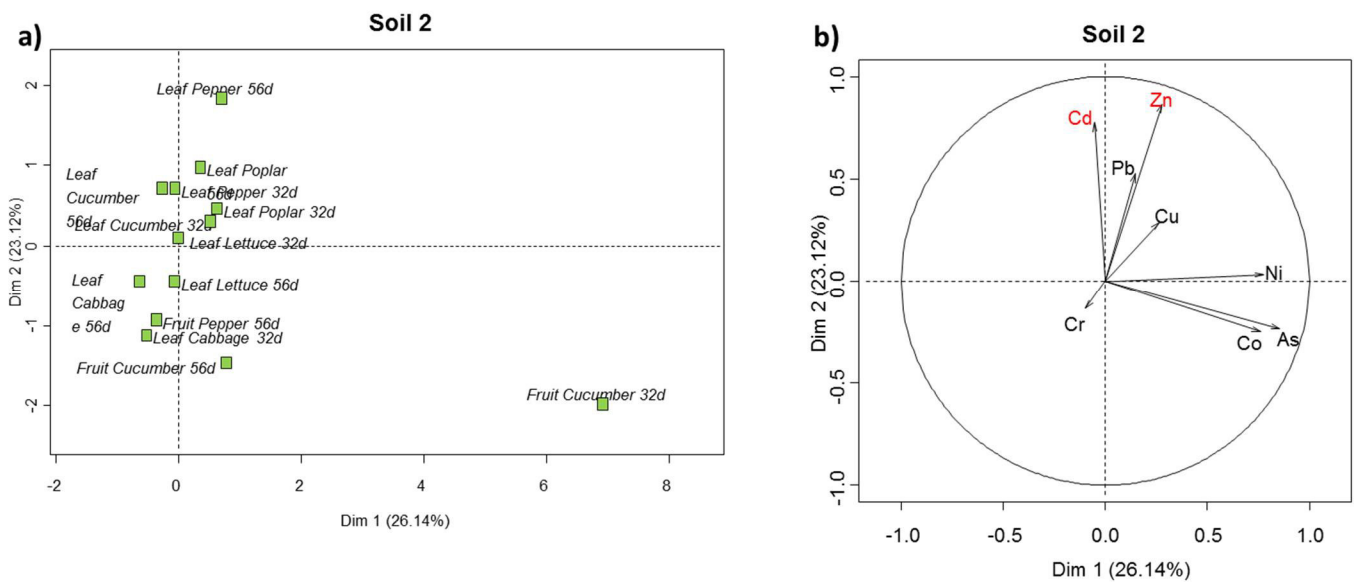


Figure 2: Principal component analysis among elements for plants grown on soil 2. a. Projection of plant species, organ and times series on principal component 1 and 2. b. Projections of elements vectors on principal component 1 and 2.

Table 2: Concentration of trace elements (mg/kg) in the leaves of each species, and in fruit of cucumber and pepper. Data are shown in function of soil type (soil 1 or soil 2), after 32 and 56 days of growth. Means ± standard deviation. Different letters indicate significant differences among categories for the element (ANOVA followed by Tukey-Kramer test). For each of the two following cases, the category was removed from the statistical analysis and noted in italics (according to recommendation of [Helsel, 2010](#)): when all of the values were below the limit of quantification (the data are noted <LQ) ; when a part of the values were below the limit of quantification (the mean, and the number of plants above and below the limit of quantification, are noted indicatively); when the number of sample was too low ($n \leq 2$, the mean *i* noted indicatively).

Species	Substrate	Organ	Age (days)	n	As	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	
Poplar	Control	Leaves	32	6	<LQ	0.7 ± 0.1 fgh	<LQ	<LQ	14.1 ± 5.0 a	1.1 ± 0.6 abcd	<LQ	80.3 ± 33.4 bcde	
			56	6	<LQ	0.6 ± 0.2 gh	0.355 ± 0.014 n=2 <LQ n=4	1.5 n=1 <LQ n=5	9.6 ± 5.3 abcd	1.8 ± 1.0 abc	<LQ	52.2 ± 26.5 defghi	
	Polluted	Leaves	32	6	<LQ	1.5 ± 0.2 bcde	<LQ	<LQ	10.2 ± 5.1 ab	1.0 ± 0.3 abcd	<LQ	92.6 ± 26.8 abcd	
			56	6	<LQ	2.1 ± 0.5 ab	<LQ	<LQ	6.7 ± 3.3 bcdefg	0.6 ± 0.1 cd	<LQ	120.0 ± 30.1 ab	
Cabbage	Control	Leaves	32	6	<LQ	0.2 ± 0.1 j	<LQ	<LQ	2.5 ± 0.5 ij	<LQ	<LQ	<LQ	22.9 ± 6.1 ijk
			56	6	<LQ	0.1 ± 0.0 jk	<LQ	<LQ	2.1 ± 0.6 j	<LQ	<LQ	<LQ	14.4 ± 3.0 k
	Polluted	Leaves	32	6	<LQ	0.6 ± 0.2 gh	<LQ	<LQ	2.0 ± 0.7 j	0.7 n=1 <LQ n=5	<LQ	65.2 ± 52.7 cdefg	
			56	6	<LQ	0.9 ± 0.2 efg	<LQ	<LQ	3.0 ± 0.3 ghij	0.5 ± 0.06 d	<LQ	101.3 ± 22.8 abc	
Lettuce	Control	Leaves	32	6	<LQ	0.4 ± 0.1 hi	<LQ	<LQ	5.3 ± 1.2 bcdefghi	0.5 n=1 <LQ n=5	<LQ	29.9 ± 3.1 ghijk	
			56	6	<LQ	0.4 ± 0.1 h	<LQ	<LQ	4.9 ± 2.0 bcdefghi	0.5 n=1 <LQ n=5	<LQ	22.8 ± 3.9 hijk	
	Polluted	Leaves	32	6	<LQ	1.8 ± 1.0 bcd	<LQ	<LQ	7.1 ± 2.4 abcdef	0.8 ± 0.2 n=3 <LQ n=3	<LQ	68.3 ± 39.7 bcdefg	
			56	6	<LQ	1.7 ± 0.1 abc	<LQ	<LQ	3.9 ± 0.6 defghij	<LQ	<LQ	51.6 ± 13.5 cdefg	
Pepper	Control	Leaves	32	6	<LQ	0.6 ± 0.1 fgh	0.4 ± 0.1 b	<LQ	4.5 ± 2.2 cdefghij	0.8 ± 0.2 bcd	<LQ	62.0 ± 5.0 bcdefg	
			56	6	<LQ	0.7 ± 0.1 fgh	0.5 ± 0.1 b	<LQ	3.8 ± 1.9 fghij	2.0 ± 0.8 a	<LQ	95.1 ± 19.1 abcd	
	Polluted	Fruits	32	6	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	5.7 ± 0.8 bcdefgh	0.5 ± 0.02 n=2 <LQ n=4	<LQ	20.0 ± 5.1 jk	
			56	6	<LQ	2.4 ± 0.3 ab	<LQ	<LQ	5.0 ± 1.3 bcdefghi	0.6 ± 0.1 n=2 <LQ n=4	<LQ	98.8 ± 11.2 abc	
Cucumber	Control	Leaves	32	6	1.4 n=1 <LQ n=5	3.1 ± 0.7 a	<LQ	<LQ	5.7 ± 2.7 bcdefgh	0.7 ± 0.2 bcd	<LQ	161.8 ± 24.0 a	
			56	5	<LQ	1.0 ± 0.1 cdefg	<LQ	<LQ	8.9 ± 2.2 abc	0.6 n=1 <LQ n=4	<LQ	34.9 ± 9.2 fghij	
	Polluted	Leaves	32	6	<LQ	0.1 ± 0.0 k	<LQ	<LQ	2.8 ± 0.5 hij	0.5 n=1 <LQ n=4	<LQ	35.7 ± 6.6 fghij	
			56	6	<LQ	0.2 ± 0.1 lj	<LQ	<LQ	3.0 ± 1.6 hij	0.6 ± 0.07 bcd	<LQ	50.8 ± 22.9 defgh	
Cucumber	Control	Fruits	32	5	2.3 ± 0.3 n=2 <LQ n=3	<LQ	10.9 ± 11.6 a	1.7 n=1 <LQ n=4	7.7 ± 2.2 abcde	1.5 ± 0.3 ab	<LQ	67.2 ± 19.6 bcdef	
			56	6	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	5.3 ± 0.9 bcdefgh	1.5 ± 0.6 abc	<LQ	42.3 ± 18.3 efghij	
	Polluted	Leaves	32	6	<LQ	0.9 ± 0.3 defg	<LQ	<LQ	3.6 ± 0.6 efghij	0.9 ± 0.5 abcd	<LQ	118.8 ± 69.4 abc	
			56	6	<LQ	1.2 ± 0.6 cdef	<LQ	<LQ	3.4 ± 1.4 fghij	0.6 n=1 <LQ n=5	<LQ	133.7 ± 50.1 ab	
Polluted	Fruits	32	2	1.9 ± 0.6 1.4 n=1	0.6 ± 0.3 0, n=1	5.74 n=1 <QL n=1	<LQ	<LQ	6.3 ± 1.6 5.4 ± 1.9	2.0 ± 0.2 1.2 ± 0.3	<LQ	90.8 ± 6.8 <LQ n=1	
		56	6	<LQ n=5	<LQ n=5	<LQ	<LQ	<LQ	46.7 ± 17.8 bcdefghi	ab	<LQ n=5	46.7 ± 17.8 defghi	

The second group of TMs is represented by Cu and Ni (intermediate between PC1 and 2 on the ACP, **Fig 1**), which were detected in fruits and leaves of most edible crops and poplar (**Table 2**). Despite elevated Cu or slight Ni differences between the TM concentrations in the two soils (**Table 1**), we did not evidenced significant differences for their accumulation in plant tissues between the two soils. As mentioned for Co, Cu might originate from the fertilizer. Values obtained for Cu in the present study are similar to those given in the Ciqual tables (French food composition tables) for the edibles parts of the crops ([ANSES, 2013](#)). The highest Ni content was found for poplar leaves and cucumber fruits (**Table 2**). For all other species, the measured Ni concentrations were mostly lower 1 mg/kg, or below the detection limit (<0.47 mg/kg).

Cd and Zn belong to the third group of TM that were accumulated at significantly higher levels in most plant tissues grown on soil 2 compared with soil 1 (**Table 2**, and resumed as PC1 on the ACP **fig1**). These differences highly reflect the differences in soil concentrations. Cd and Zn are indeed well known to be highly correlated, mainly due to membrane aspecific transport of the two elements ([Gupta et al. 2016](#)). Cucumber and pepper leaves accumulated higher Cd and Zn levels, compared with fruits, as previously observed in tomato, cherry, grape, strawberry by [Bagdatlioglu et al. \(2010\)](#) and in apricot and fig by [Oteef et al. \(2015\)](#). In consequence, the risk associated to the consumption of pepper and cucumber fruits could be lowered by the fact that the TM taken up in excess by these species could be stored in leaf tissues. Interestingly, leaves of fruit vegetables accumulated higher amounts of Zn than leafy vegetables.

3.3. Risk assessment

Public agencies recommend tolerate daily intake values (TDI) for each element, reflecting the maximum amount above which no effect for human health has been recorded. Based on these values, we calculated the fresh mass to take in daily to reach this TDI for each edible crop and for each element in our experimental context (**Table 3**). In order to consider a global risk for all elements, we proposed a visual representation that allowed to relate each element to its toxicity, and to visualize at one glance the risk for all elements. Although less relevant for the risk assessment issue, similar calculations were done for the non-edible part of pepper, cucumber as well as for the poplar leaves. We think that our representation is more quantitative, that the indicative index Target Hazard Quotients use for example by ([Harmanescu et al. 2011](#)), but has the disadvantage to not consider the exposure time of the human population. We found no risk for As, Cr (we considered the toxicity of the most toxic form CrVI), Cu, Ni and Pb intake associated with the consumption of all crop species tested. For Co, we noticed a risk associated with the consumption of cucumber fruit, which is however probably due in our study to the presence of Co in the fertilizer. This risk was also evidenced for the leaves of pepper and the leaves of poplar grown in similar conditions. A similar but less marked risk is observed for Zn intake from leaf cabbage grown on soil 2. Although Cd and Zn have similar patterns of accumulation in tissues, this representation, weighing the concentrations with TDI, highlighted that the higher risk was found for Cd in the context of our study.

Table 3: Risk assessment, Fresh mass (kg) to be eaten daily by an adult of 60 kg to reach the tolerate daily intake (TDI) for each element (red level scale: value upper than 2kg are in white). Data are shown for edible parts and for non-edible parts as potential bio monitor (leaves of poplar, pepper and cucumber) Value and source of the used TDI for calculation are shown at the bottom of the table. Water content used for calculation were recorded in leaves/fruits samples (poplar:71%, cabbage: 84%, lettuce: 93%, pepper leaves 83%, pepper fruits 95%, cucumber leaves: 72%, cucumber fruits: 95%). Data are shown after 56 days of growth. When values were below the LQ, they were noted <LQ quoted in italics.

Species	Substrate	Organ	Age (days)	As	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
Poplar	Control	Leaves	32	<LQ	0.3	<LQ	<LQ	2.1	2.2	<LQ	1.0
			56	<LQ	0.4	<LQ	<LQ	3.0	1.4	<LQ	1.6
	Polluted	Leaves	32	<LQ	0.1	<LQ	<LQ	2.8	2.4	<LQ	0.9
			56	<LQ	0.1	<LQ	<LQ	4.3	3.8	<LQ	0.7
Cabbage	Control	Leaves	32	<LQ	1.9	<LQ	<LQ	21.0	<LQ	<LQ	6.8
			56	<LQ	2.9	<LQ	<LQ	24.3	<LQ	<LQ	10.8
	Polluted	Leaves	32	<LQ	0.6	<LQ	<LQ	25.7	6.1	<LQ	2.3
			56	<LQ	0.4	<LQ	<LQ	17.3	8.1	<LQ	1.5
Lettuce	Control	Leaves	32	<LQ	2.1	<LQ	<LQ	22.5	17.9	<LQ	11.9
			56	<LQ	1.9	<LQ	<LQ	24.2	20.1	<LQ	15.6
	Polluted	Leaves	32	<LQ	0.5	<LQ	<LQ	16.7	13.1	<LQ	5.2
			56	<LQ	0.5	<LQ	<LQ	30.7	<LQ	<LQ	6.9
Pepper	Control	Leaves	32	<LQ	0.6	1.2	<LQ	11.0	5.2	<LQ	2.3
			56	<LQ	0.5	0.9	<LQ	13.0	2.0	<LQ	1.5
	Polluted	Fruits	56	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	29.5	27.4	<LQ	24.9
			Leaves	32	<LQ	0.1	<LQ	<LQ	9.9	6.9	<LQ
		Fruits	56	<LQ	0.1	<LQ	<LQ	8.6	5.6	<LQ	0.9
			56	<LQ	1.3	<LQ	6.7	18.8	24.5	<LQ	14.3
Cucumber	Control	Leaves	32	<LQ	2.2	<LQ	<LQ	10.7	4.7	<LQ	2.5
			56	<LQ	0.9	<LQ	<LQ	10.0	3.9	<LQ	1.8
		Fruits	32	<LQ	<LQ	0.2	2.4	21.9	9.5	<LQ	7.4
			56	<LQ	<LQ	0.1	<LQ	31.3	9.3	<LQ	11.8
	Polluted	Leaves	32	<LQ	0.2	<LQ	<LQ	8.1	2.6	<LQ	0.8
			56	<LQ	0.1	<LQ	<LQ	8.6	4.3	<LQ	0.7
		Fruits	32	2.2	1.9	0.05	<LQ	26.4	7.0	<LQ	5.5
			56	<LQ	2.7	<LQ	<LQ	30.8	12.3	<LQ	10.7
TDI (mg/day /60 kg corporal mass)				0.21	0.06	0.084	0.21 (for Cr VI)	8.4	0.72	0.042	25
source				EFSA, 2009	EFSA, 2009	Baars et al. 2001	INERIS, 2005	Baars et al. 2001	WHO, 2005	EFSA, 2009	EFSA, 2006

Despite the low transfer of TMs from soil to plant tissues, these data prompted us to conclude that the consumption of leafy vegetables grown in such agricultural soils (receiving dredged sediments highly enriched in Cd and Zn) represents a high risk for consumers through only Cd exposition. We however conclude that selecting the cultivation of fruit vegetable crops instead of leafy vegetables for such areas would be more appropriate. Additionally, we recommend that non-edible parts (i.e. leaves) of these fruit crops or leaves from poplar should not be used for feedstuff. The maximum Cd level allowed in animal feed is indeed $0.88 \mu\text{g g}^{-1}$ dry mass (Directive, 2002), and this threshold value is clearly reached in our experimental diluted design (Table 2), which would induce the transfer of Cd and its accumulation in the higher trophic levels of the food chain and hence causes indirect impacts on human health.

4. Conclusions

Assessing the risk for human health of TMs intake due to crop consumption by simply measuring total soil TMs concentrations has now been considered as not relevant (Harmanescu et al. 2011). This measure indeed does not allow predicting the transfer to vegetation for any elements, and it does not either inform on limit values for toxicity to human health, nor it takes into account the inter-specific variations of TMs uptake. The use of sentinel vegetation has been widely considered, but mostly for atmospheric pollution for which a direct prediction is difficult (Smodiš et al. 2004). To reflect the risk, an efficient plant biomonitor should quantitatively reflect the risk of element transfer from soil to the edible parts (Smodiš et al. 2004), take into account that the risk of transfer vary among the plant species, be relevant for all of the elements potentially toxic elements in the specific context. Matching the interspecific diversity and the quantitative assessment of the risk of transfer, suggests, as a first approach, the use of a large panel of sentinel plants. However the analytical and human costs associated to such a concept would be economically irrelevant. Reducing the approach to a single plant biomonitor would be more relevant, if the plant biomonitor reflect the risk of transfer for all of elements for which a transfer is suspected in a specific context.

Poplar is a particularly interesting candidate, because of its well-known high capacity to accumulate various TMs (Celik et al. 2010; Laureysens et al. 2005; Sluchyk et al. 2014; Migeon et al. 2009). The poplar Skado cultivar has a specific interest, as evidenced in our previous papers, as it may accumulate Cr, Ni, Mn (Assad et al. 2017) as well as Hg (Assad et al. 2016), in addition to Cd and Zn. Indeed, in the present study, the Skado cultivar significantly accumulated higher content of Cd and Zn in the leaves when grew on the soil 2, compared with soil 1. As compared with edible crops, poplar leaves encompass the risk associated with the transfer of most TMs, present at our experimental site, to the vegetation. We also evidenced that pepper is a particular promising model. Indeed, the use of pepper as a passive biomonitor planted directly in gardens should be a relevant development of the present work, as pepper leaves mostly accumulate the TMs Cd and Zn, in addition to its capacity to accumulate Mn, Fe, Ni (Assad et al. 2017) and Hg (Assad et al. unpublished data).

Acknowledgments

This work was supported by the French National Research Agency [ANR BIOFILTREE 2010-INTB-1703-01], the Région Franche-Comté [Environnement-Homme-Territoire 2014-069] and the Pays de Montbéliard Agglomération [13/070-203-2015]. M. Assad's PhD grant was supported by the ministry of higher education of the Syrian Arab Republic. We acknowledge Dr. Nadia Morin-Crini and Caroline Amiot for the ICP-AES analysis. We thank the VNF (Voies Navigables de France) for providing us with access to the experimental site. The authors declare no conflicts of interest.

References

- Akcil A, Erust C, Ozdemiroglu S, et al (2015) A review of approaches and techniques used in aquatic contaminated sediments: metal removal and stabilization by chemical and biotechnological processes. *J Clean Prod* 86:24–36. doi: 10.1016/j.jclepro.2014.08.009
- Alagić SČ, Tošić SB, Dimitrijević MD, et al (2014) Assessment of the quality of polluted areas based on the content of heavy metals in different organs of the grapevine (*Vitis vinifera*) cv Tamjanika. *Environ Sci Pollut Res* 22:7155–7175. doi: 10.1007/s11356-014-3933-1
- ANSES, (2013) (Agence national de sécurité sanitaire) Tables Ciqual. French food composite table. <https://pro.anses.fr/TableCIQUAL/>.
- Ares A, Aboal JR, Carballeira A, et al (2012) Moss bag biomonitoring: A methodological review. *Sci Total Environ* 432:143–158. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.05.087
- Assad M, Parelle J, Cazaux D, et al (2016) Mercury uptake into poplar leaves. *Chemosphere* 146:1–7. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.11.103
- Assad M, Titin-Froux F, Blaudez D, et al (2017) Accumulation of trace elements in edible crops and poplar grown on a titanium ore landfill.
- Baars A., Theelen RM., Janssen PJC., et al (2001) Re-evaluation of human-toxicological maximum permissible risk levels. RIVM Report 711701025.
- Bagdatlioglu N, Nergiz C, Ergonul PG (2010) Heavy metal levels in leafy vegetables and some selected fruits. *J Für Verbraucherschutz Leb* 5:421–428. doi: 10.1007/s00003-010-0594-y
- Bravin MN, Michaud AM, Larabi B, Hinsinger P (2010) RHIZOtest: A plant-based biotest to account for rhizosphere processes when assessing copper bioavailability. *Environ Pollut* 158:3330–3337. doi: 10.1016/j.envpol.2010.07.029
- Canet R, Chaves C, Pomares F, Albiach R (2003) Agricultural use of sediments from the Albufera Lake (eastern Spain). *Agric Ecosyst Environ* 95:29–36. doi: 10.1016/S0167-8809(02)00171-8
- Celik S, Yupei E, Celik S, et al (2010) Carolina poplar (*Populus x canadensis* Moench) as a biomonitor of trace elements in Black Sea region of Turkey. *J Environ Biol* 31:225–232.
- Directive, (2002) /32/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 7 mai 2002 sur les substances indésirables dans les aliments pour animaux.
- Ebbs S, Talbott J, Sankaran R (2006) Cultivation of garden vegetables in Peoria Pool sediments from the Illinois River: A case study in trace element accumulation and dietary exposures. *Environ Int* 32:766–774. doi: 10.1016/j.envint.2006.03.013
- EFSA, (2006) (European Food Safety Authority) Tolerable Upper Intake Levels for Vitamins and Minerals by the Scientific Panel on Dietetic products. Nutrition and allergies (NDA) and Scientific Committee on Food (SCF).
- EFSA, (2009) (European Food Safety Authority) Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on cadmium in food. *The EFSA Journal* 980:1-139.
- Gupta N, Ram H, Kumar B (2016) Mechanism of Zinc absorption in plants: uptake, transport, translocation and accumulation. *Rev Environ Sci Biotechnol* 15:89–109. doi: 10.1007/s11157-016-9390-1
- Harmanescu M, Alda LM, Bordean DM, et al (2011) Heavy metals health risk assessment for population via consumption of vegetables grown in old mining area; a case study: Banat County, Romania. *Chem Cent J* 5:1.

- Harmsen J (2007) Measuring Bioavailability: From a Scientific Approach to Standard Methods. *J Environ Qual* 36:1420–1428. doi: 10.2134/jeq2006.0492
- INERIS, (2005) Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques: Chrome et ses dérivés. www.ineris.fr/substances/fr/substance/getDocument/2739.
- ISO, (2006) Soil Quality e Guidance for the Selection and Application of Methods for the Assessment of Bioavailability in Soil and Soil Materials. ISO/DIS 17402, Geneva, Switzerland.
- Laureysens I, De Temmerman L, Hastir T, et al (2005) Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture. II. Vertical distribution and phytoextraction potential. *Environ Pollut* 133:541–551. doi: 10.1016/j.envpol.2004.06.013
- Li N, Wang J, Song W-Y (2016) Arsenic Uptake and Translocation in Plants. *Plant Cell Physiol* 57:4–13. doi: 10.1093/pcp/pcv143
- Madejón P, Marañón T, Murillo JM, Robinson B (2006) In defence of plants as biomonitors of soil quality. *Environ Pollut* 143:1–3. doi: 10.1016/j.envpol.2005.11.008
- Madejón P, Marañón T, Murillo JM, Robinson B (2004) White poplar (*Populus alba*) as a biomonitor of trace elements in contaminated riparian forests. *Environ Pollut* 132:145–155. doi: 10.1016/j.envpol.2004.03.015
- McBride MB, Shayler HA, Russell-Anelli JM, et al (2015) Arsenic and Lead Uptake by Vegetable Crops Grown on an Old Orchard Site Amended with Compost. *Water Air Soil Pollut*. doi: 10.1007/s11270-015-2529-9
- Menzies NW, Donn MJ, Kopittke PM (2007) Evaluation of extractants for estimation of the phytoavailable trace metals in soils. *Environ Pollut* 145:121–130. doi: 10.1016/j.envpol.2006.03.021
- Migeon A, Richaud P, Guinet F, et al (2009) Metal Accumulation by Woody Species on Contaminated Sites in the North of France. *Water Air Soil Pollut* 204:89. doi: 10.1007/s11270-009-0029-5
- Oteef MDY, Fawy KF, Abd-Rabboh HSM, Idris AM (2015) Levels of zinc, copper, cadmium, and lead in fruits and vegetables grown and consumed in Aseer Region, Saudi Arabia. *Environ Monit Assess*. doi: 10.1007/s10661-015-4905-8
- Peijnenburg WJGM, Posthuma L, Eijsackers HJP, Allen HE (1997) A Conceptual Framework for Implementation of Bioavailability of Metals for Environmental Management Purposes. *Ecotoxicol Environ Saf* 37:163–172. doi: 10.1006/eesa.1997.1539
- Rosas-Castor JM, Guzmán-Mar JL, Alfaro-Barbosa JM, et al (2014) Evaluation of the transfer of soil arsenic to maize crops in suburban areas of San Luis Potosí, Mexico. *Sci Total Environ* 497–498:153–162. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.07.072
- Sluchyk V, Sluchyk I, Shyichuk A (2014) Assessment of both environmental cytotoxicity and trace metal pollution using *Populus simonii* Carr. as a bioindicator. *Environ Monit Assess* 186:6645–6650. doi: 10.1007/s10661-014-3879-2
- Smodiš B, Pignata ML, Saiki M, et al (2004) Validation and application of plants as biomonitors of trace element atmospheric pollution—a co-ordinated effort in 14 countries. *J Atmospheric Chem* 49:3–13.
- Tarricone K, Wagner G, Klein R (2015) Toward standardization of sample collection and preservation for the quality of results in biomonitoring with trees - A critical review. *Ecol Indic* 57:341–359. doi: 10.1016/j.ecolind.2015.05.012
- WHO, (2005) (World Health Organization) Nickel in drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality. World Health Organization (WHO/SDE/WSH/05.08/55), Geneva.
- Yadav RK, Minhas PS, Lal K, et al (2015) Accumulation of Metals in Soils, Groundwater and Edible Parts of Crops Grown Under Long-Term Irrigation with Sewage Mixed Industrial Effluents. *Bull Environ Contam Toxicol* 95:200–206. doi: 10.1007/s00128-015-1547-z

5.2.4 Conclusion

Lors de l'ingestion d'ETMs due à la consommation de plantes cultivées, il est maintenant admis qu'il n'est pas pertinent d'évaluer le risque sur la santé humaine en mesurant uniquement les concentrations totales d'ETMs dans le sol (Harmanescu et al., 2011). Cette mesure ne permet en effet pas de prévoir le transfert à la végétation pour tous les éléments. Elle n'apporte pas de valeurs limites pour la toxicité pour la santé humaine, et ne prend pas en compte les variations inter-spécifiques de l'absorption d'ETM. L'utilisation de la végétation sentinelle a été largement considérée, mais surtout pour la pollution atmosphérique pour laquelle une mesure directe est difficile (Smodiš et al., 2004). Pour tenir compte du risque, un biomoniteur efficace devrait refléter quantitativement le risque de transfert d'éléments du sol vers les parties comestibles (Smodiš et al., 2004), tenir compte du fait que le risque de transfert varie selon les espèces végétales, et être pertinent pour tous les éléments potentiellement toxiques dans un contexte spécifique.

L'existence d'une diversité interspécifique et la nécessité d'évaluer quantitativement le risque de transfert, suggèrent, en première approche, l'utilisation d'un plus large panel de plantes sentinelles. Cependant, les coûts analytiques et humains associés à un tel concept seraient non pertinents. Il serait plus pertinent de réduire l'approche à **une seule plante biomoniteur** si cette plante peut à elle seule refléter le risque de transfert pour tous les éléments pour lesquels un transfert est suspecté dans un contexte spécifique.

Le peuplier est un candidat particulièrement intéressant, en raison de sa capacité (bien documentée) élevée à accumuler divers ETMs (Celik et al., 2010 ; Laureysens et al., 2005 ; Sluchy et al., 2014 ; Migeon et al., 2008). Le cultivar Skado de peuplier est particulièrement intéressant car nous avons démontré sa capacité à accumuler le Cr, le Ni (manuscrit 4) et le Hg (manuscrit 1). En effet, dans le manuscrit 5, le cultivar Skado a accumulé de façon significative des teneurs plus élevées en Cd et Zn dans les feuilles lorsqu'il a été exposé au sol 2, par rapport au sol 1. En conséquence les feuilles de peuplier reflètent le transfert de la plupart des ETMs, présents sur les deux sites expérimentaux, par rapport aux cultures comestibles, ce qui démontre que cette espèce ligneuse est un candidat approprié pour la surveillance du transfert des éléments vers la végétation dans ces contextes anthropisés.

J'ai également mis en évidence que le poivron apparaît comme un modèle particulièrement prometteur. En effet, l'utilisation du poivron comme un biomoniteur passif implanté directement dans les jardins pourrait être considéré comme un développement

pertinent de mes travaux, étant donné que les feuilles de poivron accumulent principalement le Cd, le Zn (manuscrit 5) et le Hg (manuscrit 1)

L'approche multi-éléments basée sur l'ICP-AES démontre que les différents végétaux comestibles et le peuplier présentent différents profils d'accumulation d'éléments potentiellement toxiques dans deux contextes industriels différents, l'un lié à l'extraction du titane et l'autre au dépôt des sédiments de curage de canaux. Cette approche, conçue pour évaluer le transfert des ETMs du sol vers les plantes, indique que le choix des plantes qui seraient utilisées dans le cadre de l'implantation d'un jardin urbain a une importance non négligeable pour l'évaluation du risque sur la santé humaine. Dans notre étude, les valeurs les plus élevées des ETMs accumulés à partir du substrat de Thann ont été enregistrées dans les fruits de concombre pour le Cr et dans les feuilles de chou pour le S. Une spéciation détaillée des formes de Cr serait nécessaire dans ce contexte industriel pour évaluer précisément le risque lié à une ingestion. Les valeurs les plus élevées des ETMs accumulées à partir du substrat de Fresnes ont été enregistrées dans les feuilles de laitue pour le Cd, dans les feuilles de chou pour le Cd et le Zn et dans les fruits de concombre pour le Co. Pour compléter l'ensemble des risques précédemment cités, le risque d'ingestion directe de poussières adsorbées sur la surface des parties comestibles devrait faire l'objet d'études supplémentaires.

En comparant nos données aux recommandations de dose journalière admissible, nous avons démontré le faible risque, pour les éléments étudiés, de la culture directe sur le substrat de Thann dans un scénario d'exposition maximisée, à l'exception du Cr pour lequel la toxicité dépend de la forme biodisponible. Cependant, nous n'avons pas tenu compte des effets cumulatifs ou combinés des divers éléments car il n'existe pas de recommandations officielles précises et des recherches supplémentaires seraient nécessaires pour aborder cette question. Par ailleurs, sur le sol de Fresnes nous avons démontré un risque de transfert de Cd vers les parties comestibles des légumes-feuilles étudiés, et un faible risque de transfert de Zn dans les parties comestibles des légumes étudiés.

6. Conclusions générales et perspectives




Objectif général	<p>Etude du transfert d'ETM s entre les différents compartiments sols, couvert végétal et atmosphère, dans des environnements exposés à des activités anthropiques génératrices d'ETM s; risque sanitaire</p>		
Sites étudiés	 <p>Tavaux</p>	 <p>Fresnes</p>	 <p>Thann</p>
Problématique	<p>Substrat enrichi en Hg (et As), issu de l'activité électrolytique de l'extraction du Cl (Solvay)</p>	<p>Sol pollué (Zn, Pb et Cd) par le dépôt de sédiments issus du curage des canaux (VNF)</p>	<p>Substrat enrichi en Cr, Fe, Mn, As issu de l'activité d'extraction du Ti (Cristal)</p>
Principal enjeu écologique	<p>Revégétalisation pour stabiliser les sols et limiter la dispersion de poussières et ETM s.</p>		
Faits scientifiques marquants	<p>Entrée du Hg dans les feuilles par voie atmosphérique</p>	<p>Accumulation d'ETM s préférentiellement dans les légumes-feuilles. Le statut « accumulateur » du peuplier est confirmé</p>	
Impact sanitaire	<p>Transfert avéré de Hg dans les feuilles. Risque limité pour la consommation de légumes-fruits</p>	<p>Risque avec certains ETM s (Cd), pour la consommation de légumes-feuilles</p>	<p>Risque avec le Mn mais cas du Cr à préciser</p>

Figure 36: Schéma explicatif de l'objectif général de la thèse, des sites d'études et leur problématique, et des faits marquants de l'ensemble de ces travaux.

L'objectif principal de la thèse était l'étude des modalités de transfert d'ETMs dans les biomasses végétales. Mon travail a reposé sur 3 sites expérimentaux présentés dans la **Figure 36**, et pour lesquels l'objectif commun est à terme de limiter la dispersion des contaminants en améliorant le couvert végétal. Plusieurs questions scientifiques étaient à l'origine de cette étude :

- par quelle voie le Hg pourrait être transféré aux feuilles des végétaux poussant aux alentours du site de Tavaux ?
- quelles sont les formes de Hg dans les feuilles des espèces étudiées ?
- quels risques sanitaires représentaient le transfert des différentes ETMs depuis ces 3 sites vers les végétaux d'intérêt agronomique.

Afin de répondre à ces questions, le travail présenté dans cette thèse reposait sur deux objectifs spécifiques:

L'objectif 1 visait à mettre en évidence les modalités de transfert et de stockage du Hg vers les parties aériennes de végétaux cultivés sur substrat enrichi en Hg et issu du site de Tavaux. Pour réaliser cet objectif, nous avons privilégié une exposition au Hg en conditions naturelles plutôt qu'en condition artificielle. L'exposition artificielle repose souvent sur l'utilisation d'une seule forme de Hg, par exemple le HgCl₂ (Rea et al., 2002; Greger et al. 2005; Dunagan et al., 2007; Niu et al. 2011), qui certes permet d'étudier les mécanismes physiologiques mais ne reflète pas l'environnement auquel sont exposés les végétaux.

Au travers de ce premier objectif, nous avons pu :

- 1) **Mettre en évidence la voie de transfert du Hg vers les feuilles de peuplier utilisé en phytostabilisation des ETMs) :**
 - a. Le peuplier est une espèce largement utilisée en phytostabilisation de sols pollués par les ETMs (i.e. Cd et Zn (Migeon et al., 2009b), et le cultivar Skado a été implanté avec succès sur le site de Tavaux (projet BIOFILTER). Sur un site enrichi en Hg, le cycle du Hg et son interception potentielle par le couvert ligneux méritent d'être étudiés. Les dispositifs expérimentaux (*in situ*) mis en place sur le site de Tavaux et sur le site contrôle de Montbéliard, et sous conditions contrôlées en phytotron nous ont permis de souligner l'importance de l'environnement immédiat des végétaux (i.e. atmosphère) sur le transfert de Hg vers les feuilles, quelles que soient les concentrations de Hg dans les substrats.

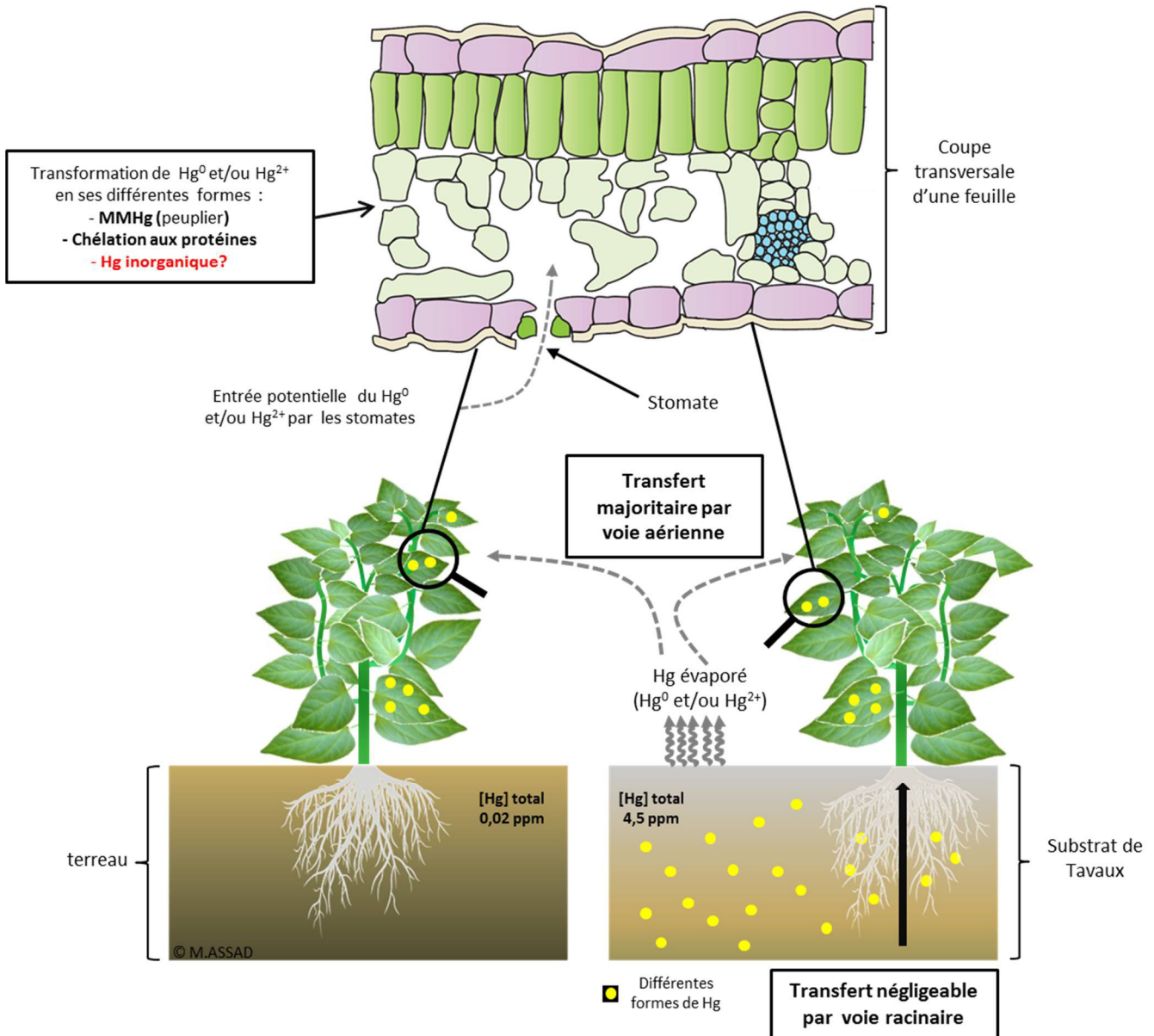


Figure 37: Schéma représentatif des principaux résultats liés au 1^{er} objectif de thèse : i) le transfert de Hg issu du substrat de Tavaux dans la biomasse foliaire des espèces étudiées (peuplier et Solanacées) se réalise essentiellement par voie aérienne ii) le Hg absorbé peut ensuite être chélaté aux protéines (peuplier et Solanacées) et/ou méthylié (peuplier), même si l'origine du MMHg dans les feuilles de peuplier reste incertaine.

Des analyses sur le contenu en Hg des feuilles des plants de peupliers cultivés sur substrat contrôle ou enrichis en Hg exposés au Hg atmosphérique ne montrant pas de différences significatives, nous avons pu montrer que la voie atmosphérique est prépondérante pour l'entrée de Hg.

- b. Nos données issues de ces deux expériences au champ et en phytotron confirment la prédominance d'une des hypothèses de départ, à savoir que le transfert du Hg est réalisé par voie aérienne (absorption foliaire du Hg atmosphérique) (**Figure 37**) (comme précédemment démontré chez quelques espèces (**Tableau 5**). Cette voie de transfert du Hg suggère cependant d'élucider le devenir du Hg après qu'il ait été absorbé par les feuilles, et notamment les modalités de transfert vers les tissus pérennes (tiges et tronc), de même que la forme de stockage. Si le Hg se propage par voie essentiellement aérienne, il serait également opportun de déterminer si cette voie présente le risque lié à l'accumulation du Hg dans des espèces d'intérêt agronomique à proximité de sites enrichis en Hg.

2) **Déterminer la voie de transfert du Hg chez plusieurs espèces d'intérêt agronomiques de la famille des Solanacées qui présentent un potentiel d'accumulation du Hg avéré**, ainsi que le contenu du Hg dans les différents âges de feuille et dans les fruits.

- a. Après avoir démontré que le peuplier, et notamment ses tissus foliaires était un bon intercepteur du Hg atmosphérique, nous avons choisi de tester d'autres espèces candidates aptes à accumuler le Hg (Solanacées) et notamment celles destinées à la consommation alimentaire (poivron, aubergine et tomate) et commerciale (tabac) par des dispositifs expérimentaux similaires à ceux utilisés sous conditions contrôlées pour le peuplier.
- b. Ces dispositifs expérimentaux en phytotron nous ont permis de montrer également l'importance de l'atmosphère sur le transfert du Hg vers les feuilles des Solanacées étudiées, quelles que soient les concentrations de Hg dans les substrats. En revanche, le transfert vers les fruits exposés à une atmosphère enrichie en Hg reste négligeable.
- c. Comme le peuplier, une corrélation positive a été enregistrée entre la concentration en Hg foliaire et l'âge de la feuille chez les quatre espèces étudiées. L'accumulation du Hg dans les feuilles de poivron et tabac était la plus élevée par rapport aux autres espèces étudiées.
- d. La masse fraîche de légumes à ingérer pour atteindre la dose journalière tolérée (DJT) de Hg a été calculée. Ces masses étaient très au-delà d'une quantité raisonnablement ingérable via l'alimentation quotidienne, ce qui est probablement dû à l'absence de translocation du Hg des feuilles vers les fruits (voie source/puits).

Par contre, le taux maximal de Hg permis dans l'alimentation animale est en effet de $0,11 \mu\text{g g}^{-1}$ de masse sèche (Directive, 2002), et cette valeur-seuil est clairement atteinte dans nos résultats au niveau des feuilles, ce qui induirait le transfert de Hg et son accumulation dans les niveaux trophiques supérieurs de la chaîne alimentaire et provoquerait donc des effets indirects sur la santé humaine.

- e. Cette étude nous a permis de démontrer également la prédominance du transfert du Hg par voie atmosphérique vers les feuilles des Solanacées étudiées (**Figure 37**), et ainsi de mettre en évidence des candidats potentiels (surtout les feuilles de poivron et tabac) dans le domaine de la bioindication du Hg atmosphérique.

→ **D'autres études, telles qu'une exposition à des teneurs croissantes en Hg atmosphérique de Solanacées (poivron et/ou tabac) devrait être réalisée, afin de démontrer leur potentiel en biomonitoring.**

→ **Il serait utile de tester d'autres espèces/cultivars de la famille des Solanacées car des différences notables dans la capacité d'interception du Hg ont pu être observées entre espèces.**

→ **Ces études permettraient de définir le spectre d'accumulation du Hg en fonction d'espèces étudiées et donc de préciser le cadre d'utilisation de ces espèces en phytomanagement.**

3) Identifier plusieurs modalités de stockage du Hg chez le peuplier et le poivron.

- a. L'absence de translocation du Hg entre les feuilles et les fruits des Solanacées soulève la nécessité de mettre en évidence les mécanismes de tolérance au Hg qui pourraient impliquer des mécanismes connus pour d'autres éléments (la chélation du Hg aux protéines, fixation à la paroi, séquestration dans la vacuole, méthylation) et/ou d'autres mécanismes non encore élucidés.
- b. La méthylation du Hg a été déterminée dans les feuilles de peuplier et atteint 7,5% du Hg total détecté. En revanche, à l'inverse de peuplier le méthyl-Hg n'a pas été détecté dans les feuilles de poivron.
- c. La chélation du Hg à la fraction de protéines hydrosoluble a été mise en évidence. Cette fraction représente une part importante (6 à 22%) du Hg intracellulaire. En revanche la chélation aux acides aminés n'a pas été révélée lors de nos expériences.

Une étude similaire sur le poisson dorade *Brachyplatystoma rousseauxii* a rapporté que la fraction liée aux protéines pouvait constituer jusqu'à 65 % du Hg total détecté dans les muscles de ce poisson (Braga et al., 2015).

- Il serait opportun d'isoler et d'identifier les protéines se liant au Hg par différentes approches de protéomique (gels bidirectionnels 2D, séparation par chromatographie).
- Pour compléter ces données, il serait essentiel de vérifier les formes inorganiques du Hg potentiellement transformées dans les tissus foliaires.

L'objectif 2 visait à mettre en évidence le transfert d'ETMs à partir de sols contaminés issus des sites de Thann et Fresnes chez des espèces d'intérêt agronomique

Au travers du deuxième objectif, nous avons pu :

4) Déterminer les espèces (légumes-feuilles et légumes-fruits) les plus accumulatrices d'ETMs et calculer la masse fraîche comestible à ingérer pour atteindre la dose journalière tolérée (DJT) de chaque ETM.

- a. Nous avons exposé des plantes d'intérêt agronomique (laitue, chou, poivron et concombre) aux sols des sites de Thann et Fresnes, afin de simuler une exposition aux substrats enrichis. Le peuplier Skado a également été cultivé comme plante ligneuse de référence.
- b. Le dispositif expérimental en conditions contrôlées a été mis en place afin d'obtenir un scénario maximisé de risque en cultivant directement les végétaux étudiés dans les substrats issus des sites de Thann et de Fresnes.
- c. La masse fraîche de différentes parties comestibles à ingérer a été calculée pour atteindre la dose journalière tolérante (DJT) de chaque ETM a été calculée. Ces masses pour le site de Thann étaient proches de quantités ingérables quotidiennement pour le Mn (< 1 kg de chou) et pour le Cr (si on ne considère que la forme la plus toxique du Cr (CrVI) : <0,5 kg de chou, ou de laitue et <0,2 kg de fruit de concombre). Pour le site de Fresnes ces masses étaient proches d'une quantité ingérable quotidiennement pour le Cd (< 1 kg de chou, < 0,5 kg de laitue, et 1,2 kg de poivron), pour le Co (< 0,3 kg de concombre) et pour le Zn (1,5 kg de chou). En revanche, un des faits marquants de cette étude, est l'absence de transfert du Pb vers tous les végétaux étudiés. Ce résultat est cohérent avec le faible taux extractible de Pb dans le sol de Fresnes.
- d. Le transfert des ETMs (notamment le Cd et le Zn) vers le peuplier a confirmé des études précédentes (Migeon et al., 2009), ce qui souligne l'importance d'une gestion adaptée de la biomasse produite sur de tels sites.
- e. Cette étude nous a permis de mettre en évidence les espèces comestibles accumulatrices et non accumulatrices d'ETMs présents sur ces sites, afin de mieux sélectionner des espèces

potagères à cultiver à moindre risque aux alentours des sites contaminés. Les légumes-feuilles semblent d'être plus accumulateurs que ceux à fruit pour la majorité des ETMs

- Des tests de spéciation du Cr dans le substrat de Thann et dans les tissus végétaux sont à envisager et permettrait de mieux évaluer le risque lié au transfert de cet élément dans les biomasses comestibles.
- Il serait intéressant de tester d'autres espèces de légumes-feuilles et à fruits dans ces contextes industriels afin de mettre en place un catalogue spécifique pour chaque site destiné au publique.
- Évaluer le risque d'ingestion directe de poussières adsorbées sur la surface des parties comestibles devrait faire l'objet d'études supplémentaires.

5) Mettre en évidence les corrélations positives et négatives entre les éléments majeurs et les ETMs.

- a. L'analyse en composantes principales (ACP) a montré une corrélation positive entre le Ti et le S qui a déjà été rapporté par Pii et al. (2015). Ainsi, cette corrélation a été observée entre le Cu, Ni et le Zn, et précédemment rapportée par (Kabata-Pendias, 2011). En revanche, le Ca et le Mn avaient un effet antagoniste sur l'absorption du Cu et du Zn.
- b. L'ensemble de ces données obtenu dans le cadre de ce travail de thèse est cohérent avec les résultats rapportés par des études précédentes, mais avec une augmentation du panel de végétaux d'intérêt alimentaire étudiés notamment dans un contexte proche d'une exposition naturelle.

Mes travaux de thèse présentent des résultats portant sur deux axes de recherche importants, écologique et sanitaire.

D'un point de vue écologique ; les travaux de cette thèse confirment l'importance et la nécessité de la végétalisation des sites contaminés par des ETMs afin de limiter la dispersion des poussières, et en conséquence des ETMs aux alentours. Mes travaux sur le peuplier, déjà implanté sur les sites de Tavaux et Fresnes, et utilisé en phytostabilisation du Hg, du Cd et du Zn, grâce à son système racinaire développé, ont permis de souligner l'intérêt supplémentaire de cette espèce qui intercepte également les composés volatiles du Hg par les tissus foliaires. Les travaux sur les Solanacées nous ont permis également d'augmenter le panel d'espèces utilisées comme bioindicateur du Hg atmosphérique.

D'un point de vue sanitaire, il est connu que les aliments d'origine végétale contribuent à l'exposition aux ETMs de l'Homme. Les travaux de cette thèse soulignent l'importance d'estimer le risque lié à l'ingestion d'espèces végétales d'intérêt alimentaires cultivées régulièrement par les habitants aux alentours des sites potentiellement émetteurs d'ETMs, en générant un lien entre espèce et ETMs accumulés. Ces travaux informent sur les espèces porteuses de risques aux populations ; et inversement sur celles qu'il serait plus pertinent de cultiver et qui limitent le risque aux alentours de sites industriels émetteurs d'ETMs. Par exemple, la consommation de fruits de Solanacées cultivés dans des environnements enrichis en Hg à des concentrations similaires à celles de notre étude ne semble représenter aucun risque et je recommanderais de sélectionner des légumes-fruits plutôt que des légumes-feuilles pour le jardinage urbain, en zone urbaine potentiellement contaminée par le Hg ($> 2 \text{ ng Hg m}^{-3}$ d'air). De plus, je ne recommanderais pas l'utilisation des parties non comestibles (i.e. feuilles) de ces légumes-fruits pour l'alimentation animale. Compte tenu d'autres sources potentielles de Hg ingérées par l'homme (fruits de mer, légumes-feuille, respiration de l'air et robinet d'eau), je ne recommanderais pas non plus la culture du tabac en milieu urbain exposé au Hg pour la consommation locale ou l'industrie du tabac.

Un des autres faits marquants de mes travaux de thèse concernent la distinction entre tissus accumulateurs d'ETMs et tissus non accumulateurs. Les feuilles des légumes-feuilles ou des légumes-fruits (les feuilles des légumes à fruit peuvent être destinés à l'alimentation animale) représentent les organes les plus accumulant de Cd, Mn et le Zn (sauf la laitue qui n'accumule pas le Zn). En revanche les fruits ne représentent aucun risque pour ces ETMs sauf pour le Cr qui s'accumule davantage dans les fruits de concombre. En conséquence l'utilisation de légumes-fruits serait plus appropriée dans les jardins urbains, à proximité de ces trois contextes anthropiques.

Ce travail apporte donc un certain nombre d'éléments pour la compréhension du devenir d'ETMs et notamment le Hg dans le système sol/plante et les risques associés à l'ingestion des parties comestibles des végétaux cultivés potentiellement contaminés. Par cette meilleure compréhension des mécanismes, les industries potentiellement émettrices d'ETMs pourraient ainsi envisager une gestion des risques plus pertinente pour leurs sites et sols pollués. Cependant, comme le transfert sol/plante est complexe car influencé par de nombreux facteurs en interaction liés à la fois aux caractéristiques du sol, de l'espèce végétale et d'ETM, de nombreuses perspectives découlent de ces recherches.

Références bibliographiques

- Adamo, P., Iavazzo, P., Albanese, S., Agrelli, D., De Vivo, B., Lima, A., 2014. Bioavailability and soil-to-plant transfer factors as indicators of potentially toxic element contamination in agricultural soils. *Sci. Total Environ.* 500–501, 11–22. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.08.085
- Adams, M.L., Zhao, F.J., McGrath, S.P., Nicholson, F.A., Chambers, B.J., 2004. Predicting Cadmium Concentrations in Wheat and Barley Grain Using Soil Properties. *J. Environ. Qual.* 33, 532. doi:10.2134/jeq2004.5320
- ADEME, 2009. Traitabilité des sols pollués: Guide méthodologique pour la sélection des techniques et l'évaluation de leurs performances - Ministère de l'Environnement, de l'Energie et de la Mer [WWW Document]. URL <http://www.developpement-durable.gouv.fr/Traitabilite-des-sols-pollues.html> (accessed 8.24.16).
- Adriano, D.C., Wenzel, W.W., Vangronsveld, J., Bolan, N.S., 2004. Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. *Geoderma, Biogeochemical processes and the role of heavy metals in the soil environment* 122, 121–142. doi:10.1016/j.geoderma.2004.01.003
- Alloway, B.J., 1995. *Heavy Metals in Soils*. Springer Science & Business Media.
- Amos, H.M., Sonke, J.E., Obrist, D., Robins, N., Hagan, N., Horowitz, H.M., Mason, R.P., Witt, M., Hedgecock, I.M., Corbitt, E.S., Sunderland, E.M., 2015. Observational and Modeling Constraints on Global Anthropogenic Enrichment of Mercury. *Environ. Sci. Technol.* 49, 4036–4047. doi:10.1021/es5058665
- Baird, C., Cann, M., 2012. *Environmental Chemistry*. W. H. Freeman.
- Baize, D., 1997. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France): Références et stratégies d'interprétation. Programme ASPITET. Editions Quae.
- Barkay, T., Gillman, M., Turner, R.R., 1997. Effects of dissolved organic carbon and salinity on bioavailability of mercury. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4267–4271.
- Benoit, J.M., Cynthia C. Gilmour, Robert P. Mason, and Heyes, A., 1999a. Sulfide Controls on Mercury Speciation and Bioavailability to Methylating Bacteria in Sediment Pore Waters [WWW Document]. URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es9808200>
- Benoit, J.M., Gilmour, C.C., Heyes, A., Mason, R.P., Miller, C.L., 2002. Geochemical and Biological Controls over Methylmercury Production and Degradation in Aquatic Ecosystems, in: *Biogeochemistry of Environmentally Important Trace Elements*, ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 262–297.
- Benoit, J.M., Gilmour, C.C., Mason, R.P., 2001a. Aspects of Bioavailability of Mercury for Methylation in Pure Cultures of *Desulfobulbus propionicus* (1pr3). *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 51–58. doi:10.1128/AEM.67.1.51-58.2001
- Benoit, J.M., Gilmour, C.C., Mason, R.P., 2001b. The influence of sulfide on solid-phase mercury bioavailability for methylation by pure cultures of *Desulfobulbus propionicus* (1pr3). *Environ. Sci. Technol.* 35, 127–132.
- Benoit, J.M., Mason, R.P., Gilmour, C.C., 1999b. Estimation of mercury-sulfide speciation in sediment pore waters using octanol–water partitioning and implications for availability to methylating bacteria. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2138–2141. doi:10.1002/etc.5620181004
- Bergner, D., 1982. Membrane cells for chlor-alkali electrolysis. *J. Appl. Electrochem.* 12, 631–644.
- Bert, V., Seuntjens, P., Dejonghe, W., Lacherez, S., Thuy, H.T.T., Vandecasteele, B., 2009. Phytoremediation as a management option for contaminated sediments in tidal marshes, flood control areas and dredged sediment landfill sites. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16, 745–764. doi:10.1007/s11356-009-0205-6
- Bose, S., Bhattacharyya, A.K., 2008. Heavy metal accumulation in wheat plant grown in soil amended with industrial sludge. *Chemosphere* 70, 1264–1272. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.07.062

- Boszke, L., Kowalski, A., Astel, A., Barański, A., Gworek, B., Siepak, J., 2007. Mercury mobility and bioavailability in soil from contaminated area. *Environ. Geol.* 55, 1075–1087. doi:10.1007/s00254-007-1056-4
- Capuana, M., 2011. Heavy metals and woody plants - biotechnologies for phytoremediation. *IForest - Biogeosciences For.* 4, 7–15. doi:10.3832/ifor0555-004
- Carrasco-Gil, S., Siebner, H., LeDuc, D.L., Webb, S.M., Millán, R., Andrews, J.C., Hernández, L.E., 2013. Mercury Localization and Speciation in Plants Grown Hydroponically or in a Natural Environment. *Environ. Sci. Technol.* 47, 3082–3090. doi:10.1021/es303310t
- Chaffai, R., Elhammadi, M.A., Seybou, T.N., Tekitek, A., Marzouk, B., El Ferjani, E., 2007. Altered Fatty Acid Profile of Polar Lipids in Maize Seedlings in Response to Excess Copper. *J. Agron. Crop Sci.* 193, 207–217. doi:10.1111/j.1439-037X.2007.00252.x
- Chalot, M., Blaudez, D., Rogaume, Y., Provent, A.-S., Pascual, C., 2012. Fate of Trace Elements during the Combustion of Phytoremediation Wood. *Environ. Sci. Technol.* 46, 13361–13369. doi:10.1021/es3017478
- Clarkson, T.W., 2002. The three modern faces of mercury. *Environ. Health Perspect.* 110, 11–23.
- Clarkson, T.W., Magos, L., 2006. The Toxicology of Mercury and Its Chemical Compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 36, 609–662. doi:10.1080/10408440600845619
- Clemens, S., Palmgren, M.G., Krämer, U., 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci.* 7, 309–315. doi:10.1016/S1360-1385(02)02295-1
- Clijsters, H., Assche, F.V., 1985. Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynth. Res.* 7, 31–40. doi:10.1007/BF00032920
- Colombo, M.J., Ha, J., Reinfelder, J.R., Barkay, T., Yee, N., 2014. Oxidation of Hg(0) to Hg(II) by diverse anaerobic bacteria. *Chem. Geol.* 363, 334–340. doi:10.1016/j.chemgeo.2013.11.020
- Cui, Y.-J., Zhu, Y.-G., Zhai, R.-H., Chen, D.-Y., Huang, Y.-Z., Qiu, Y., Liang, J.-Z., 2004. Transfer of metals from soil to vegetables in an area near a smelter in Nanning, China. *Environ. Int.* 30, 785–791. doi:10.1016/j.envint.2004.01.003
- DalCorso, G., 2012. Heavy Metal Toxicity in Plants, in: Furini, A. (Ed.), *Plants and Heavy Metals*, SpringerBriefs in Molecular Science. Springer Netherlands, pp. 1–25. doi:10.1007/978-94-007-4441-7_1
- Dan, T., Hale, B., Johnson, D., Conard, B., Stibel, B., Veska, E., 2008. Toxicity thresholds for oat (*Avena sativa* L.) grown in Ni-impacted agricultural soils near Port Colborne, Ontario, Canada. *Can. J. Soil Sci.* 88, 389–398. doi:10.4141/CJSS07070
- Davies, F.T. Jr., Puryear, J.D., Newton, R.J., Egilla, J.N., Grossi, J.A.S., 2002. Mycorrhizal Fungi Increase Chromium Uptake by Sunflower Plants: Influence on Tissue Mineral Concentration, Growth, and Gas Exchange. *J. Plant Nutr.* 25, 2389–2407. doi:10.1081/PLN-120014702
- De Temmerman, L., Waegeneers, N., Claeys, N., Roekens, E., 2009. Comparison of concentrations of mercury in ambient air to its accumulation by leafy vegetables: An important step in terrestrial food chain analysis. *Environ. Pollut., The Behaviour and Effects of Nanoparticles in the Environment* 157, 1337–1341. doi:10.1016/j.envpol.2008.11.035
- Defoe, P.P., Hettiarachchi, G.M., Benedict, C., Martin, S., 2014. Safety of gardening on lead- and arsenic-contaminated urban brownfields. *J. Environ. Qual.* 43, 2064–2078. doi:10.2134/jeq2014.03.0099
- Delplanque, M., Collet, S., Del Gratta, F., Schnuriger, B., Gaucher, R., Robinson, B., Bert, V., 2013. Combustion of *Salix* used for phytoextraction: The fate of metals and viability of the processes. *Biomass Bioenergy* 49, 160–170. doi:10.1016/j.biombioe.2012.12.026
- Deneux-Mustin, S., Roussel-Debet, S., Mustin, C., Henner, P., Munier-Lamy, C., Colle, C., Berthelin, J., Garnier-Laplace, J., Leyval, C., 2003. Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces : (influence des micro-organismes du sol).

- Dietz, R., Riget, F., Cleemann, M., Aarkrog, A., Johansen, P., Hansen, J.C., 2000. Comparison of contaminants from different trophic levels and ecosystems. *Sci. Total Environ.* 245, 221–231. doi:10.1016/S0048-9697(99)00447-7
- Ding, C., Zhang, T., Wang, X., Zhou, F., Yang, Y., Huang, G., 2013. Prediction Model for Cadmium Transfer from Soil to Carrot (*Daucus carota* L.) and Its Application To Derive Soil Thresholds for Food Safety. *J. Agric. Food Chem.* 61, 10273–10282. doi:10.1021/jf4029859
- Du, S.-H., Fang, S.C., 1983. Catalase activity of C3 and C4 species and its relationship to mercury vapor uptake. *Environ. Exp. Bot.* 23, 347–353. doi:10.1016/0098-8472(83)90009-6
- Dyrssen, D., Wedborg, M., 1991. The sulphur-mercury(II) system in natural waters. *Water. Air. Soil Pollut.* 56, 507–519. doi:10.1007/BF00342295
- Egler, S.G., Rodrigues-Filho, S., Villas-Bôas, R.C., Beinhoff, C., 2006. Evaluation of mercury pollution in cultivated and wild plants from two small communities of the Tapajós gold mining reserve, Pará State, Brazil. *Sci. Total Environ.*, Selected papers from the 7th International Conference on Mercury as a Global Pollutant, Ljubljana, Slovenia June 27 - July 2, 2004 368, 424–433. doi:10.1016/j.scitotenv.2005.09.037
- Ericksen, J.A., Gustin, M.S., 2004. Foliar exchange of mercury as a function of soil and air mercury concentrations. *Sci. Total Environ.* 324, 271–279. doi:10.1016/j.scitotenv.2003.10.034
- Esbrí, J.M., López-Berdonces, M.A., Fernández-Calderón, S., Higuera, P., Díez, S., 2014. Atmospheric mercury pollution around a chlor-alkali plant in Flix (NE Spain): an integrated analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 4842–4850. doi:10.1007/s11356-014-3305-x
- Faller, P., Kienzler, K., Krieger-Liszkay, A., 2005. Mechanism of Cd²⁺ toxicity: Cd²⁺ inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential Ca²⁺ site. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1706, 158–164. doi:10.1016/j.bbabi.2004.10.005
- Fantozzi, F., Monaci, F., Blanusa, T., Bargagli, R., 2013. Holm Oak (*Quercus ilex* L.) canopy as interceptor of airborne trace elements and their accumulation in the litter and topsoil. *Environ. Pollut.*, Selected Papers from Urban Environmental Pollution 2012 183, 89–95. doi:10.1016/j.envpol.2012.11.037
- Farago, M.E., 1994. Plants and the chemical elements: biochemistry, uptake, tolerance and toxicity. VCH.
- Feng, X., Li, G., Qiu, G., 2004. A preliminary study on mercury contamination to the environment from artisanal zinc smelting using indigenous methods in Hezhang county, Guizhou, China—Part 1: mercury emission from zinc smelting and its influences on the surface waters. *Atmos. Environ.* 38, 6223–6230. doi:10.1016/j.atmosenv.2004.07.020
- Feng, X., Sommar, J., Lindqvist, O., Hong, Y., 2002. Occurrence, Emissions and Deposition of Mercury during Coal Combustion in the Province Guizhou, China. *Water. Air. Soil Pollut.* 139, 311–324. doi:10.1023/A:1015846605651
- Ferri, R., Hashim, D., Smith, D.R., Guazzetti, S., Donna, F., Ferretti, E., Curatolo, M., Moneta, C., Beone, G.M., Lucchini, R.G., 2015. Metal contamination of home garden soils and cultivated vegetables in the province of Brescia, Italy: Implications for human exposure. *Sci. Total Environ.* 518–519, 507–517. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.02.072
- Finster, M.E., Gray, K.A., Binns, H.J., 2004. Lead levels of edibles grown in contaminated residential soils: a field survey. *Sci. Total Environ.* 320, 245–257. doi:10.1016/j.scitotenv.2003.08.009
- Fleming, E.J., Mack, E.E., Green, P.G., Nelson, D.C., 2006. Mercury Methylation from Unexpected Sources: Molybdate-Inhibited Freshwater Sediments and an Iron-Reducing Bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 457–464. doi:10.1128/AEM.72.1.457-464.2006
- Foy, C.D., Chaney R. L., White M.C., 1978. The Physiology of Metal Toxicity in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 29, 511–566. doi:10.1146/annurev.pp.29.060178.002455
- Fränzle, S., 2009. Chemical Elements in Plants and Soil: Parameters Controlling Essentiality. Springer Science & Business Media.

- Gadd, G.M., 1993. Interactions of fungus with toxic metals. *New Phytol.* 124, 25–60. doi:10.1111/j.1469-8137.1993.tb03796.x
- Gadd, G.M., Rhee, Y.J., Stephenson, K., Wei, Z., 2012. Geomycology: metals, actinides and biominerals. *Environ. Microbiol. Rep.* 4, 270–296. doi:10.1111/j.1758-2229.2011.00283.x
- Galanis, A., Karapetsas, A., Sandaltzopoulos, R., 2009. Metal-induced carcinogenesis, oxidative stress and hypoxia signalling. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen., Oxidative Stress and Mechanisms of Environmental Toxicity* 674, 31–35. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.10.008
- Galindo, P.A., Feo, F., García, R., Gómez, E., Borja, J., Fernández, F., 1997. Mercurochrome allergy. Immediate and delayed hypersensitivity. *Allergy* 52, 1138–1141. doi:10.1111/j.1398-9995.1997.tb00190.x
- Gardea-Torresdey, J.L., Peralta-Videa, J.R., de la Rosa, G., Parsons, J.G., 2005. Phytoremediation of heavy metals and study of the metal coordination by X-ray absorption spectroscopy. *Coord. Chem. Rev., 36th International Conference on Coordination Chemistry, Merida, Mexico, July 2004* 249, 1797–1810. doi:10.1016/j.ccr.2005.01.001
- Giovanella, P., Cabral, L., Bento, F.M., Gianello, C., Camargo, F.A.O., 2016. Mercury (II) removal by resistant bacterial isolates and mercuric (II) reductase activity in a new strain of *Pseudomonas* sp. B50A. *New Biotechnol.* 33, 216–223. doi:10.1016/j.nbt.2015.05.006
- Gochfeld, M., 2003. Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. *Ecotoxicol. Environ. Saf., Special Issue on Methodologies for Assessing Exposures to Metals: Speciation, Bioaccessibility and Bioavailability in the Environment, Food and Feed* 56, 174–179. doi:10.1016/S0147-6513(03)00060-5
- Greger, M., Wang, Y., Neuschütz, C., 2005. Absence of Hg transpiration by shoot after Hg uptake by roots of six terrestrial plant species. *Environ. Pollut.* 134, 201–208. doi:10.1016/j.envpol.2004.08.007
- Gutknecht, J., 1981. Inorganic mercury (Hg²⁺) transport through lipid bilayer membranes. *J. Membr. Biol.* 61, 61–66. doi:10.1007/BF01870753
- Harada, M., 1995. Minamata Disease: Methylmercury Poisoning in Japan Caused by Environmental Pollution. *Crit. Rev. Toxicol.* 25, 1–24. doi:10.3109/10408449509089885
- Harangozo, L., Timoracká, M., Árvay, J., Vollmannová, A., Trebichalský, P., 2013. Minority cereals cultivated under loaded model conditions / Rzadkie gatunki zbóż uprawiane w warunkach obciążenia metalami ciężkimi. *Ochr. Śr. Zasobów Nat. - Environ. Prot. Nat. Resour.* 24, 29–33. doi:10.2478/oszn-2013-0013
- Hassett, D.J., Heebink, L.V., Pflughoeft-Hassett, D.F., 2004. Potential for mercury vapor release from coal combustion by-products. *Fuel Process. Technol., Air Quality III: Mercury, Trace Elements and Particulate Matter* 85, 613–620. doi:10.1016/j.fuproc.2003.11.010
- Hines, M.E., Poitras, E.N., Covelli, S., Faganeli, J., Emili, A., Žižek, S., Horvat, M., 2012. Mercury methylation and demethylation in Hg-contaminated lagoon sediments (Marano and Grado Lagoon, Italy). *Estuar. Coast. Shelf Sci., The MIRACLE Project (Mercury Interdisciplinary Research project for Appropriate Clam farming in Lagoon Environment)* 113, 85–95. doi:10.1016/j.ecss.2011.12.021
- Hopkins, W.G., Huner, N.P.A., 2008. *Introduction to Plant Physiology*, 4th Edition. Wiley Global Education.
- Horowitz, H.M., Jacob, D.J., Amos, H.M., Streets, D.G., Sunderland, E.M., 2014. Historical Mercury Releases from Commercial Products: Global Environmental Implications. *Environ. Sci. Technol.* 48, 10242–10250. doi:10.1021/es501337j
- Horvat, M., Gibičar, D., 2005. Speciation of Mercury: Environment, Food, Clinical, and Occupational Health, in: Editor-in-Chief, R.C., Editor, J.C.A., Editor, H.C.A., Editor, K.H.A. (Eds.), *Handbook of Elemental Speciation II – Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 281–304.
- INRS (Institut national de recherche et de sécurité), 2003. Brochure Le mercure: Prévention de hydrargyrisme, laboratoire de chimie analytique minérale. ED546 page 40. [WWW

- Document], n.d. URL <http://www.inrs.fr/media.html?refINRS=ED%20546> (accessed 7.8.16).
- Izquierdo, M., De Miguel, E., Ortega, M.F., Mingot, J., 2015. Bioaccessibility of metals and human health risk assessment in community urban gardens. *Chemosphere* 135, 312–318. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.04.079
- Javot, H., Maurel, C., 2002. The Role of Aquaporins in Root Water Uptake. *Ann. Bot.* 90, 301–313. doi:10.1093/aob/mcf199
- Jay, F.M., Morel M., Hemond, H.F., 2000. Mercury Speciation in the Presence of Polysulfides [WWW Document]. URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es9911115>.
- Jolly, Y.N., Islam, A., Akbar, S., 2013. Transfer of metals from soil to vegetables and possible health risk assessment. *SpringerPlus* 2, 1–8. doi:10.1186/2193-1801-2-385
- Jomova, K., Baros, S., Valko, M., 2012. Redox active metal-induced oxidative stress in biological systems. *Transit. Met. Chem.* 37, 127–134. doi:10.1007/s11243-012-9583-6
- Kabata-Pendias, A., c2011. Trace elements in soils and plants, 4th ed. ed. CRC Press, Boca Raton, FL :
- Kabata-Pendias, A., Sadurski, W., 2004. Trace Elements and Compounds in Soil, in: Merian, E., Anke, M., Ichnat, M., Stoeppler, M. (Eds.), *Elements and Their Compounds in the Environment*. Wiley-VCH Verlag GmbH, pp. 79–99.
- Kerin, E.J., Gilmour, C.C., Roden, E., Suzuki, M.T., Coates, J.D., Mason, R.P., 2006. Mercury Methylation by Dissimilatory Iron-Reducing Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7919–7921. doi:10.1128/AEM.01602-06
- Kessler, R., 2013. Urban Gardening: Managing the Risks of Contaminated Soil. *Environ. Health Perspect.* 121, A326–A333. doi:10.1289/ehp.121-A326
- Khan, S., Rehman, S., Zeb Khan, A., Amjad Khan, M., Tahir Shah, M., 2010. Soil and vegetables enrichment with heavy metals from geological sources in Gilgit, northern Pakistan. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1820–1827. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.08.016
- Kim, C.S., Rytuba, J.J., Brown Jr., G.E., 2004. Geological and anthropogenic factors influencing mercury speciation in mine wastes: an EXAFS spectroscopy study. *Appl. Geochem.* 19, 379–393. doi:10.1016/S0883-2927(03)00147-1
- Kim, K.-H., Lindberg, S.E., Meyers, T.P., 1995. Micrometeorological measurements of mercury vapor fluxes over background forest soils in eastern Tennessee. *Atmos. Environ.* 29, 267–282. doi:10.1016/1352-2310(94)00198-T
- King, D., Citeau, L., Bispo, A., Bardy, M., 2008. *Gestion durable des sols*. Editions Quae.
- Laacouri, A., Nater, E.A., Kolka, R.K., 2013. Distribution and Uptake Dynamics of Mercury in Leaves of Common Deciduous Tree Species in Minnesota, U.S.A. *Environ. Sci. Technol.* 47, 10462–10470. doi:10.1021/es401357z
- Landis, M.S., Keeler, G.J., Al-Wali, K.I., Stevens, R.K., 2004. Divalent inorganic reactive gaseous mercury emissions from a mercury cell chlor-alkali plant and its impact on near-field atmospheric dry deposition. *Atmos. Environ.* 38, 613–622. doi:10.1016/j.atmosenv.2003.09.075
- LAZAR, T., 2003. Taiz, L. and Zeiger, E. *Plant physiology*. 3rd edn. *Ann. Bot.* 91, 750–751. doi:10.1093/aob/mcg079
- Lee, K.J., Lee, T.G., 2012. A review of international trends in mercury management and available options for permanent or long-term mercury storage. *J. Hazard. Mater.* 241–242, 1–13. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.09.025
- Lin, C.-J., Pehkonen, S.O., 1999. The chemistry of atmospheric mercury: a review. *Atmos. Environ.* 33, 2067–2079. doi:10.1016/S1352-2310(98)00387-2
- Lindberg, S.E., Hanson, P.J., Meyers, T.P., Kim, K.-H., 1998. Atmospheric Transport, Chemistry and Deposition of Mercury Air/surface exchange of mercury vapor over forests—the need for a reassessment of continental biogenic emissions. *Atmos. Environ.* 32, 895–908. doi:10.1016/S1352-2310(97)00173-8

- Logsdon, S., 2008. Encyclopedia of Soil Science. Soil Sci. Soc. Am. J. 72, 862–862. doi:10.2136/sssaj2008.0003br
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 2003. Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall/Pearson Education.
- Mason, R.P., Reinfelder, J.R., Morel, F.M.M., 1996. Uptake, Toxicity, and Trophic Transfer of Mercury in a Coastal Diatom [WWW Document]. URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es950373d>.
- Mason, R.P., Reinfelder, J.R., Morel, F.M.M., 1995b. Bioaccumulation of mercury and methylmercury. Water. Air. Soil Pollut. 80, 915–921. doi:10.1007/BF01189744
- Massaquoi, L.D., Ma, H., Liu, X.H., Han, P.Y., Zuo, S.-M., Hua, Z.-X., Liu, D.-W., 2015. Heavy metal accumulation in soils, plants, and hair samples: an assessment of heavy metal exposure risks from the consumption of vegetables grown on soils previously irrigated with wastewater. Environ. Sci. Pollut. Res. 22, 18456–18468. doi:10.1007/s11356-015-5131-1
- Maxson, P.A., 2005. Global Mercury Production, Use and Trade, in: Pirrone, N., Mahaffey, K.R. (Eds.), Dynamics of Mercury Pollution on Regional and Global Scales: Springer US, pp. 25–50. doi:10.1007/0-387-24494-8_2
- Meers, E., Vandecasteele, B., Ruttens, A., Vangronsveld, J., Tack, F.M.G., 2007. Potential of five willow species (*Salix* spp.) for phytoextraction of heavy metals. Environ. Exp. Bot. 60, 57–68. doi:10.1016/j.envexpbot.2006.06.008
- Mench, M., Baize, D., 2004. Contamination des sols et de nos aliments d'origine végétale par les éléments en traces. *Courr. Environ. INRA* 52, 31–56.
- Migeon, A., Blaudez, D., Wilkins, O., Montanini, B., Campbell, M.M., Richaud, P., Thomine, S., Chalot, M., 2010. Genome-wide analysis of plant metal transporters, with an emphasis on poplar. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 3763–3784. doi:10.1007/s00018-010-0445-0
- Migeon, A., Richaud, P., Guinet, F., Blaudez, D., Chalot, M., 2012. Hydroponic Screening of Poplar for Trace Element Tolerance and Accumulation. *Int. J. Phytoremediation* 14, 350–361. doi:10.1080/15226514.2011.620651
- Migeon, A., Richaud, P., Guinet, F., Chalot, M., Blaudez, D., 2009. Metal Accumulation by Woody Species on Contaminated Sites in the North of France. *Water. Air. Soil Pollut.* 204, 89. doi:10.1007/s11270-009-0029-5
- Millhollen, A. G., Gustin, M.S., Obrist, D., 2006a. Foliar Mercury Accumulation and Exchange for Three Tree Species. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6001–6006. doi:10.1021/es0609194
- Millhollen, A. G., Obrist, D., Gustin, M.S., 2006b. Mercury accumulation in grass and forb species as a function of atmospheric carbon dioxide concentrations and mercury exposures in air and soil. *Chemosphere* 65, 889–897. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.03.008
- Mishra, S.R., 2004. Translocation in Plants. Discovery Publishing House.
- Molina, J.A., Oyarzun, R., Esbrí, J.M., Higuera, P., 2006. Mercury accumulation in soils and plants in the Almadén mining district, Spain: one of the most contaminated sites on Earth. *Environ. Geochem. Health* 28, 487–498. doi:10.1007/s10653-006-9058-9
- Montanini, B., Blaudez, D., Jeandroz, S., Sanders, D., Chalot, M., 2007. Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics* 8, 107. doi:10.1186/1471-2164-8-107
- Morel, F.M.M., Hering, J.G., 1993. Principles and Applications of Aquatic Chemistry. John Wiley & Sons.
- Morel, F.M.M., Kraepiel, A.M.L., Amyot, M., 1998. The Chemical Cycle and Bioaccumulation of Mercury. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29, 543–566.
- Morot-Gaudry, J.-F., Moreau, F., Prat, R., Maurel, C., Sentenac, H., 2012. Biologie végétale : Nutrition et métabolisme - 2e édition. Dunod.
- Muhammad, S., Shah, M.T., Khan, S., 2011. Health risk assessment of heavy metals and their source apportionment in drinking water of Kohistan region, northern Pakistan. *Microchem. J.* 98, 334–343. doi:10.1016/j.microc.2011.03.003

- Mukherjee, A.B., Zevenhoven, R., Brodersen, J., Hylander, L.D., Bhattacharya, P., 2004. Mercury in waste in the European Union: sources, disposal methods and risks. *Resour. Conserv. Recycl.* 42, 155–182. doi:10.1016/j.resconrec.2004.02.009
- Mustafa, G., Komatsu, S., 2016. Toxicity of heavy metals and metal-containing nanoparticles on plants. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics, Plant Proteomics: a bridge between fundamental processes and crop production* 1864, 932–944. doi:10.1016/j.bbapap.2016.02.020
- Nabulo, G., Young, S.D., Black, C.R., 2010. Assessing risk to human health from tropical leafy vegetables grown on contaminated urban soils. *Sci. Total Environ.* 408, 5338–5351. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.06.034
- Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., Sreekanth, T.V.M., 2010a. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ. Chem. Lett.* 8, 199–216. doi:10.1007/s10311-010-0297-8
- Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., Sreekanth, T.V.M., 2010b. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ. Chem. Lett.* 8, 199–216. doi:10.1007/s10311-010-0297-8
- Neculita, C.-M., Zagury, G.J., Deschênes, L., 2005. Mercury speciation in highly contaminated soils from chlor-alkali plants using chemical extractions. *J. Environ. Qual.* 34, 255–262.
- Nicholson, F.A., Smith, S.R., Alloway, B.J., Carlton-Smith, C., Chambers, B.J., 2003. An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales. *Sci. Total Environ.* 311, 205–219. doi:10.1016/S0048-9697(03)00139-6
- Nobel, P.S., 2005. *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*, Third Edition, 3 edition. ed. Academic Press, Amsterdam ; Boston.
- Pallardy, S.G., 2010. *Physiology of Woody Plants*. Academic Press.
- Patra, M., Sharma, A., 2000. Mercury toxicity in plants. *Bot. Rev.* 66, 379–422. doi:10.1007/BF02868923
- Peiter, E., Montanini, B., Gobert, A., Pedas, P., Husted, S., Maathuis, F.J.M., Blaudez, D., Chalot, M., Sanders, D., 2007. A secretory pathway-localized cation diffusion facilitator confers plant manganese tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 8532–8537. doi:10.1073/pnas.0609507104
- Pelfrêne, A., Waterlot, C., Douay, F., 2013. Influence of land use on human bioaccessibility of metals in smelter-impacted soils. *Environ. Pollut.* 178, 80–88. doi:10.1016/j.envpol.2013.03.008
- Pottier, M., García de la Torre, V.S., Victor, C., David, L.C., Chalot, M., Thomine, S., 2015. Genotypic variations in the dynamics of metal concentrations in poplar leaves: A field study with a perspective on phytoremediation. *Environ. Pollut.* 199, 73–82. doi:10.1016/j.envpol.2015.01.010
- Radwan, M.A., Salama, A.K., 2006. Market basket survey for some heavy metals in Egyptian fruits and vegetables. *Food Chem. Toxicol.* 44, 1273–1278. doi:10.1016/j.fct.2006.02.004
- Rea, A.W., Lindberg, S.E., Scherbatskoy, T., Keeler, G.J., 2002. Mercury Accumulation in Foliage over Time in Two Northern Mixed-Hardwood Forests. *Water. Air. Soil Pollut.* 133, 49–67. doi:10.1023/A:1012919731598
- Redjala, T., Zelko, I., Sterckeman, T., Legué, V., Lux, A., 2011. Relationship between root structure and root cadmium uptake in maize. *Environ. Exp. Bot.* 71, 241–248. doi:10.1016/j.envexpbot.2010.12.010
- Richau, K.H., Kozhevnikova, A.D., Seregin, I.V., Vooijs, R., Koevoets, P.L.M., Smith, J.A.C., Ivanov, V.B., Schat, H., 2009. Chelation by histidine inhibits the vacuolar sequestration of nickel in roots of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol.* 183, 106–116. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02826.x
- Robinson, B.H., Bañuelos, G., Conesa, H.M., Evangelou, M.W.H., Schulin, R., 2009. The Phytomanagement of Trace Elements in Soil. *Crit. Rev. Plant Sci.* 28, 240–266. doi:10.1080/07352680903035424

- Robles, I., Lakatos, J., Scharek, P., Planck, Z., Hernandez, G., Sols, S., Bustos, E., 2014. Characterization and Remediation of Soils and Sediments Polluted with Mercury: Occurrence, Transformations, Environmental Considerations and San Joaquin's Sierra Gorda Case, in: Hernandez Soriano, M.C. (Ed.), Environmental Risk Assessment of Soil Contamination. InTech.
- Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., Pazmiño, D.M., Testillano, P.S., Risueño, M.C., del Río, L.A., Sandalio, L.M., 2009. Cellular Response of Pea Plants to Cadmium Toxicity: Cross Talk between Reactive Oxygen Species, Nitric Oxide, and Calcium. *Plant Physiol.* 150, 229–243. doi:10.1104/pp.108.131524
- Roundhill, D.M., 2001. Phase Transfer Extraction of Mercury, in: Extraction of Metals from Soils and Waters, Modern Inorganic Chemistry. Springer US, pp. 105–128.
- Santos-Francés, F., García-Sánchez, A., Alonso-Rojo, P., Contreras, F., Adams, M., 2011. Distribution and mobility of mercury in soils of a gold mining region, Cuyuni river basin, Venezuela. *J. Environ. Manage.* 92, 1268–1276. doi:10.1016/j.jenvman.2010.12.003
- Schroeder, W.H., Munthe, J., 1998. Atmospheric mercury—An overview. *Atmos. Environ., Atmospheric Transport, Chemistry and Deposition of Mercury* 32, 809–822. doi:10.1016/S1352-2310(97)00293-8
- Selin, N.E., 2009. Global Biogeochemical Cycling of Mercury: A Review. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 34, 43–63. doi:10.1146/annurev.environ.051308.084314
- Shanker, A.K., 2008. Mode of Action and Toxicity of Trace Elements, in: Prasad, M.N.V. (Ed.), Trace Elements as Contaminants and Nutrients. John Wiley & Sons, Inc., pp. 523–553.
- Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S., 2005. Chromium toxicity in plants. *Environ. Int.* 31, 739–753. doi:10.1016/j.envint.2005.02.003
- Sheoran, V., Sheoran, A.S., Poonia, P., 2011. Role of Hyperaccumulators in Phytoextraction of Metals From Contaminated Mining Sites: A Review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 41, 168–214. doi:10.1080/10643380902718418
- Shinn, N.J., Bing-Canar, J., Cailas, M., Peneff, N., Binns, H.J., 2000. Determination of Spatial Continuity of Soil Lead Levels in an Urban Residential Neighborhood. *Environ. Res.* 82, 46–52. doi:10.1006/enrs.1999.4004
- Shriver, D.F., Atkins, M.P.W., 2001. Chimie inorganique. De Boeck Supérieur.
- Siciliano, S.D., O'Driscoll, N.J., Tordon, R., Hill, J., Beauchamp, S., Lean, D.R.S., 2005. Abiotic production of methylmercury by solar radiation. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1071–1077.
- Sims, R., Sorensen, D., Sims, J., McLean, J., Mahmood, R., Dupont, R., 1984. Review of In-Place Treatment Techniques for Contaminated Surface Soils - Volume 2: Background Information for In Situ Treatment. Y Rep.
- Singh, H.P., Mahajan, P., Kaur, S., Batish, D.R., Kohli, R.K., 2013. Chromium toxicity and tolerance in plants. *Environ. Chem. Lett.* 11, 229–254. doi:10.1007/s10311-013-0407-5
- Singh, O.V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R., Jain, R.K., 2003. Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 405–412. doi:10.1007/s00253-003-1244-4
- Sipter, E., Rózsa, E., Gruiz, K., Tátrai, E., Morvai, V., 2008. Site-specific risk assessment in contaminated vegetable gardens. *Chemosphere* 71, 1301–1307. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.11.039
- Slemr, F., Brunke, E.-G., Ebinghaus, R., Temme, C., Munthe, J., Wängberg, I., Schroeder, W., Steffen, A., Berg, T., 2003. Worldwide trend of atmospheric mercury since 1977. *Geophys. Res. Lett.* 30, 1516. doi:10.1029/2003GL016954
- Smith, O.B., 1999. Agriculture urbaine en Afrique de l'Ouest: une contribution à la sécurité alimentaire et à l'assainissement des villes. IDRC.
- Sogreah, 2007. Bilan des flux de contaminants entrant sur les sols agricoles de France métropolitaine. In. rapport final contrat Ademe n°0375C0004: Ademe. 281 [WWW

- Document]. ADEME. URL <http://www.ademe.fr/bilan-flux-contaminants-entrant-sols-agricoles-france-metropolitaine> (accessed 8.24.16).
- Southworth, G.R., Lindberg, S.E., Zhang, H., Anscombe, F.R., 2004. Fugitive mercury emissions from a chlor-alkali factory: sources and fluxes to the atmosphere. *Atmos. Environ.* 38, 597–611. doi:10.1016/j.atmosenv.2003.09.057
- Stamenkovic, J., Gustin, M.S., 2009. Nonstomatal versus Stomatal Uptake of Atmospheric Mercury. *Environ. Sci. Technol.* 43, 1367–1372. doi:10.1021/es801583a
- Stein, E.D., Cohen, Y., Winer, A.M., 1996. Environmental distribution and transformation of mercury compounds. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 26, 1–43. doi:10.1080/10643389609388485
- Stumm, W., Morgan, J.J., 1996. *Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters.* Wiley.
- Tomás, J., Árvay, J., Tóth, T., 2012. Heavy metals in productive parts of agricultural plants. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 1, 819.
- Tremel-Schaub, A., Feix, I., 2005. Contamination des sols Transferts des sols vers les plantes SOLS ET TRANSFERTS. Anne Tremel-Schaub et Isabelle Feix [WWW Document]. URL <http://docplayer.fr/16257043-Contamination-des-sols-transferts-des-sols-vers-les-plantes-sols-et-transferts-anne-tremel-schaub-et-isabelle-feix.html> (accessed 6.22.16).
- UNEP, 2013. report, Mercury: Time to act. ISBN No: 978-92-807-3310-5 [WWW Document]. URL http://www.unep.org/publications/contents/pub_details_search.asp?ID=6281 (accessed 8.24.16).
- Válega, M., Lima, A.I.G., Figueira, E.M.A.P., Pereira, E., Pardal, M.A., Duarte, A.C., 2009. Mercury intracellular partitioning and chelation in a salt marsh plant, *Halimione portulacoides* (L.) Aellen: Strategies underlying tolerance in environmental exposure. *Chemosphere* 74, 530–536. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.09.076
- Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H., 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytol.* 181, 759–776. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02748.x
- Wang, C., Ji, J., Yang, Z., Chen, L., Browne, P., Yu, R., 2012. Effects of Soil Properties on the Transfer of Cadmium from Soil to Wheat in the Yangtze River Delta Region, China—a Typical Industry–Agriculture Transition Area. *Biol. Trace Elem. Res.* 148, 264–274. doi:10.1007/s12011-012-9367-z
- Wang, J., Chen, C., 2006. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotechnol. Adv.* 24, 427–451. doi:10.1016/j.biotechadv.2006.03.001
- Wang, J., Feng, X., Anderson, C.W.N., Qiu, G., Ping, L., Bao, Z., 2011. Ammonium thiosulphate enhanced phytoextraction from mercury contaminated soil – Results from a greenhouse study. *J. Hazard. Mater.* 186, 119–127. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.10.097
- Wang, Z.-W., Nan, Z.-R., Wang, S.-L., Zhao, Z.-J., 2011. Accumulation and distribution of cadmium and lead in wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in contaminated soils from the oasis, north-west China. *J. Sci. Food Agric.* 91, 377–384. doi:10.1002/jsfa.4196
- Warming, M., Hansen, M.G., Holm, P.E., Magid, J., Hansen, T.H., Trapp, S., 2015. Does intake of trace elements through urban gardening in Copenhagen pose a risk to human health? *Environ. Pollut.* 202, 17–23. doi:10.1016/j.envpol.2015.03.011
- Weber, J.H., 1993. Review of possible paths for abiotic methylation of mercury(II) in the aquatic environment. *Chemosphere* 26, 2063–2077. doi:10.1016/0045-6535(93)90032-Z
- Weryszko-Chmielewska, E., Michałojć, Z., 2012. Anatomical traits of sweet pepper (*Capsicum annum* L.) fruit. *Acta Agrobot.* 64, 181–188. doi:10.5586/aa.2011.059
- Wu, Y., Wang, S., Streets, D.G., Hao, J., Chan, M., Jiang, J., 2006. Trends in anthropogenic mercury emissions in China from 1995 to 2003. *Environ. Sci. Technol.* 40, 5312–5318.
- Xu, D., Zhou, P., Zhan, J., Gao, Y., Dou, C., Sun, Q., 2013. Assessment of trace metal bioavailability in garden soils and health risks via consumption of vegetables in the vicinity

- of Tongling mining area, China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 90, 103–111. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.12.018
- Xu, J., Bravo, A.G., Lagerkvist, A., Bertilsson, S., Sjöblom, R., Kumpiene, J., 2015. Sources and remediation techniques for mercury contaminated soil. *Environ. Int.* 74, 42–53. doi:10.1016/j.envint.2014.09.007
- Xu, L., Lu, A., Wang, J., Ma, Z., Pan, L., Feng, X., Luan, Y., 2015. Accumulation status, sources and phytoavailability of metals in greenhouse vegetable production systems in Beijing, China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 122, 214–220. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.07.025
- 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 Afr. J. Bot.* 76, 167–179. doi:10.1016/j.sajb.2009.10.007
- Zayed, A., Lytle, C.M., Qian, J.-H., Terry, N., 1998. Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops. *Planta* 206, 293–299. doi:10.1007/s004250050403
- Zheng, W., Liang, L., Gu, B., 2012. Mercury Reduction and Oxidation by Reduced Natural Organic Matter in Anoxic Environments. *Environ. Sci. Technol.* 46, 292–299. doi:10.1021/es203402p