

Université de Montréal

Département des sciences biologiques | Institut de recherche en biologie végétale

Faculté des arts et des sciences

**Étude transcriptomique et physiologique des effets de l'arsenic sur plusieurs  
espèces végétales utilisées en phytoremédiation**

Par Aymeric Yanitch, B. Sc.

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de

*Philosophiae Doctor* (Ph. D.)

Avril 2019

© Aymeric Yanitch, 2019

Université de Montréal  
Département des sciences biologiques | Institut de recherche en biologie végétale  
Faculté des arts et des sciences

---

*Ce mémoire intitulé*

**Étude transcriptomique et physiologique des effets de l'arsenic sur plusieurs  
espèces végétales utilisées en phytoremédiation**

*Présenté par*

Aymeric Yanitch, B. Sc.

*A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes*

**Pierre-Luc Chagnon**

Président-rapporteur

**Michel Labrecque**

Directeur de recherche

**Simon Joly**

Codirecteur

**Marc St-Arnaud**

Membre du jury

**Armand Séguin**

Examineur externe

## Résumé

L'arsenic est un élément toxique à faible dose. La présence de ce métalloïde sur un grand nombre de sites résulte souvent de l'activité anthropique. Lorsque les concentrations dépassent les niveaux seuils prescrits par le gouvernement, il est nécessaire de procéder à la décontamination d'un terrain avant de l'utiliser. Plusieurs techniques de remédiation sont alors envisageables. Les techniques traditionnelles, impliquant généralement l'excavation et le traitement de la terre polluée à l'aide de procédures chimiques ou physiques, ont l'avantage de la rapidité, mais elles comportent un coût élevé ainsi que des impacts délétères sur les écosystèmes d'un site. Au contraire, le recours aux habilités naturelles de certaines plantes à accumuler des polluants est une approche moins dispendieuse, durable et consciencieuse de l'environnement. Toutefois, cette alternative nécessite encore des travaux d'optimisation pour rivaliser avec l'efficacité des méthodes dites traditionnelles. L'objectif de cette thèse est d'apporter des outils pour mieux comprendre comment certaines espèces végétales réagissent à la présence d'arsenic dans leur substrat aux niveaux physiologique et moléculaire. Dans cette optique, les travaux de recherche réalisés se sont basés sur une approche pluridisciplinaire incluant une investigation de terrain et des analyses de laboratoire en milieu contrôlé, qui ont permis de générer une liste des gènes dont l'expression est modifiée par la présence du polluant métallique qu'est l'arsenic.

Une première expérience a été conduite sur une ancienne cour d'entreposage de poteaux traités à l'ACC et au PCP, de manière à comparer les réponses physiologiques de plusieurs plantes candidates (*Salix purpurea*, *Medicago sativa*, *Festuca arundinacea* et *Brassica juncea*). Les

analyses réalisées sur la terre du site ont révélé la présence d'une contamination multiple aux polluants organiques et métalliques, dont l'arsenic. En parallèle, l'effet d'un apport en fertilisant complet à forte teneur en azote a été testé. Bien que les espèces sélectionnées se soient toutes développées dans les deux conditions étudiées, les résultats montrent un faible impact de l'azote sur leur établissement. Alors que l'arsenic n'a pas été détecté dans les parties aériennes des plantes testées, les analyses de substrats réalisées après quatre ans d'établissement végétal ont révélé une diminution des concentrations de cet élément. Ces résultats suggèrent plutôt une accumulation au niveau racinaire. Un point de précaution sanitaire soulevé par cette étude est la présence de dioxines et de furanes dans les tissus aériens des plantes provenant du site.

Une seconde expérience, réalisée en milieu hydroponique contrôlé, visait à explorer la réponse moléculaire de *Salix purpurea* confronté à différents niveaux d'arsenic. Les comparaisons des transcriptomes de plantes provenant de substrat sain avec ceux de plantes exposées à  $5\text{mg.kg}^{-1}$  d'arsenic ont généré une liste des gènes exprimés spécifiquement en réponse à l'arsenic. En plus d'offrir une meilleure compréhension des voies de transport de l'arsenic au sein de la plante, ces résultats suggèrent l'induction d'une production de tannins qui permettrait de diminuer la toxicité du métalloïde toxique.

Cette thèse de doctorat a apporté de nouvelles données qui permettent de mieux appréhender la sélection d'espèces végétales dans un contexte de réhabilitation de sites contaminés à l'arsenic.

**Mots-clés :** phytoremédiation, arsenic, transcriptomique, saule, fétuque, luzerne, moutarde, dioxine, furanes

## Abstract

The arsenic is a well-described element with high toxicity at low concentration. Its omnipresence around the world is mostly resulting from human activity. When the concentration reaches the toxicity thresholds imposed by the government, it's imperative to decontaminate the soil before considering using the contaminated area. At this moment, several remediation options can be used. The traditional technics generally involving ground excavation and soil chemical or physical treatment have the advantage of time efficiency at the expense of their cost and their noxious impact on the site ecosystems. A durable, environmentally friendly option is using some plants natural abilities to tolerate and accumulate pollutants from ground. While being a low-cost alternative, this approach requires nonetheless optimization to be able to challenge traditional technics efficiency. The objective of this thesis is to give a better understanding of how some plant species react to arsenic in their growth substrate, at the physiological and molecular levels. In this context, the work done was based on a multi-disciplinary approach merging field observations and controlled analysis in laboratory to generate a list of genes that are differentially expressed in presence of arsenic.

In order to compare the physiological responses of several plant candidates (*Salix purpurea*, *Medicago sativa*, *Festuca arundinacea* and *Brassica juncea*), a study was performed on a former CCA and PCP treated wood storage site. Soil analyses before plants establishment revealed a poly contamination of organic pollutants and metals including arsenic. In parallel, the effect of nitrogen fertilization on plant establishment was monitored. While all the selected species were able to establish on the contaminated site, physiological results suggested a low benefice of

nitrogen fertilization. Despite arsenic was not detected in the aerial parts of the plants, its quantitative analysis in ground at the end of the four-year study revealed a decreased concentration. This suggests a potential roots accumulation. An interesting, yet worrying, result is the presence of dioxin and furans in the tested specimens. This suggests that plants grown on dioxin and furans polluted sites could potentially contain those highly toxic pollutants and need to be treated accordingly.

Another experience performed in hydroponic and controlled conditions aimed to explore the molecular response from *Salix purpurea* exposed to different levels of arsenic. Transcriptomes from plants cultivated in a  $5\text{mg.kg}^{-1}$  arsenic substrate were compared to transcriptomes from non-exposed plants in order to get a list of differentially expressed genes that are specifically linked to arsenic response. In addition to give a better understanding of the arsenic path in plants tissues, those results strongly suggest a tannin involvement as an arsenic toxicity management. This PhD thesis has generated innovative tools and data that will be useful to assist plant selection in arsenic contaminated site restoration context.

**Keywords :** phytoremediation, arsenic, transcriptome, willow, tall fescue, alfalfa, mustard, trace elements, dioxins, furans

# TABLE DES MATIÈRES

<b>Chapitre 1 : Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
1.1. L'arsenic: un élément trace toxique omniprésent .....	1
1.1.1. Un peu d'histoire .....	1
1.1.2. Utilisations contemporaines de l'arsenic .....	2
1.1.3. L'élément chimique.....	2
1.1.4. L'arsenic et les éléments traces métalliques (ETM).....	3
1.1.5. Sources et voies de libération de l'arsenic dans l'environnement.....	4
1.1.6. Chimie et toxicité.....	7
1.1.7. Risques sanitaires.....	7
1.1.8. Sites connus présentant une forte contamination.....	10
1.2. Techniques de remédiation envisageables pour l'arsenic.....	12
1.2.1. Méthodes dites traditionnelles .....	12
1.2.2. Bioremédiation.....	14
1.2.3. Mécanismes de tolérance mis en place .....	21
1.3. Description du projet.....	25
1.3.1. État des connaissances actuelles .....	25
1.4. Objectifs de la thèse .....	27
1.4.1. Objectifs généraux .....	27
1.4.2. Objectifs spécifiques.....	28

<b>Chapitre 2 : Étude sur site contaminé</b> .....	29
2.1. Abstract.....	31
2.2. Introduction.....	32
2.3. Material and methods.....	35
2.3.1. Experimental site .....	35
2.3.2. Plant species selection.....	38
2.3.3. Fertilization treatment.....	38
2.3.4. Experimental design.....	38
2.4. Physiological measurements.....	40
2.5. Contaminants in plants.....	41
2.6. Contaminants in soil .....	41
2.7. Statistical analyses .....	42
2.8. Results.....	42
2.8.1. Physiological measurements.....	42
2.8.2. Accumulation of contaminants in aboveground plant biomass .....	45
2.8.3. Evolution of soil contamination between 2010 and 2015.....	49
2.9. Discussion.....	51
2.9.1. Plant responses to nitrogen fertilizer.....	51
2.9.2. Accumulation of contaminants in plant aboveground biomass .....	52
2.9.3. Phytoremediation potential .....	54
2.10. Acknowledgments.....	56
2.11. Synthèse du chapitre 2 .....	56



<b>Chapitre 3 : Étude transcriptomique</b> .....	58
3.1. Abstract.....	60
3.2. Introduction.....	61
3.3. Materials and methods .....	64
3.3.1. Hydroponic experiment .....	64
3.3.2. Transcriptomic analyses.....	65
3.4. Results.....	66
3.4.1. Arsenic uptake and physiological response to treatment.....	66
3.4.2. Arsenic Treatment Transcriptome.....	69
3.4.3. Differential expression in roots.....	69
3.5. Discussion.....	85
3.5.1. Response to arsenic and arsenic accumulation .....	85
3.5.2. Differential gene expression in roots .....	86
3.5.3. Differential gene expression in stems.....	90
3.5.4. Differential gene expression in leaves .....	92
3.5.5. Differential gene expression of foreign organisms associated with <i>Salix</i> tissue .....	95
3.6. Conclusion .....	96
3.7. Acknowledgements.....	96
3.8. Synthèse du chapitre 3 .....	97
<b>Chapitre 4 : Discussion générale</b> .....	98
4.1. Rappel de la problématique .....	98
4.2. Rappel des objectifs .....	99

4.3.	Retour sur les hypothèses et faits saillants.....	100
4.3.1.	Expérience sur site multicontaminé .....	100
4.3.2.	Expérience en milieu contrôlé .....	102
4.4.	Synthèse et comparaison des résultats .....	106
4.5.	Limites et questionnements soulevés.....	107
4.6.	Perspectives.....	108
	Références bibliographiques .....	110

## Liste des figures

Figure 1.1. Principes de phytoremédiation .....	16
Figure 1.2. Principes de métabolisation de l'arsenic .....	23
Figure 1.3. Principes de complexation et compartimentation vacuolaire .....	25
Figure 2.1. Total aerial biomass per species and treatment .....	43
Figure 2.2. Mean chlorophyll content in each species ( $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) for the months of June, July and August during the 2015 growing season .....	44
Figure 2.3. Mean stomatal conductance ( $\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) for the months of June, July and August during the 2015 growing season .....	45
Figure 2.4. Accumulation ( $\text{mg}/\text{kg}$ ) of copper, nickel, and zinc in <i>Festuca</i> , <i>Medicago</i> and <i>Salix</i> aerial parts at the end of the experiment (2015) .....	46
Figure 3.1. Physiological measurements of the plants during arsenic exposure.....	67
Figure 3.2. Gene ontology terms. Results from the statistical overrepresentation analysis showing significantly more and less represented Panther terms from organs of arsenic treated plants .....	69
Figure 3.3. Proposed phenylpropanoid/flavonoid pathway expression alterations in <i>Salix purpurea</i> leaves exposed to arsenic .....	81
Figure 4.1. Carte du trajet proposé de l'arsenic dans les tissus de <i>Salix purpurea</i> basé sur les résultats de l'analyse transcriptomique .....	103

## Liste des tableaux

Tableau 1.1. Critères et niveaux de toxicité des sols définis par le MELCC en mg.kg <sup>-1</sup> .....	11
Table 2.1. Site contamination as measured in 2010 on site prior to experiment .....	36-37
Table 2.2. Temperature and precipitation during the experiment compared to mean seasonal values observed since 1980.....	39
Table 2.3. Dioxin and furan content in <i>Festuca</i> , <i>Medicago</i> and <i>Salix</i> aerial parts (2015) .....	47
Table 2.4. Soil contamination evolution between 2010 and 2015 .....	48-49
Table 2.5. Trace element accumulation in aboveground plant tissues at the end of the 2015 growing season .....	50
Table 2.6. Organic contamination changes in soil from 2010 to 2015 .....	51
Table 3.1. A selection of differentially expressed genes in roots .....	70-71
Table 3.2. A selection of differentially expressed genes in stems .....	74-75
Table 3.3. A selection of differentially expressed genes in leaves .....	78-79

## Liste des données supplémentaires

Supplementary File 1 : Differentially expressed sequences and annotations (tableaux disponibles sur <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01115>)

## Liste des abréviations

ACC : arséniate de cuivre chromaté

ADN : acide désoxyribo nucléique

ADP : adenosine di phosphate

ARN : acide ribo nucléique

AsIII : arsenite

AsV : arsenate

ATP : adenosine triphosphate

BPC : biphenyl polychloré

ERO : espèce radicalaire oxygénée

ETM : élément trace métallique

MELCC : ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques

PCP : pentachlorophénol

*Je dédie cette thèse à mes parents Lynne et Patrick  
ainsi qu'à ma grand-mère Christiane, qui avait  
cette passion magnifique pour les plantes.*

## Remerciements

En posant les derniers mots de cette thèse, un mélange confus de sentiments s'empare de moi. En premier lieu, celui de l'accomplissement agrémenté d'une bonne dose de soulagement. En effet, mener à son terme un projet aussi fastidieux, au travers des différentes épreuves que la vie appose sur notre chemin, est un travail qui demande une détermination et une rigueur souvent difficile à maintenir sans le support des proches. Aussi, c'est avec une grande gratitude et une certaine fierté que je remets aujourd'hui le produit de ces dernières années de pérégrination.

Tout ceci aurait difficilement été réalisable sans le soutien moral de ma mère et de ma sœur qui, malgré la distance, ont toujours su être là quand il le fallait. Je voudrais aussi adresser un remerciement tout particulier à mon ami David Dorez et mon entraîneur Paul Nguyen Comp, qui m'ont aidé à garder le cap dans les moments plus sombres. Ce projet, à la façon d'une course d'endurance, s'est montré plus difficile à mesure que j'approchais de la ligne d'arrivée. À ce titre, j'aimerais souligner l'implication très particulière de Joëlle Gaudreau, ma partenaire de vie. Sa détermination et son dynamisme naturel ont été un exemple qui m'a apporté la motivation nécessaire pour venir à bout du sprint final.

J'éprouve aussi une profonde gratitude envers mes directeurs de recherche Michel Labrecque et Simon Joly, qui ont su m'accorder leur confiance du début jusqu'à la fin de ce long parcours. Je tiens à souligner la bienveillance de Michel, qui m'a offert son soutien, ses conseils et certainement les meilleures conditions de travail envisageables. Quant à Simon, mon codirecteur, sa disponibilité sans faille et ses commentaires constructifs m'ont fourni une émulation scientifique qui m'a aidé à développer mon esprit critique, si important en recherche.

Merci aussi à Frédéric Pitre, qui s'est greffé à ce projet dès le début de mon parcours. La générosité de son encadrement et son expertise ont été des atouts indispensables à mon cheminement.

Certains collègues et co-auteurs ont apporté une contribution remarquable et importante à la structuration de ma réflexion scientifique. À ce titre, j'aimerais souligner l'implication et le soutien de Nicholas Brereton, Emmanuel Gonzalez et Cédric Frenette Dussault.

J'aimerais adresser un remerciement particulier à Jocelyne Ayotte. Sa patience, sa sympathie et ses connaissances en techniques de laboratoire ont été des supports précieux durant mes analyses réalisées au sein du Centre de Biodiversité.

Je remercie également Pierre-Luc Chagnon, Marc St-Arnaud et Armand Séguin pour leur contribution au jury de cette thèse.

Plusieurs partenaires subventionnaires ont rendu possible ce parcours aux cycles supérieurs: Hydro-Québec, pour ma bourse de recherche; le Centre de la science de la biodiversité du Québec (CSBQ) et l'Institut de recherche en biologie végétale (IRBV), pour leurs bourses d'aide aux communications scientifiques, qui m'ont permis de diffuser mes résultats lors de congrès scientifiques internationaux; les Amis du Jardin botanique de Montréal et la Société québécoise de phytotechnologie, qui m'ont attribué plusieurs bourses d'excellence. J'aimerais aussi remercier mon ami Thomas More, qui s'est ajouté à la liste de mes soutiens financiers, sans qui ce projet n'aurait pu aboutir.



Ces dernières années ont été l'occasion de belles rencontres et je m'estime chanceux d'avoir pu côtoyer les étudiants de l'IRBV et du centre de Biodiversité, qui ont su rendre ce parcours plus agréable et pétillant: Guillaume, Dominic, Rima, Julie, Alessandro, Yves, Maxime, Ahmed, Vanessa, Aurélien, Stéphanie, Alice et tant d'autres. L'ambiance des laboratoires du Jardin est un atout de grande valeur qui se doit d'être entretenu pour et par les générations futures d'étudiants.

# **Chapitre 1 : Introduction générale**

Cette thèse de doctorat vise à étudier les capacités de résistance et d'accumulation de différentes espèces végétales exposées à l'arsenic. Ce chapitre d'introduction présente la problématique propre à la contamination par l'arsenic, ses sources diverses, les risques qui y sont liés ainsi que plusieurs solutions envisageables pour lutter contre ses effets nocifs.

## **1.1. L'arsenic: un élément trace toxique omniprésent**

### **1.1.1. Un peu d'histoire**

Le mot «arsenic» provient du latin *arsenicum*, tiré du grec *arsenikon* (« qui dompte le mâle ») en raison de sa forte toxicité (Frankenberger, 2002). Cet élément métallique fut utilisé durant l'Antiquité dans plusieurs domaines tels que la métallurgie, pour durcir le métal, ou en art, pour pigmenter les peintures. L'arsenic a aussi été utilisé de façon plus étonnante dans le domaine médical. En effet, il fut d'abord préconisé par Hippocrate (370 av. J.-C.), qui avait recours à l'orpiment (trisulfure d'arsenic  $As_2S_3$ ) et au réalgar (quadrisulfure d'arsenic  $As_4S_4$ ) pour guérir des ulcères cutanés, puis dans la médecine traditionnelle chinoise, qui prônait l'utilisation « d'un poison pour lutter contre un poison » (200 av. J.-C.) (Liu et al., 2008; Lucas et Harris, 2012). À son tour, Paracelse, médecin et chimiste de l'université de Padoue (Italie) au XVI<sup>e</sup> siècle, prescrivait des préparations à base d'arsenic pour prévenir la syphilis (Liu et al., 2008; Risse, 1994).

Isolé pour la première fois en 1250 par Albertus Magnus, cet élément métallique a joué un rôle dans de nombreuses controverses historiques (Mandal et Suzuki, 2002). C'est au VIII<sup>e</sup> siècle qu'un alchimiste arabe nommé Jabir Ibn Hayyan produisit un composé toxique à base d'arsenic, le trioxyde d'arsenic, aussi appelé arsenic blanc. Cette poudre au goût et à l'odeur indécélables, soluble dans l'eau et virtuellement indétectable, deviendra un poison de choix, si bien qu'on le désignera comme le « poison des rois et roi des poisons » (Frith, 2013). La mort de plusieurs personnalités peut être imputée à un empoisonnement, accidentel ou non, par l'arsenic, notamment François I<sup>er</sup> de Médicis ou encore Napoléon Bonaparte (Mari et al., 2006; Weider et Fournier, 1999).

### **1.1.2. Utilisations contemporaines de l'arsenic**

L'arsenic est utilisé dans le domaine agricole comme herbicide et insecticide (arséniat de cuivre chromaté, notamment comme traitement de préservation du bois banni par le Canada et les États-Unis depuis 2003 (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2012)), dans les feux d'artifice, la conception de munitions pour l'armée, mais surtout, dans le domaine de l'électronique. En effet, l'arsenic à très haute pureté (99,999%) entre dans la composition de semiconducteurs, a été utilisé pour la recherche spatiale (optiques) et plus largement en télécommunication (Anderson et al., 2014; Brooks, 2014; Haynes, 2014). L'arsenic pur à 99% est vendu 2 \$CAD le gramme, alors que sa version purifiée (99,9995%) se détaille à 70 \$CAD le gramme (Anderson et al., 2014).

### **1.1.3. L'élément chimique**

Cet élément de symbole As est le 33<sup>e</sup> de la classification périodique. L'arsenic appartient au 15<sup>e</sup> groupe du tableau périodique (anciennement appelé groupe Vb dans le système nord-américain).

Ce groupe, parfois nommé des pnictogènes, contient aussi l'azote (N), le phosphore (P), l'antimoine (Sb), le bismuth (Bi) et le moscovium (Mc) (Cangelosi et al., 2010; Scilabra et al., 2017). L'arsenic a un poids atomique de 74.92160 grammes/mole et peut être rencontré sous plusieurs états d'oxydation -3, 0, +3, ou +5 aussi écrits -III, 0, +III, ou +V (Anderson et al., 2014). Les formes cationiques arsenite (AsIII) et arsenate (AsV), qui sont thermodynamiquement plus stables, sont généralement les plus retrouvées dans les sols (Meharg et Hartley-Whitaker, 2002). Parmi les composés naturellement présents dans les sols, on peut rencontrer des formes organo-arseniées telles que l'arsénopyrite (FeAsS), le réalgar (AsS), l'orpiment (As<sub>2</sub>S<sub>3</sub>), la nickéline (NiAs) et la cobaltite (CoAsS) (Boyle et Jonasson 1973). Plusieurs formes gazeuses naturelles existent également: le trioxyde d'arsenic volatil (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), l'arsine (AsH<sub>3</sub>) et l'arsine méthylée. En solution, l'arsenic existe sous sa forme inorganique (AsIII et AsV) ou dans une des formes méthylées de l'AsV (Cullen et Reimer, 1989).

#### **1.1.4. L'arsenic et les éléments traces métalliques (ETM)**

Les éléments chimiques dont la présence naturelle est inférieure à 1000 mg.kg<sup>-1</sup> sont considérés comme des éléments traces (Kabata-Pendias et Pendias, 1992). L'arsenic (As) est un élément trace métallique (ETM). L'arsenic se trouve naturellement dans le sol, l'air, l'eau ainsi que dans la matière vivante. Bien qu'il compte parmi les 20 éléments les plus importants de l'écorce terrestre, il n'y est présent qu'à l'état de trace (0,00005% des constituants de la croûte terrestre) (Mandal et Suzuki, 2002). En opposition, les éléments majeurs (O, K, Na, Si, Al, Fe, Ca, etc.) représentent plus de 99% de la composition de la croûte terrestre (Rudnick et Gao 2003).

Plusieurs éléments traces sont considérés comme essentiels à la vie (oligo-éléments) à faible dose alors qu'ils peuvent devenir toxiques à plus forte concentration (Basta et al., 2005).

L'arsenic est un des 15 éléments traces considérés comme potentiellement essentiels au métabolisme des mammifères (Bienert et al., 2008; Uthus, 1992). Bien que son rôle ne soit pas clairement identifié, des carences en arsenic pourraient être la cause de dysfonctionnement du métabolisme de la méthionine, plus particulièrement dans la production de la S-adénylméthionine (SAM) impliquée dans les réactions de transméthylation (Uthus, 2003). L'apport minimal nécessaire pour l'humain serait de 12 µg par jour et serait entièrement couvert par notre alimentation régulière (12-40 µg), provenant majoritairement du poisson ou des céréales (Uthus, 1992).

### **1.1.5. Sources et voies de libération de l'arsenic dans l'environnement**

#### **1.1.5.1. Sources d'origine naturelle**

Naturellement présent dans le sol, le relargage naturel d'arsenic dans l'environnement aquatique ou terrestre serait imputable à plusieurs vecteurs. Les plus importants sont la météorisation (altérations atmosphériques résultant de l'effet de l'eau, du gel, du vent ou des racines de plantes sur les roches) et l'érosion (usure progressive des débris de roches qui sont déplacés par les éléments) ainsi que le lessivage des sols. La libération d'arsenic atmosphérique est, quant à elle, majoritairement liée aux activités volcaniques (2800 à 8000 t.an<sup>-1</sup>) et en moindre importance aux émissions de méthylarsines volatiles provenant du sol (Boyle et Jonasson, 1973; Chilvers et Peterson, 1987; Mandal et Suzuki, 2002).

Si l'arsenic peut être naturellement libéré dans l'environnement par l'érosion des roches ou l'activité volcanique, dans certaines zones du globe, la source majoritaire de diffusion ponctuelle est d'origine anthropique.

## **1.1.5.2. Sources d'origines anthropiques**

### **1.1.5.2.1. Activité minière**

L'extraction de minerais tels que l'or (Au), le plomb (Pb) ou l'argent (Ag) génère des déchets comprenant souvent des molécules formées d'arsenic (Mandal et Suzuki, 2002; Walker et al., 2009). En effet, l'arsénopyrite (FeAsS), le principal minerai porteur d'arsenic, est retrouvé dans des gisements très variés, car il est lié aux métaux fréquemment exploités. Par ailleurs, l'arsenic étant un élément chalcophile, il est souvent retrouvé complexé à des minerais soufrés qui remontent à la surface lors des procédures d'extraction minière. Lors de l'extraction minière, l'arsenic, au départ en équilibre chimique dans le sous-sol, est déplacé vers la surface. En présence de l'oxygène et de l'eau, des réactions d'oxydation engendrent l'acidification du milieu et une augmentation de la mobilité de l'élément, qui peut alors entrer dans la chaîne alimentaire (Eisler, 2004; Mudroch et Clair, 1986; Walker et al., 2009).

Dans certaines régions du monde, l'activité minière engendre ainsi une surconcentration de l'arsenic dans les sols et les eaux souterraines. En effet, alors que la concentration moyenne de l'arsenic est évaluée à  $6000 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (Mandal et Suzuki, 2002), d'importantes variations peuvent être constatées selon la nature des sols et l'ampleur de l'activité humaine, des taux de  $100 \text{mg.kg}^{-1}$  pouvant être atteints dans certains sites d'extraction de minerais (Geiszinger et al., 2002; Mandal et Suzuki, 2002).

### **1.1.5.2.2. Activité agricole**

L'arsenic entre dans la composition de plusieurs produits phytosanitaires qui ont été utilisés pendant une grande partie du XX<sup>e</sup> siècle. Les formes organoarseniées ont une grande biodisponibilité pour certaines espèces, c'est pourquoi elles sont ou ont été produites

industriellement pour être utilisées comme pesticides, à la fois pour des usages insecticides, herbicides ou fongicides.

#### **1.1.5.2.3. Traitement de préservation des bois à l'arséniate de cuivre chromaté**

L'arséniate de cuivre chromaté (ACC) est un traitement de préservation des bois exposés aux intempéries, aux insectes et aux champignons. Ce mélange composé d'arsenic pentavalent  $As_2O_5$  (insecticide), de cuivre bivalent  $CuO$  (fongicide) et de chrome hexavalent  $CrO_3$  (fixe l'As et le Cu au bois) a été mondialement utilisé jusqu'au début de la seconde moitié du XX<sup>e</sup> siècle. Le bois traité à l'ACC fut très largement commercialisé pour la conception de poteaux électriques, de mobilier de jardin et même de modules de jeux pour enfants dans les parcs (Chang et al., 2013; Kim et al., 2007).

Ce type de traitement était cependant sujet à un lessivage, qui entraîna le relargage des différents éléments le composant dans l'environnement. Ces éléments s'adsorbant dans les minéraux du sol, la pollution est rémanente et nécessite la mise en place d'une procédure de traitement visant à la diminuer.

#### **1.1.5.3. Autres sources anthropiques**

Une des sources d'importants relargages d'arsenic dans l'atmosphère provient de la combustion d'énergies fossiles et des centrales électriques au charbon (Bencko et Symon, 1977; Bhattacharya et al., 2002; Guo et al., 2004; Popovic et al., 2001). Par ailleurs, d'autres dérivés moins connus de l'arsenic présentent de très nombreuses applications. Par exemple: l'anhydride arsénieux ( $As_2O_3$ ) sert à blanchir le verre, traiter le bois ou conserver les aliments; le trisulfure d'arsenic ( $As_2S_3$ ), ou orpiment, est employé comme pigment jaune dans les peintures; le disulfure d'arsenic ( $As_4S_4$ ), ou réalgar, est utilisé comme pigment rouge orange; l'arséniate de

plomb ( $Pb_3(AsO_4)_2$ ) entre dans la composition de pesticides; et l'arséniure de gallium (GaAs) est un semiconducteur. D'autres composés arséniés ont aussi été largement utilisés pour la synthèse de produits pharmaceutiques, vétérinaires ou métallurgiques.

#### **1.1.6. Chimie et toxicité**

L'arsenic inorganique existe naturellement sous plusieurs états d'oxydation. Les deux formes majoritairement retrouvées dans les sols sont l'arsénite ( $As_2O_3$  ou AsIII) et l'arséniate ( $As_2O_5$  ou AsV). L'AsIII présente une toxicité 60 fois supérieure à celle de l'AsV (Meharg et Hartley-Whitaker, 2002; Ratnaïke, 2003). D'autres formes organiques existent: l'acide monométhylarsenic (MMA), l'acide diméthylarsenic (DMA), le triméthylarsine (TMA), l'arsénocholone (AsC), l'arsénobetaine (AsB), certains sucres arséniés, etc. Par ailleurs, il a été démontré que la méthylation (MMA, DMA et TMA) diminue grandement la toxicité de l'élément, qui devient presque nulle (Bienert et al., 2008). Voici les différentes formes retrouvées par ordre de niveau toxicité décroissante :

As<sub>3</sub>H<sub>3</sub> gaz >> AsIII > As V > DMA et MMA > formes organiques

#### **1.1.7. Risques sanitaires**

Une fois relargué dans l'environnement, l'arsenic peut se diffuser, du fait de sa solubilité, dans les sols, les eaux souterraines et entrer dans la chaîne alimentaire à travers la consommation d'eau ou d'aliments contaminés (Meharg et Hartley-Whitaker, 2002).

L'arsenic, bien qu'étant un oligoélément essentiel pour certains organismes (mammifères notamment), est toxique sous différentes formes (Dushenko et al. 1995; Uthus 1992, 2003). Il est maintenant reconnu que cet élément trace, même à faible concentration, représente des



risques considérables, aussi bien pour la santé humaine que pour l'environnement (Gunduz et al., 2010). Le seuil d'exposition à l'arsenic et ses dérivés ne devrait pas excéder 0,01 mg.m<sup>-3</sup> pendant plus de huit heures (Anderson et al., 2014). C'est un élément cancérigène de première classe qui peut inactiver jusqu'à 200 enzymes parmi celles qui sont les plus impliquées dans la production énergétique de la cellule (pyruvate oxidase, S-aminoacid oxidase, choline oxidase, transaminase, etc.) ainsi que la réparation de l'ADN (Mandal et Suzuki, 2002; Ratnaïke, 2003). L'arsenic est un analogue chimique du phosphore (P). Ces deux éléments possèdent le même rayon atomique ainsi qu'une électronégativité proche (Haynes, 2014). Le phosphore, majoritairement présent sous forme de phosphate (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), est une molécule très similaire à l'arséniate (AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup>). Considérant le rôle primordial du phosphate dans la machinerie cellulaire des êtres vivants, les fortes ressemblances physicochimiques entre le phosphate et l'arséniate confèrent à ce dernier un pouvoir toxique considérable. En effet, des phénomènes de substitutions peuvent avoir lieu au sein de plusieurs voies métaboliques majeures (Wolfe-Simon et al., 2011), notamment au sein de la chaîne respiratoire. Dans ce dernier cas, l'arséniate, remplaçant le phosphate, jouera un rôle de découpleur des réactions de phosphorylation oxydative aboutissant à l'interruption du flux de production de l'ATP (Bissen et Frimmel, 2003). Il engendre aussi la production d'espèces radicalaires oxygénées (ERO) responsables de la peroxydation lipidique (vieillesse prématuré des membranes cellulaires) et de l'altération du matériel génétique (ADN/ARN) pouvant aboutir au développement de mutations chez les végétaux et de cancers chez les humains (Gupta et al., 2013; Jomova et al., 2011; Kessel et al., 2002; Neubauer, 1947). De plus, des effets tératogènes ont été démontrés lors d'essais sur des animaux (Adeyemi et al., 2015; Bishop, 1972). L'AsIII vient, quant à lui, se lier aux fonctions

thiols ou sulfhydryles (SH) des protéines et enzymes, venant ainsi modifier leur conformation et les inactiver (Menzel et al., 1999; Shen et al., 2013).

Par ailleurs, des travaux s'intéressant aux dommages engendrés par les éléments traces métalliques ont mis en évidence des altérations importantes des voies de signalisation intracellulaires ainsi qu'une interaction avec l'ADN méthyltransférase aboutissant à l'activation ou l'inactivation (*silencing*) de gènes, à travers la modification du profil épigénétique (Cui et al., 2006; Salnikow et Zhitkovich, 2008; Vaissière et al., 2008).

#### **1.1.7.1. Effets délétères de l'arsenic sur les végétaux**

À cause de sa ressemblance avec la molécule de phosphate, l'arséniate peut entrer dans les cellules racinaires par les transporteurs de phosphate (Esteban et al., 2003; Zhao et al., 2009). Une fois dans le cytoplasme, toujours du fait de leur analogie, l'arséniate va remplacer le phosphate durant la production d'ATP formant une molécule instable: l'ADP-As. Cela aura pour conséquence d'abolir la production d'énergie dans la cellule (Meharg, 1994). Comme dans les cellules animales, l'AsIII provenant de la réduction de l'AsV par l'arséniate réductase peut interagir avec les groupements thiols de plusieurs enzymes du cycle de production énergétique (pyruvate déshydrogénase et 2-oxoglutarate déshydrogénase). Des travaux sur la toxicité de l'arsenic chez des espèces sensibles ont décrit des symptômes tels que la diminution de l'efficacité photosynthétique (Stoeva et al., 2003), l'inhibition de croissance (Barrachina et al., 1995) et la mort cellulaire.

#### **1.1.7.2. Espèces radicalaires oxygénées**

La présence d'arsenic inorganique dans les tissus végétaux entraîne la production d'espèces radicalaires oxygénées (ERO) (peroxyde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, radical hydroxyle OH • et radical superoxyde

O<sup>2-</sup>) (Mascher et al., 2002; Shri et al., 2009). En état d'homéostasie, ces molécules particulièrement réactives produites par les mitochondries, les peroxysomes ou les chloroplastes, préservent les cellules de l'oxydation. En condition de stress, la concentration en ERO est fortement augmentée et les radicaux produits en surnombre vont dégrader des cibles cellulaires entraînant des altérations irréversibles. Le système rendu hors de contrôle, des réactions d'oxydation vont dégrader les protéines, créer des mutations au niveau du matériel génétique (Hei et Filipic, 2004) et engendrer la peroxydation des membranes lipidiques aboutissant le plus souvent à la mort cellulaire (Gunes et al., 2009; Köller et al., 2000).

#### **1.1.8. Sites connus présentant une forte contamination**

À travers le monde, des centaines de millions de personnes sont exposées à des concentrations d'arsenic jugées dangereuses pour la santé: 0.5 mg.L<sup>-1</sup> à plusieurs mg.L<sup>-1</sup>, alors que la valeur moyenne observée dans la plupart des pays se trouve aux alentours de 10µg.L<sup>-1</sup> d'eau (Mandal et Suzuki, 2002). C'est en Asie que la contamination des eaux, qu'elle soit d'origine géologique, agricole ou issue des résidus de l'activité minière, est la plus alarmante. En effet, la pollution touche le Bangladesh (Duxbury et al., 2003; Rahman et al., 2001), la quasi-totalité du territoire du Bengale, l'Inde, la Chine et le Vietnam, entre autres (Berg et al., 2001; Nickson et al., 2000; Rodríguez-Lado et al., 2013). Par ailleurs, la présence de quantités importantes d'arsenic a été relevée en Amérique du sud (Chili, Argentine et Brésil notamment) (De Figueiredo et al., 2007; Ferreccio et al., 2000; Hopenhayn-Rich et al., 1998), au Mexique (Armienta et Segovia, 2008; Cebrian et al., 1983), en Turquie (Gunduz et al., 2009, 2010), en Espagne (Simón et al., 2001) et dans certains sites canadiens (Koch et al., 1999, 2000; Wang et Mulligan, 2006; Yan et al., 2000). Au Canada, le niveau relativement élevé d'arsenic présent à la surface de certaines régions est le résultat d'activités minières passées (mine Giant, ville de Yellowknife) et actuelles

(Clark et Raven, 2004; Hutchinson et al., 1982; Koch et al., 2000; Van Den Berghe et al., 2018). En effet, les procédés de grillage qui permettent d'extraire l'or de la roche, par la chauffe à haute température des minerais d'arsénopyrite, vont permettre d'isoler les minerais d'or en libérant de grandes quantités de trioxyde d'arsenic dans l'atmosphère. Environ 20 000 tonnes de ce composé toxique auraient été relarguées par ces procédés miniers depuis la mise en activité de la mine de Yellowknife en 1949 (Clark et Raven, 2004; Jamieson, 2014; Wrye, 2008).

Le ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques (MELCC) du Québec a défini des critères d'évaluation des sites en fonction des taux de contamination afin de réglementer leur utilisation. Les niveaux de contamination sont présentés dans le Tableau 1.1. :

Tableau 1.1. Critères et niveaux de toxicité des sols définis par le MELCC en  $\text{mg.kg}^{-1}$

	Critère A	Critère B	Critère C
Arsenic (As)	6	30	50

$\leq$  critère A : site utilisable sans restriction

$<$  critère B : réhabilitation du site nécessaire dans le cas d'utilisation résidentielle ou agricole

$\geq$  critère B et  $\leq$  critère C : site contaminé nécessitant un traitement sur place ou dans un lieu autorisé

$\geq$  critère C : site hautement contaminé inutilisable en l'état

Ainsi, l'arsenic, du fait de sa toxicité et du nombre de personnes exposées à ses effets, est un des contaminants environnementaux représentant le plus de risques sanitaires à travers le monde. Il est donc primordial de réduire sa présence dans les sols à une quantité proche de zéro.

Cependant, les moyens classiques de décontamination, qui impliquent généralement l'excavation totale de la terre ou l'utilisation d'agents chimiques, sont très onéreux et particulièrement délétères pour l'environnement et la biodiversité. Une alternative durable et moins dispendieuse pour réhabiliter les terres contaminées est le recours à la phytoremédiation.

## **1.2. Techniques de remédiation envisageables pour l'arsenic**

La décontamination de sites pollués peut être réalisée par des techniques chimiques, physiques ou en valorisant des procédés biologiques aussi appelés bioremédiation. On peut opposer les procédures *ex situ*, nécessitant le retrait des terres contaminées afin de procéder à leur traitement dans un lieu spécialisé, et les méthodes *in situ* qui peuvent être appliquées directement sur le site.

### **1.2.1. Méthodes dites traditionnelles**

#### **1.2.1.1. Méthodes physiques**

##### **1.2.1.1.1. Excavation**

Cette approche implique de creuser et d'enlever la terre d'une zone contaminée pour la déplacer vers un site de traitement approprié. C'est l'approche la plus souvent envisagée du fait de sa rapidité d'action. Cependant, elle nécessite un transport de la terre contaminée suivi, dans le cas de contamination aux polluants organiques, de plusieurs étapes d'incinération à haute température (dont une à 1300°C pour dégrader les BCPs, HAPs ainsi que les dioxines et furanes), qui engendrent des coûts particulièrement élevés. Au final, la structure du sol traité est détruite, le rendant inutilisable (Neilson et al., 2003; Papassiopi et al., 1999; Peters, 1999).

#### **1.2.1.1.2. Recouvrement**

La méthode du recouvrement consiste en l'établissement d'une couche de sol non contaminé assez épaisse, venant recouvrir la terre polluée du site, afin de minimiser l'impact des polluants sur la végétation (Neilson et al., 2003). Cette approche ne permet pas de procéder à l'extraction du polluant.

#### **1.2.1.1.3. Autres méthodes**

La vitrification consiste en la fusion des particules du sol par l'application de très hautes températures. Cela entraîne une dégradation ou une stabilisation physique des éléments polluants (Izumikawa, 1996; Kikuchi, 1998). Une autre technique dite électrocinétique permet, par l'application d'un courant électrique dans le sol contaminé, la migration des espèces ioniques du sol vers une électrode (Acar et al., 1995).

#### **1.2.1.2. Traitements chimiques du sol**

Pour les traitements chimiques, le sol contaminé peut être traité *in situ* ou déterré, déplacé, traité, puis remis en place. La terre contaminée est alors lessivée pour solubiliser les polluants. Cela nécessite l'utilisation de solutions acides (HCl ou HNO<sub>3</sub>), de chélateurs (EDTA, NTA ou DTPA) (Neilson et al., 2003) ou d'agents surfactants anioniques (molécules amphiphiles permettant de solubiliser deux phases non miscibles) (Laha et al., 2009; Mulligan et al., 1999; Pichtel et Pichtel, 1997). L'effluent toxique recueilli est alors concentré puis traité par incinération. Le traitement chimique est efficace pour la décontamination, mais il est très coûteux. De plus, l'utilisation d'agents chimiques puissants engendre la destruction de la biodiversité du sol et entraîne des altérations irréversibles de sa structure physicochimique,

causées par la dissolution des minéraux qui le composent (Allen et Bhaumik, 1998; Pichtel et Pichtel, 1997; Brian et al., 1996).

### **1.2.2. Bioremédiation**

Les coûts élevés des techniques dites traditionnelles ainsi que leur caractère néfaste pour la terre des sites à traiter ont poussé la recherche vers d'autres options telles que le recours à des organismes vivants afin de dégrader ou d'accumuler les polluants d'un site: il s'agit de la bioremédiation (*bio*, pour vivant, associé au suffixe latin *remedium*, signifiant restaurer) (Vidali, 2001). La bioremédiation fait référence à toute technique utilisant des micro-organismes pour réduire, dégrader, contenir, transformer ou extraire un élément contaminant (Dua et al., 2002). À l'heure actuelle, une vaste sélection d'espèces a montré un potentiel pour ce genre d'utilisation. En plus des plantes dont nous reparlerons plus loin, plusieurs espèces de bactéries, de levures ou de champignons ont fait l'objet de tests approfondis pour évaluer leur potentiel de survie et d'accumulation de polluants organiques ou inorganiques. Le recours à ces types de micro-organismes présente plusieurs intérêts. En effet, la bioremédiation est applicable *in situ* ou *ex situ* (biopile), a un faible coût et les ressources nécessaires (micro-organismes) sont généralement assez facilement accessibles (Vidali, 2001; Garbisu et Alkorta, 2003; Sharma et al., 2018).

#### **1.2.2.1. Phytoremédiation**

Durant les années 1970, le recours à l'établissement végétal pour stabiliser d'anciens sites miniers et réduire leur impact visuel a déclenché l'intérêt envers les phytotechnologies. Il a fallu attendre le début des années 1980 pour que le concept de phytoremédiation voie le jour

(Williamson et Johnson, 1981). Le terme phytoremédiation (*phyto* pour plantes) renvoie à plusieurs approches de dépollution basées sur l'utilisation d'espèces végétales.

#### **1.2.2.1.1. Principes mis à profit et leurs intérêts**

La phytoremédiation est une méthode de dépollution jugée de 60 à 80% moins coûteuse (Schnoor, 1997) que les méthodes traditionnelles, nécessitant des procédés physicochimiques généralement associés à de l'équipement spécialisé et à du personnel hautement qualifié (Tangahu et al., 2011). Cette alternative durable et écologique met à profit les capacités de certaines espèces végétales et de micro-organismes associés à l'extraction, à la dégradation ou à l'immobilisation de composés organiques ou inorganiques polluants. Le principe d'action repose sur le flux généré par la transpiration de la plante : les substances du sol attirées par ce flux à proximité des racines vont les pénétrer, puis être transloquées vers les tissus aériens de la plante (cf. Figure 1.1). Les substances sont alors stockées, métabolisées ou dégradées (Salt et al., 1995). Il est par la suite aisé et peu dispendieux de tailler les plantes, d'incinérer les tissus récoltés et de traiter les cendres contaminées, celles-ci représentant alors un volume infiniment plus réduit que celui du sol initialement contaminé. Cette approche présente un rapport investissement/surface traitée particulièrement intéressant pour les grandes surfaces (ou les gros volumes) faiblement à moyennement contaminées. Cependant, la phytoremédiation est limitée par les capacités naturelles des plantes utilisées. En effet, toutes les espèces végétales ne sont pas adaptées pour la décontamination de tout site pollué. Ainsi, il est important de choisir des candidats appropriés en fonction du site, des conditions de culture (température, hygrométrie, etc.), ainsi que des contaminants ciblés, qui doivent être accessibles par la rhizosphère des plantes sélectionnées et facilement accumulés dans leurs tissus.



### 1.2.2.1.2. Différents procédés utilisés en phytoremédiation

Les plantes peuvent être utilisées de plusieurs façons en vue de procéder à la réhabilitation de sites contaminés (cf. Figure 1.1).

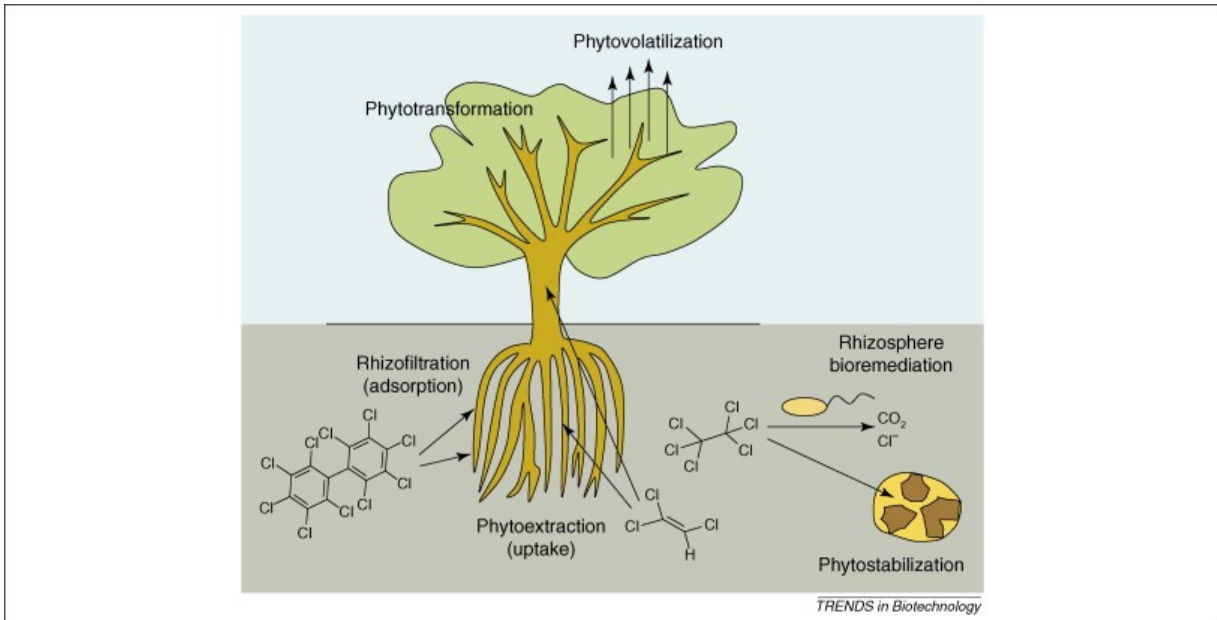


Figure 1.1. Principes de phytoremédiation (Van Aken, 2008)

Les différents principes de phytoremédiation sont :

- la phytodégradation : dans certaines situations, les plantes sont capables de dégrader le contaminant dans leurs tissus. Cette approche n'est efficace que sur les polluants organiques.
- la phytoextraction : transfert des éléments contaminants de la rhizosphère aux tissus végétaux, où ils peuvent être métabolisés et stockés. C'est ce qui permet d'extraire les éléments traces métalliques notamment.

- la phytovolatilisation : suite à la phytoextraction, la métabolisation du contaminant en une forme volatilisable, souvent moins toxique (voire non toxique), peut avoir lieu afin qu'il soit vaporisé dans l'atmosphère lors de la respiration de la plante.
- la phytostabilisation : la plante, à travers son flux transpiratoire, attire les polluants du sol à proximité de ses racines et ainsi diminue leur biodisponibilité et les risques de lessivage sur des sites proches.
- la rhizodégradation : l'action conjuguée des exsudats racinaires avec les micro-organismes du sol.
- la phytostimulation : la rhizosphère de certaines plantes peut créer un environnement favorable au développement de colonies microbiennes capables de dégrader les polluants du sol.

### **1.2.2.1.3. Plantes couramment utilisées en phytoremédiation**

#### **1.2.2.1.3.1. Plantes envisagées en général**

Les plantes généralement envisagées pour la phytoremédiation sont des espèces qui, en plus d'être capables de tolérer et d'accumuler les polluants dans leurs tissus, ont une biomasse élevée associée à un système racinaire développé. Cela leur permet d'être en contact avec un plus grand volume de sol contaminé et de pouvoir en extraire davantage de contaminants. Leurs capacités d'accumulation, généralement peu élevées, sont compensées par leur grande production de biomasse et leur cycle de vie court (Eapen et D'Souza, 2005; Van Aken, 2008, 2009).

#### **1.2.2.1.3.2. Hyperaccumulateurs**

Une plante sera dite hyperaccumulatrice lorsque son niveau d'accumulation d'un élément en particulier dépasse une certaine concentration (Baker et Brooks, 1989; Boominathan et Doran, 2003; Pickering et al., 2003; Poynton et al., 2004; B. H. Robinson et al., 1997; Sun et al., 2007; Venkatachalam et al., 2009; Wang et al., 2002; Baker et al., 1994). Soit : 1000 µg de As, Cu, Cr, Ni ou Se par gramme de tissu sec (0,1%); 100 µg de Cd par gramme de tissu sec (0,01%); 10 µg de Hg par gramme de tissu sec (0,001%).

La majorité des plantes hyperaccumulatrices présentent cependant un enracinement faible souvent jumelé à une croissance lente. Leur intérêt en phytoremédiation est alors à mettre en perspective par rapport à celui de plantes accumulatrices ayant une production de biomasse plus élevée.

#### **1.2.2.1.3.3. Espèces végétales testées en présence d'arsenic**

La problématique de la contamination des cultures alimentaires ou commerciales par l'arsenic a conduit au développement des connaissances sur les capacités d'accumulation de plusieurs espèces d'intérêt. Ainsi, la présence d'arsenic a été documentée dans plusieurs espèces végétales telles que le maïs (*Zea mays*) (Woolson, 1972), la carotte (*Daucus carota*) (Helgesen et Larsen, 1998) et le riz (*Oryza sativa*) (Abedin et al., 2002; Banerjee et al., 2013; Zhao et al., 2009).

De nombreuses études ont démontré que certaines espèces végétales comme la moutarde (*Brassica juncea*) (Gupta et al., 2009; Salido et al., 2003), quelques fougères (*Pterris vittata*, *Pterris cretica* et *Pityrogramma calomelano*) (Ma et al., 2001; Visoottiviseth et al., 2002; Zhao et al., 2002), la luzerne (*Medicago sativa*) (Karimi, 2013; López et al., 2005) et des graminées

(*Festuca arundinacea*) auraient des capacités d'accumulation de polluants inorganiques qui en font des candidates pertinentes pour la réhabilitation de zones contaminées à l'arsenic.

#### **1.2.2.1.3.4. Utilisation du saule en phytoremédiation**

Certaines espèces de saules arbustifs (*Salix purpurea* ou *Salix viminalis*, parmi d'autres espèces) ont fait l'objet de travaux approfondis visant à tester leurs aptitudes de développement et d'accumulation sur des sites contaminés aux polluants organiques et inorganiques (Cloutier-Hurteau et al., 2013; Purdy et Smart, 2008; Tlustoš et al., 2007a). La pertinence de ces espèces réside d'abord dans leur facilité à se développer sur des sites dégradés souvent pauvres en nutriments (Guidi et al., 2012). Les capacités d'accumulation inférieures à celles de plantes hyperaccumulatrices sont alors compensées par une production de biomasse élevée gardant ainsi un niveau d'extraction pertinent pour la phytoremédiation (Kidd et al., 2015). De plus, du fait de leur haut niveau de transpiration, les saules, en absorbant l'eau, stabilisent le substrat pollué en attirant les contaminants proches de leur rhizosphère. Par la même occasion, les nutriments consommés par les plantes pourront être renouvelés par de nouveau attirés par ce processus lié aux mouvements hydriques (Schnoor et al., 2000; Aronsson et Perttu, 2001; Perttu et Kowalik, 1997).

#### **1.2.2.2. Enjeux environnementaux et économiques associés à la bioremédiation**

Dans la plupart des cas, les techniques dites traditionnelles (physiques ou chimiques), bien que plus rapides, sont limitées à de petites surfaces à traiter à cause de leur coût important, notamment. Les travaux de plus en plus nombreux sur les techniques de bioremédiation ont permis d'acquérir une meilleure connaissance des mécanismes d'accumulation et de tolérance mis en place par certains organismes vivants. Cela a permis l'optimisation de ces techniques,

qui sont maintenant de plus en plus efficaces. De plus, la bioremédiation est l'alternative la moins destructrice pour l'environnement. En effet, contrairement aux procédés traditionnels, elle permet de préserver la structure du sol ainsi que sa fertilité, tout en maintenant les micro-organismes présents (Entry et al., 1996).

Un autre avantage non négligeable de la bioremédiation est son coût. Alors qu'il faut compter de 50\$ à 500\$ par tonne pour les moyens de décontamination classiques, l'utilisation des techniques de bioremédiation *in situ* (directement sur le site, sans excavation) revient quant à lui à environ 10\$ par tonne de sol (Salt et al., 1995; Wan et al., 2015). De plus, les produits secondaires peuvent parfois faire l'objet d'une valorisation, comme cela peut être le cas pour la phytoexploitation minière de l'or ou du titane (Brooks et al., 1998; Sheoran et al., 2009). Ainsi, les métaux extraits peuvent être vendus après l'incinération de la récolte alors que la biomasse générée par les plantes peut être utilisée pour produire de l'énergie (en centrales électriques adaptées).

### **1.2.2.3. Métabolisation de l'arsenic par les plantes**

#### **1.2.2.3.1. Voie d'entrée dans les tissus végétaux**

##### **1.2.2.3.1.1. De l'AsV**

L'entrée de l'arsenic dans les plantes se fait au niveau racinaire sous forme d'arséniate (AsV), molécule arsénée prédominante dans les sols en aérobie. Les transporteurs de phosphate des plantes vont alors permettre son passage dans le cytoplasme des cellules racinaires (Esteban et al., 2003; Tripathi et al., 2007). Des travaux sur des plantes génétiquement modifiées d'*Arabidopsis thaliana*, mutées sur les gènes AtPht1;1 et AtPht1;4 (transporteurs membranaires

de phosphate), ont montré l'importance de ces protéines dans l'entrée de l'arséniate provenant du milieu. En effet, la perte de ces protéines a engendré une diminution de la sensibilité à l'arsenic des plantes modifiées (Catarcha et al., 2007).

#### **1.2.2.3.1.2. De l'AsIII**

L'arsénite, molécule polaire ne pouvant pas diffuser librement au travers des membranes, nécessiterait un mécanisme de transport actif. À l'heure actuelle, aucune description d'un tel transporteur n'a été réalisée. Certains travaux suggèrent que l'AsIII, du fait d'une ressemblance avec le glycérol, bénéficierait d'un transport facilité par des aquaglycéroporines membranaires (Bhattacharjee et al., 2008; Isayenkov et Maathuis, 2008; Kamiya et al., 2009; Liu et al., 2002).

#### **1.2.2.3.1.3. Des formes organoarséniées**

Aucune fonction arséniate et arsénite méthylase n'ayant été découverte dans les tissus végétaux, les formes organiques de l'arsenic retrouvées à l'intérieur de la plante doivent provenir du milieu extérieur. Les formes méthylées de l'arsenic sont produites par les micro-organismes du sol ou peuvent provenir de résidus d'herbicides ou de produits défoliants anciennement utilisés en agriculture. Des travaux sur le riz ont mis en évidence une aquaporine appartenant à la famille des NIP (OsNIP2;1/Lsi1) impliquée dans le transport du silicium ( $\text{Si(OH)}_4$ ), qui serait à l'origine du passage des formes méthylées d'arsenic dans les tissus racinaires (Li et al., 2009).

### **1.2.3. Mécanismes de tolérance mis en place**

Les nouvelles technologies de laboratoire ont permis de faire évoluer les connaissances concernant les mécanismes mis en place par les plantes capables de tolérer, d'accumuler et de dégrader les contaminants. En ce qui a trait à l'arsenic, la conversion d'AsV en AsIII engendrerait

la production d'ERO générant la synthèse d'enzymes antioxydantes afin de contrôler l'action des ERO. Ainsi, l'augmentation d'enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion S-transférase (GST), ainsi que d'organites antioxydants non enzymatiques (glutathion, ascorbate, etc.) est constatée en présence d'arsenic inorganique (Hartley-Whitaker et al., 2001; Liu et al., 2009; Yadav, 2010).

De plus, des travaux ont montré que chez les espèces végétales ayant développé des mécanismes de détoxification (*Pteris vittata* (Lessl et al., 2013; Singh et al., 2010; Sundaram et al., 2008; Wang et al., 2002)), la métabolisation de l'arsenic est souvent réalisée en plusieurs étapes.

#### **1.2.3.1. Réduction de l'arsenate en arsenite**

Une fois dans la cellule, l'AsV peut être réduit en AsIII par l'enzyme arséniate réductase (AR) aidée par le glutathion (GSH) agissant en tant que cofacteur (Liu et al., 2009; Sundaram et al., 2008; Tripathi et al., 2007). Le GSH résulte de la transformation d'une cystéine en  $\gamma$ -glutamylcystéine, elle-même transformée en GSH par la glutathione synthase (cf. Figure 1.2).

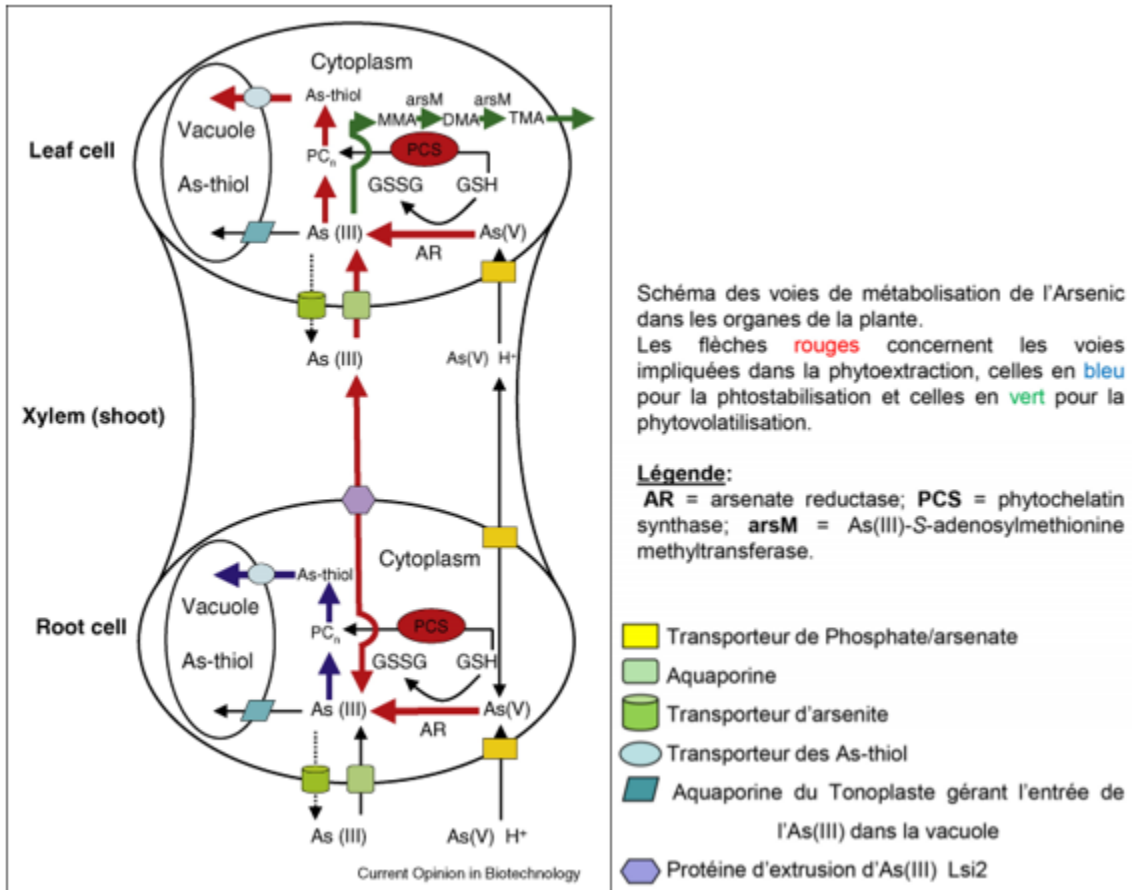


Figure 1.2. Principes de métabolisation de l'arsenic (Yong-Guan Zhu et Rosen, 2009)

Par ailleurs, les travaux de Guo et al. (2008) ont confirmé l'importance de ces voies de détoxification en surexprimant les gènes AtPCS1 et GSH1 (codant pour la  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -ECS) participant à la formation de la glutathione) chez *Arabidopsis thaliana*, engendrant une augmentation de la tolérance de la plante vis-à-vis de l'arsenic et de son accumulation dans les tissus.



### **1.2.3.2. Translocation de l'arsenite**

L'une des caractéristiques d'intérêt d'une plante hyperaccumulatrice d'arsenic réside dans sa capacité à transférer rapidement l'élément polluant des racines vers les tissus aériens (Duan et al., 2005; Xu et al., 2007). Ma et collaborateurs (2002, 2006, 2007a) ont démontré l'importance du transport xylémien dans la translocation de l'arsenic vers les parties aériennes de la plante. En effet, la délétion du gène codant la protéine Lsi2, impliquée dans le chargement de l'AsIII dans le xylème engendrerait une diminution de 50% des capacités d'accumulation de l'arsenic dans les organes supérieurs de la plante (Duan et al., 2016; Zhao et al., 2009b).

### **1.2.3.3. Mécanismes de chélation et de compartimentation**

L'intervention de chélateurs joue un rôle important dans la séquestration de l'arsenic. Il en existe deux types : les métallothionéines et les phytochélatines.

#### **1.2.3.3.1. Métallothionéines (MT)**

Des protéines telles que les métallothionéines (MT), riches en cations métalliques (Zn/Cu), présentant des résidus cystéine (acide aminé à fonction thiol), ont une affinité pour les molécules d'AsIII (Hassinen et al., 2011).

#### **1.2.3.3.2. Phytochélatines (PC)**

Les phytochélatines, peptides apparentés aux MT, sont particulièrement riches en cystéines. Leur production, stimulée par la présence d'ions métalloïdes, est réalisée par la phytochélatine synthase (PCS) à partir d'un tripeptide précurseur qu'est le glutathion (Glu-Cys-Gly) (Picault et al. 2006). Il a été mis en évidence que la fixation de l'AsIII par les PC réduit la toxicité au niveau

racinaire en augmentant la translocation vers la vacuole des cellules par des *multidrug resistance proteins* (MRP) (Briat, 2010; Lu et al., 1997; Zhu et Rosen, 2009) (cf. Figure 1.3).

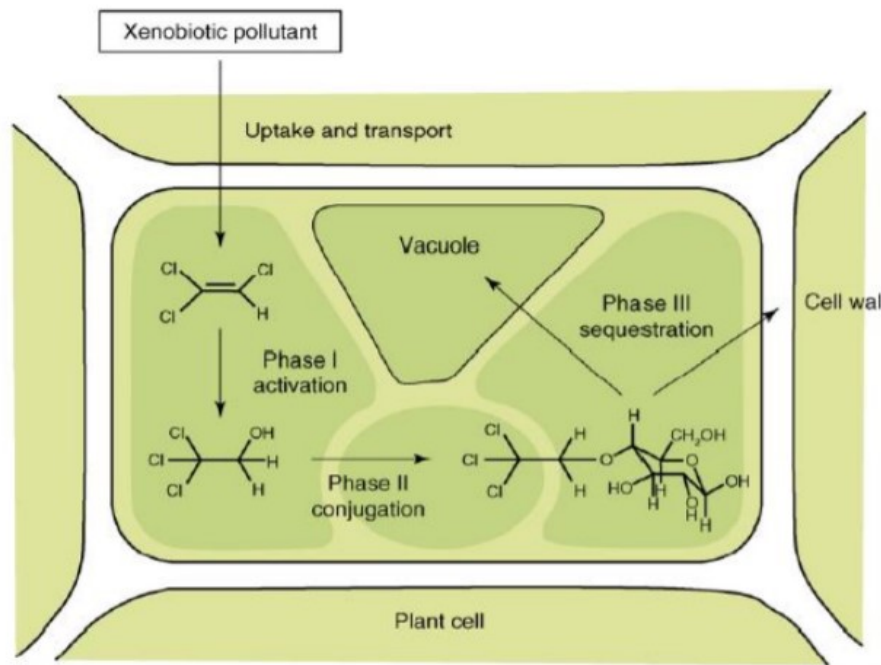


Figure 1.3. Principes de complexation et compartimentation vacuolaire (Van Aken, 2008)

### 1.3. Description du projet

#### 1.3.1. État des connaissances actuelles

La fougère chinoise *Pteris vittata* est la première espèce répertoriée comme étant hyperaccumulatrice d'arsenic (Ma et al., 2001). Bien qu'elle soit capable d'accumuler jusqu'à 22g d'arsenic par kg de matière sèche (Ma et al., 2001), elle produit peu de biomasse (environ 1 t.ha<sup>-1</sup>.an<sup>-1</sup>) (Shelmerdine et al., 2009; Kertulis-Tartar et al., 2006). Aussi, ce matériel végétal est difficilement accessible et est plus dispendieux que d'autres espèces plus communes (Natarajan et al., 2009). De plus, sa zone de rusticité (zone 9) empêche son utilisation en zones contaminées ayant des températures atteignant des valeurs inférieures à -6°C.

À l'opposé, *Salix purpurea* serait capable de s'établir sur une plus grande diversité de sites (zone de rusticité 2). Cette variété de saules peut aussi se développer sur des sols pauvres en nutriments, compacts, acides ou alcalins, et supporte la présence de plusieurs contaminants : le cuivre (Hakmaoui et al., 2014; Hakmaoui et al., 2006), le cadmium (Hakmaoui et al., 2014; Dos Santos Utmazian et al., 2007), le zinc (Dos Santos Utmazian et al., 2007), l'arsenic (Minocha et al., 2008; Purdy et Smart, 2008; Sylvain et al., 2016), le plomb et l'antimoine (Sylvain et al., 2016); ainsi que certains polluants organiques provenant de résidus d'hydrocarbures, notamment (Pagé et al., 2015).

De plus, certains cultivars de saules seraient capables d'accumuler jusqu'à 600 mg d'arsenic par kg de matière sèche (Chen et al., 2013). Ces concentrations de polluants extraits, bien que plus faibles que celles observées chez *P. vittata*, sont compensées par une production de biomasse plus élevée (entre 13 à 20 t.ha<sup>-1</sup>.an<sup>-1</sup> dans certain cas) (Szczukowski et al., 2005; Stolarski et al., 2011). Les travaux réalisés par Minocha et al. (2008) ont décrit *S. purpurea* comme une espèce présentant une certaine tolérance vis-à-vis de l'arsenate potentiellement imputable à la présence de phytochélatines dans ses tissus. Cependant, il conserve la majorité des polluants accumulés au niveau de ses racines et n'en exporte qu'une portion vers ses parties supérieures. Ces deux facteurs combinés (tolérance accrue et stockage dans les racines) feraient de *S. purpurea* un excellent candidat pour la phytosabilisation. Par contre, son utilité pourrait s'avérer moindre en phytoextraction, qui nécessite la récolte des tissus aériens.

D'un point de vue génétique, les mécanismes moléculaires documentés liés à la présence d'arsenic sont spécifiques à l'entrée (transporteur de phosphate ou aquaporine), au transport (aquaglyceroporines) ou à la détoxification ( $\gamma$ -glutamylcystéine synthetase ( $\gamma$ ECS),

phytochélatine synthase (PCS), etc.) de l'arsenic dans les tissus végétaux (Isayenkov et Maathuis, 2008; Wang et al., 2002; Meharg et Macnair, 1992; Sundaram et al., 2008; Briat, 2010). Cependant, au moment de la rédaction de cette thèse, aucune étude de l'ensemble des variations d'expressions génétiques liées à la présence de l'arsenic n'a encore été réalisée. Une image précise de l'ensemble des gènes impliqués dans l'extraction, le transport, l'accumulation, puis la détoxification permettrait d'optimiser la sélection de plantes candidates en se basant sur la présence ou l'absence de ces gènes d'intérêt dans leur bagage génétique (ADN). En parallèle, connaître les mécanismes mis en place par certaines plantes privilégiant la séquestration de l'arsenic dans leurs racines plutôt que dans leurs tissus aériens permettrait de choisir les espèces consommables pouvant être cultivées sur des sites contaminés à l'arsenic sans risque d'ingestion des parties aériennes contenant le métal toxique. La pertinence de ces résultats serait aussi transposable dans un contexte de manipulations génétiques dans le but de créer des plantes transformées sur ou sous exprimant certaines fonctions afin d'augmenter leurs capacités d'accumulation et de translocation native.

## **1.4. Objectifs de la thèse**

### **1.4.1. Objectifs généraux**

Cette thèse doctorale comporte deux objectifs distincts : 1) tester quatre espèces végétales sur un site pollué aux contaminants organiques et inorganiques, dont l'arsenic, afin de juger de la pertinence de leur utilisation en phytoremédiation; 2) comprendre les mécanismes moléculaires de tolérance à l'arsenic mis en place par une espèce choisie de saule, soit *Salix purpurea*, à l'aide d'une expérience réalisée en milieu contrôlé.

### 1.4.2. Objectifs spécifiques

Les objectifs spécifiques visés par le premier volet de cette thèse doctorale, dont le but est de tester quatre espèces végétales sur un site pollué afin de juger de la pertinence de leur utilisation en phytoremédiation, se déclinent comme suit : comparer les réponses physiologiques et les capacités d'accumulation des plantes sur un site contaminé aux polluants organiques et inorganiques; évaluer l'effet d'un fertilisant à base d'azote. Le chapitre 2 (premier chapitre de résultats) présente l'expérience conduite sur le site contaminé. Les hypothèses sont que les espèces candidates sélectionnées sont capables de s'établir sur le site contaminé et de réduire la pollution du site, et que l'ajout d'un fertilisant complet à forte teneur en azote aide l'établissement végétal.

L'objectif spécifique visé par le second volet de cette thèse doctorale, soit l'analyse transcriptomique de plants de saules exposés à différentes concentrations d'arsenic, est le suivant : décrire les variations engendrées au niveau de l'expression des transcrits spécifiquement accumulés en réponse à la contamination, afin d'identifier les voies métaboliques impliquées dans la phytoremédiation de l'arsenic par le saule *Salix purpurea*. Le chapitre 3 (second chapitre de résultats) décrit l'expérience menée en conditions contrôlées, dont l'hypothèse est que les saules étudiés sont capables de modifier leurs transcriptomes en réponse à la présence d'arsenic pour l'accumuler et tolérer sa toxicité dans leurs tissus.

## **Chapitre 2 : Étude sur site contaminé**

Dans le chapitre d'introduction, la pertinence de l'utilisation de certaines plantes d'intérêt dans le but de réhabiliter des sites contaminés à l'arsenic a été présentée. Ce chapitre-ci décrit une expérience conduite dans une cour d'entreposage de poteaux traités à l'ACC et au PCP, dans laquelle quatre plantes sélectionnées sur la base de leurs capacités propres ainsi que sur les résultats avancés par la littérature ont été confrontées à une contamination mixte de polluants organiques et inorganiques. Cette expérience investigate également l'effet du traitement à base d'azote sur les capacités d'établissement et d'accumulation des plantes.

*Objectifs* : Comparer les réponses physiologiques et les capacités d'accumulation de quatre espèces végétales d'intérêt sur un site contaminé aux polluants organiques et inorganiques, et évaluer l'effet d'un fertilisant à base d'azote.

*Hypothèses* : Les espèces candidates sélectionnées sont capables de s'établir sur le site contaminé et de réduire la pollution du site. L'ajout d'un fertilisant complet à forte teneur en azote aide l'établissement végétal.

**A four-year field phytoremediation trial to decontaminate soil polluted by wood preservatives: phytoextraction of arsenic, chromium, copper, dioxins and furans**

Aymeric Yanitch†, Hafssa Kadri<sup>2</sup>, Cédric Frenette-Dussault<sup>2</sup>, Simon Joly<sup>1,2</sup>, Frederic E. Pitre<sup>1,2</sup>,  
Michel Labrecque<sup>1,2</sup>

†Corresponding author

1. Institut de recherche en biologie végétale, University of Montréal, Montréal QC H1X 2B2, Canada
2. Montreal Botanical Garden, Montreal, QC H1X 2B2, Canada

Submitted in International journal of phytoremediation (mars 2019)

Authors' contributions

FP and ML designed the study. HK performed the plant growth trials and sample preparation. AY and SJ analyzed the dataset. AY drafted the first version of the manuscript and all authors critically reviewed it.

## **2.1. Abstract**

Widely used as wood preservatives for the last century, Pentachlorophenol (PCP) and chromated copper arsenate (CCA) have been shown to leach from treated surfaces and contaminate soil of wood storage sites. Because of the toxicity of PCP degradation products (namely dioxins and furans) and CCA (chrome, arsenic and copper), efficient protocols are required to remediate such sites. In a four-year field phytoremediation trial, we compared performance of willow, fescue, alfalfa and Indian mustard for removing CCA residues and organic compounds from soil. Although use of a complete fertilizer with high nitrogen content increased the chlorophyll content of plants, it did not result in a significantly greater plant biomass yield. Importantly, we found that plants grown in the presence of PCP / CCA residues were able to translocate and concentrate dioxins and furans (PCDD/F) in their aerial tissue. This has crucial implications for the phytoremediation of sites polluted by dioxins and furans, suggesting that biomass harvested from these sites should be treated as contaminated by these toxic chemicals.

**Keywords:** Phytoremediation, plant metal stress, dioxins, furans, CCA, PCP, wood treatment, PCDD, PCDF, trace elements.



## 2.2. Introduction

The use of wood preservatives has been an important cause of soil contamination since the middle of the 20<sup>th</sup> century (Grant and Dobbs, 1977). Although wood has numerous properties that make it useful as construction material (Desch and Dinwoodie, 1996), it requires proper treatment to prevent its degradation when used in all-weather conditions. Chromated copper arsenate (CCA) and pentachlorophenol (PCP) are commonly used as wood pole preservatives due to their antifungal, bactericidal and insecticidal properties (Chang et al., 2013; Chirenje et al., 2003; Saxe et al., 2007). Developed during the 1930s, CCA has been widely used to treat construction wood for public or private use (Kim et al., 2007; Grant and Dobbs, 1977). Together, arsenic (As) and copper (Cu) in CCA acts as insecticide and fungicide, respectively, whereas chromium (Cr) binds arsenic and copper onto cellulose, hemicellulose and lignin (Dawson et al., 1991). Consequently, CCA pressure-treated wood contains high concentrations of chromium (III), copper and arsenic (V) (Bull et al., 2004).

Creosote and PCP are also often used in combination with CCA as wood preservatives. Creosote is composed of 85% polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), 10% phenolic compounds and 5% heterocycles (Mueller et al., 1989). It is one of the major sources of PAH contamination, and has a high carcinogenic potency (Tsai et al., 2004; Collins et al., 1998). Moreover, polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans (PCDD/F), hereafter referred to as dioxins and furans, are unintentional by-products generated during the degradation and combustion of treated wood (Hatanaka et al., 2004) and are amongst the most toxic and carcinogenic chemicals known to science (Xu et al., 2016). While wood treated with these chemicals shows strong resistance to environmental conditions and has a long lifecycle, its exposure to rain results in the leaching of these trace elements into the environment and

polluting the surrounding soil (Saxe et al., 2007). In addition, other metal pollutants such as zinc or nickel are often remaining on such sites from previous industrial activities.

Classical soil remediation technologies involve physical removal of the contaminated soil from the site and a subsequent decontamination phase using physical, chemical or biological treatment technologies. This approach is time-effective but very expensive, and can be harmful to biodiversity due to its impacts on the indigenous soil microflora and its physicochemical properties (Marques et al., 2011; Mahar et al., 2016). Alternative site decontamination techniques generally involve pollutant transformation, immobilization or translocation by other organisms, such as microorganisms or plants. These in situ bioremediation technologies are cost-effective, durable and biodiversity friendly, but require longer treatment times (Farhadian et al., 2008; Gerhardt et al., 2009).

In situ bioremediation technologies rely on microorganisms (bacteria and fungi) to degrade organic contaminants and metabolize them into simple compounds such as carbon dioxide, methane, water or inorganic salts that are less harmful to the environment and can act as carbon sources for microorganisms (Farhadian et al., 2008; Galli et al., 2008; Atagana et al., 2006; Gerhardt et al., 2009). While microorganisms can be efficient for organic remediation, they may be less efficient at remediating metal contaminated sites. In contrast, phytoremediation is a sustainable technology that relies on the natural properties of plants and associated microorganisms to stabilize or extract inorganic compounds from soils (Pulford et Watson, 2003; Kawahigashi, 2009).

Phytoremediation of soil contaminated by wood preservative leachates is challenging. In addition to trace elements (As, Cu, Cr), the soil can be contaminated by organic pollutants

including highly toxic dioxins and furans (Lamparski, 1980; Fries et al., 2002; Tame et al., 2007). Few studies have investigated the bioremediation of complex and persistent pollutants such as dioxins and furans, either by using plant uptake properties or through degradation by soil microorganisms (Afzal et al., 2014; Galli et al., 2008; Atagana et al., 2006).

One reason for the lack of information on the bioremediation of dioxins and furans is the high cost of analyses (>\$1000 USD per sample). The potential presence of dioxins or furans in plant tissues could provide interesting opportunities for phytoremediation, but at the same time creates important health and biomass management issues in cases where dioxins and furans are not the principal target of phytoremediation but are present in the soil (Xu et al., 2016). Therefore, more information on the phytoremediation of sites contaminated by wood preservatives and their derivatives is essential to properly assess the potential of such technologies in this context.

Plant establishment in harsh conditions (compact soil, poor nutrition, metals contamination, etc.) could be improved by the addition of a complete fertilizer with high nitrogen content (Chang et al., 2013; Merkl, 2005). Indeed, while helping plant establishment, fertilization treatment increases biomass production and thus contaminants uptake. Besides, nitrogen fertilization is known to decrease pH via hydrogen ion (H<sup>+</sup>) release (Czarnecki et Düring, 2014). Soil acidification is linked to improved trace element mobility and thus increases metal uptake potential by plants (Yang et al., 2010; Shu et al., 2001; Courchesne et al., 2017; Courchesne et al., 2017; Pedron et al., 2009). As well, nitrogen fertilization has been shown to improve heavy metal accumulation in aboveground biomass (Rodríguez-Ortíz et al., 2006).

In this study, we conducted and monitored a phytoremediation trial on a wood pole storage site with relatively high levels of contamination by trace elements and PCP residues. Our main

objectives were to: (1) assess the potential of diverse plant species to tolerate and translocate CCA and PCP residues in their aerial tissues; (2) investigate the potential of plants to phytoextract dioxins and furans; and (3) assess the effect of complete fertilizer with high nitrogen content on performance of plants used to phytoremediate such a site.

## **2.3. Material and methods**

### **2.3.1. Experimental site**

The experiment took place on a storage site for wood poles treated with CCA/PCP located in Drummondville, Quebec, Canada (45°53'56.8"N 72°30'02.9"W). The site has been used for storage purposes since 1967. Soil contamination resulting from wood preservative leaching consisted of a mix of trace elements and PCP residues (Table 2.1). The experiment was set up in June 2012 and maintained until October 2015. Due to severe soil mineralization and compaction, mechanical scarification and amendment with a 6 cm layer of commercial topsoil were performed to help plant germination and establishment.

Table 2.1. Site contamination as measured in 2010 on site prior to experiment Three equidistant trenches (TE1\_A, TE1\_B, TE1\_C) were dug mechanically to a depth of 50cm to sample site soil. \*CDD = Chloro Dibenzo Dioxin. \*\* CDF = Chloro Dibenzo Furan. N/A = non-applicable

Parameters	Units	Value	SE
pH		8.2	0.5
As	mg/kg	< 6.5	1.4
Cd	mg/kg	< 0.5	< 0.5
Cr	mg/kg	74.5	31.8
Cu	mg/kg	56.3	40.4
Ni	mg/kg	26	20.4
Zn	mg/kg	45.3	26.1
Pb	mg/kg	< 18	35.4
HAP	mg/kg	<0.1	<0.1
C10-C50	mg/kg	<100	<100
Phenols (PCP)	mg/kg	2.0	2.2
2,3,7,8-Tetra CDD *	ng/kg	13.5	9.2
1,2,3,7,8-Penta CDD *	ng/kg	127.6	154.0
1,2,3,4,7,8-Hexa CDD *	ng/kg	349.5	450.4
1,2,3,6,7,8-Hexa CDD *	ng/kg	1037.0	1373.8
1,2,3,7,8,9-Hexa CDD *	ng/kg	826.0	1040.5
1,2,3,4,6,7,8-Hepta CDD *	ng/kg	29606.7	39006.5

Octachlorodibenzo-p-dioxin	ng/kg	185000.0	206215.9
Tétrachlorodibenzo-p-dioxins	ng/kg	46.5	33.2
Pentachlorodibenzo-p-dioxins	ng/kg	396.5	456.5
Hexachlorodibenzo-p-dioxins	ng/kg	5306.7	6796.0
Heptachlorodibenzo-p-dioxins	ng/kg	45733.3	57021.2
Chlorodibenzo-p-dioxins total	ng/kg	235633.3	267655.0
2,3,7,8-Tetra CDF **	ng/kg	453.5	635.8
1,2,3,7,8-Penta CDF **	ng/kg	20.0	26.9
2,3,4,7,8-Penta CDF **	ng/kg	28.5	23.3
1,2,3,4,7,8,-Hexa CDF **	ng/kg	328.5	448.0
1,2,3,6,7,8-Hexa CDF **	ng/kg	225.0	294.9
2,3,4,6,7,8-Hexa CDF **	ng/kg	210.7	288.1
1,2,3,7,8,9-Hexa CDF **	ng/kg	5.7	5.8
1,2,3,4,6,7,8-Hepta CDF **	ng/kg	2746.7	2390.1
1,2,3,4,7,8,9-Hepta CDF **	ng/kg	630.7	850.1
Octachlorodibenzofuran	ng/kg	64536.7	70407.5
Tétrachlorodibenzofurans	ng/kg	75.0	49.5
Pentachlorodibenzofurans	ng/kg	396.7	449.6
Hexachlorodibenzofurans	ng/kg	12933.3	17586.7
Heptachlorodibenzofurans	ng/kg	42956.7	58689.6
Chlorodibenzo furans total	ng/kg	79900.0	105581.4

### **2.3.2. Plant species selection**

Our experimental design tested the performance of four different plant species (*Salix purpurea* ‘Fish Creek’, *Festuca arudinacea*, *Medicago sativa* and *Brassica juncea*) as well as the effects of a fertilization treatment (N-P-K: 30-10-10) on plant establishment. While this treatment is also composed by phosphor and potassium but with an higher ratio of nitrogen, we’ll refer to it as nitrogen fertilizer during the following chapters. Candidate plant species were selected on the basis of their growth potential in Quebec’s climate and soils (Desjardins et al., 2015; Cloutier-Hurteau et al., 2013; Flocco et al., 2002; Chekol et Vough, 2001; Gupta et al., 2009; Zhao et al., 2013).

### **2.3.3. Fertilization treatment**

Nitrogen fertilization treatment was motivated by the assumption that it would help plant establishment on the nutrient-poor site while increasing metal mobility. Indeed, nitrogen addition to soil has been shown to decrease its pH via hydrogen ion ( $H^+$ ) release, through nitrification of ammonium ( $NH_4^+$ ) and subsequent leaching of nitric oxide ( $NO^-$ ) (Czarnecki et Düring, 2014). On the other hand, soil acidification has been linked to improved trace element mobility and should thus potentially facilitate phytoextraction (Yang et al., 2010; Shu et al., 2001).

### **2.3.4. Experimental design**

The experiment was set up in a split-plot design replicated four times (four blocks of  $80m^2$  each grouping ten  $8m^2$  plots for a total of 40 plots,  $320 m^2$ ). Fertilization (two-level factor: fertilized or not) was the whole plot factor and distributed randomly across blocks, and plant species (4 species + 1 control with no species) was the subplot factor randomly distributed within whole

plots. Herbaceous species were sown manually at a density of 50 kg/ha, while 20 cm willow cuttings were planted every 32 cm in rows separated by 1 m for a total of 30 cuttings per subplot. The site was irrigated using a porous hose connected to four 1000L water tanks supplying the four plots with a constant low flow of water. Temperature and precipitation levels were monitored to compare growth conditions to mean seasonal values observed since 1980 (Table 2.2.)

Table 2.2. Temperature and precipitation during the experiment compared to mean seasonal values observed since 1980

Mean Temperature (°C)	May	June	July	August	September	October
2012	15.5	19.6	22.1	21.9	16.1	10.5
2013	15.2	18.1	22.7	19.5	14.7	10.6
2014	14.0	19.3	21.2	20.4	15.9	11.1
2015	15.9	16.7	21.3	21.2	18.9	7.3
Seasonal norms 1981-2010	13.0	18.4	20.8	19.7	15.1	8.3
Total precipitation (mm)	May	June	July	August	September	October
2012	117.6	112.7	49.0	63.2	92.6	114.1
2013	161.2	143.2	64.5	95.1	90.6	82.4
2014	73.3	151.6	99.2	91.0	46.6	112.2
2015	79.3	119.7	93.1	115.7	57.1	80.4
Seasonal norms 1981-2010	92.5	106.7	107.1	105.9	94.1	101.1



## 2.4. Physiological measurements

Physiological parameters such as chlorophyll content and stomatal conductance were monitored over the four years of the study once a month between June and August, a period that corresponds to the peak of the growing season. Chlorophyll content was measured using an “atLEAF+” chlorophyll meter (FT Green LLC, Willington, USA), which provides an estimate of plant photosynthetic capacity and nutritional status of the plant. Chlorophyll concentration in leaves was obtained following the manufacturer protocol (<http://www.atleaf.com> , FT Green LLC, Wilmington, USA) by converting the atLEAF+ values to SPAD units and considering the relationship between chlorophyll content and SPAD units according to the calculations of Zhu et al. (2012).

Stomatal conductance (leaf porometer, Decagon Devices Inc., WA, USA) was recorded by measuring the actual vapour flux out of the leaf through the stomata to obtain an assessment of water stress. For each measurement, the mean of three leaf measurements from three different plants in each subplot was used for the analyses.

Plant biomass was measured differently for woody and non-woody species at the end of the 2015 field season. For herbaceous species, aerial biomass production was evaluated once per year by harvesting three randomly selected 0.16 m<sup>2</sup> quadrats in each subplot. *Brassica juncea* was harvested in August, whereas *Festuca arundinacea* and *Medicago sativa* were sampled in mid-October, due to their longer growing period. Biomass was dried to constant weight at 75°C to estimate dry biomass production. For willows, three plants per subplot were randomly harvested once, at the end of the experiment in October, and dried to constant weight at 75°C to

estimate dry biomass production. Sub samples were harvested in each sub plot and multiplied by the planting density (30 000 trees/ha) in order to estimate biomass production per sub plot.

## **2.5. Contaminants in plants**

As fertilizer with higher content of nitrogen are shown to increase trace elements mobility (Courchesne et al., 2017a; Courchesne et al., 2017b) and bioaccumulation through higher biomass production, only fertilized plants were considered for analysis of contaminants in plants because of the cost of analyses. For each subplot, four randomly selected samples were collected, mixed, and a composite was then stored in a sterile container. Because the site was very dusty, dust collected on leaf surfaces was analyzed to quantify this potential bias in the estimates of leaf contaminants. As a second control for airborne particles, dust deposited on several open containers (then pooled for quantification) in the field during the time of the experiment was also analyzed. Quantification of trace elements was processed by ICP-MS following digestion with nitric acid as previously described elsewhere (Rodushkin et al., 1999; Karlsson et al., 2015; Courchesne et al. 2017a; Courchesne et al., 2017b). Dioxins and furans were quantified using LC-MS/MS, all analyses performed by the certified laboratory Maxxam analytics (Montreal, Canada).

## **2.6. Contaminants in soil**

Soil contaminants were quantified before planting (year 2010) and again at the end of the experiment (2015). In 2010, three trenches 50 cm wide and 10 meters apart were excavated mechanically to a depth of 50 cm and composite samples (from three randomly chosen points) were collected at depths of 10 cm, 25 cm and 45 cm (three sampling points, one composite sample produced from three sub samples per point). A second sampling was performed after

five years of plant growth, in November 2015, to compare contamination levels and thus remediation rates for each pollutant. As for plant contamination, only the fertilized plots were analyzed for soil contaminants.

## **2.7. Statistical analyses**

The effect of fertilization, species and their interaction were tested by two-way analysis of variance using mixed effect models with random factor “block” and fixed factor “fertilization” and “species”. Analyses were performed with the lme4 package (Bates et al., 2014) of R statistical software (Gentleman, 1996). Post hoc tests to identify significant group differences were conducted from marginal means with the lmerTest R package (Kuznetsova et al., 2017). Biomass was log transformed and stomatal conductance was square root transformed to ensure normality of the residuals. For analysis of stomatal conductance and chlorophyll content, the month was included as a fixed effect in the models.

## **2.8. Results**

### **2.8.1. Physiological measurements**

At the end of the phytoremediation experiment, a species-specific effect was observed in terms of biomass ( $p < 0.0001$ ) ; there was also a significant interaction between the species and the fertilization treatment ( $p = 0.0001$ ; Figure 2.1). This interaction could be linked to *F. arundinacea*'s positive response to fertilization. In contrast, the fertilization was not significant ( $p = 0.1327$ ), although the mean effect was positive for all species (Figure 2.1).

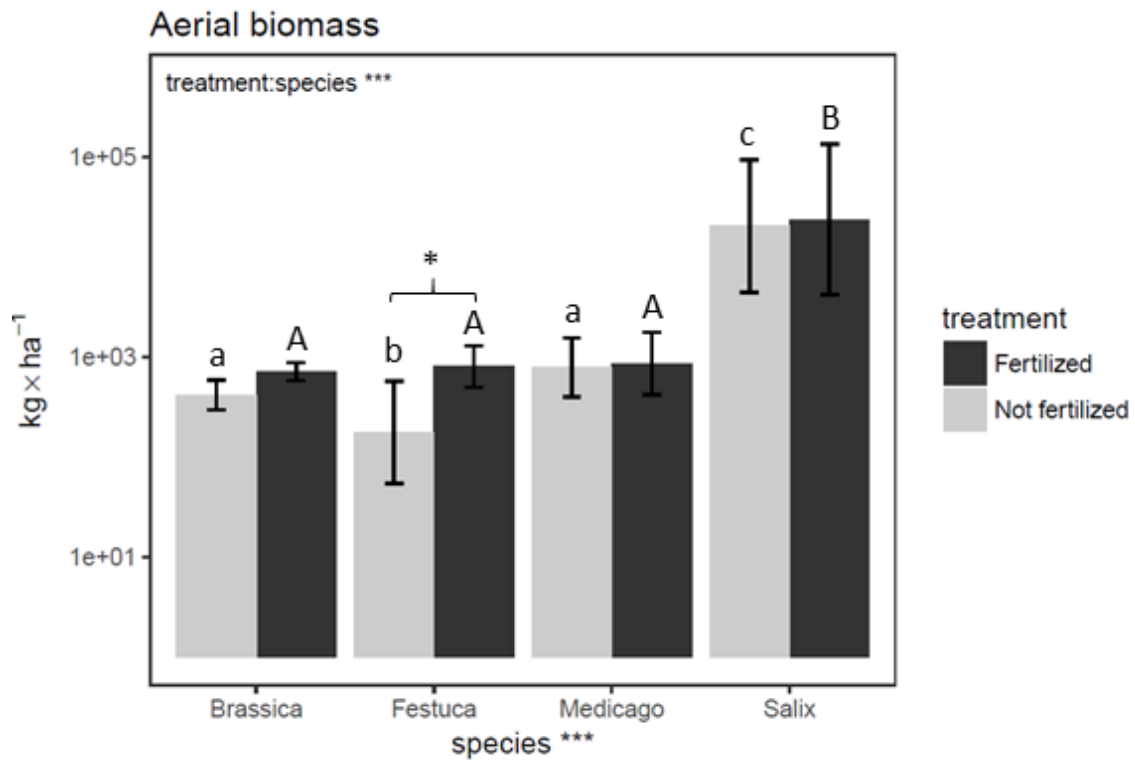


Figure 2.1. Total aerial biomass per species and treatment. Error bars represent standard deviation and significant fertilization effects per species are shown with asterisks: \*\*\* :  $p < 0.001$ , \* :  $p < 0.05$ . Letters above the bars indicate significant differences of post hoc species effects (Tukey  $<math>p < 0.05</math>) : lower case for non fertilized plants, higher case for fertilized plants.$

Analyses of chlorophyll content showed that species ( $p < 0.0001$ ), fertilization ( $p < 0.0001$ ) and the interaction between both factors ( $p < 0.0001$ ) were significant (Figure 2.2). Post hoc tests indicated that the fertilization treatment significantly increased chlorophyll content for all species, with *B. juncea* and *F. arundinacea* showing the highest chlorophyll content response when fertilized (Figure 2.2).

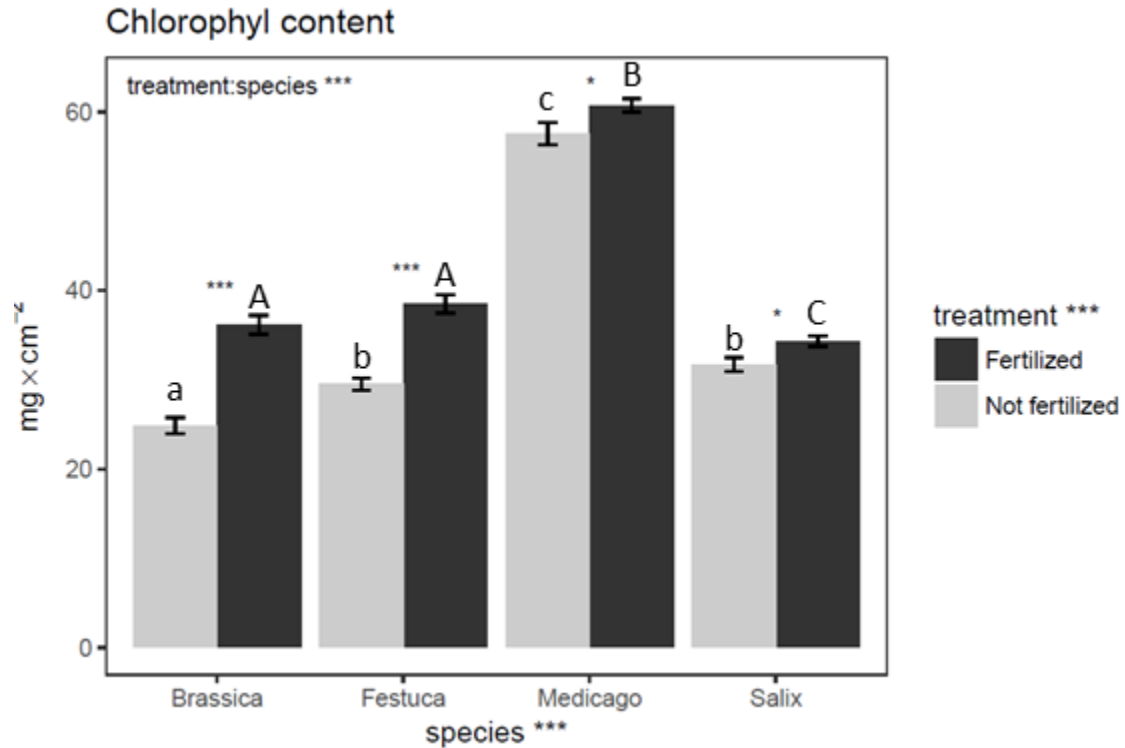


Figure 2.2. Mean chlorophyll content in each species ( $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) for the months of June, July and August during the 2015 growing season. Error bars represent standard errors and significant fertilization effects per species are shown with asterisks: \*\*\* :  $p < 0.001$ , \* :  $p < 0.05$ . Letters above the bars indicate significant differences of post hoc species effects (Tukey  $< 0.05$ ): lower case for non fertilized plants, higher case for fertilized plants.

Analyses of stomatal conductance revealed no interaction ( $p = 0.5019$ ) and a global species effect ( $p = 0.0017$ ; Figure 2.3). Stomatal conductance tended to be lower for *F. arundinacea*. Moreover, although stomatal conductance was always greater in plants from the fertilized treatment, the effect was not significant ( $p = 0.1255$ ).

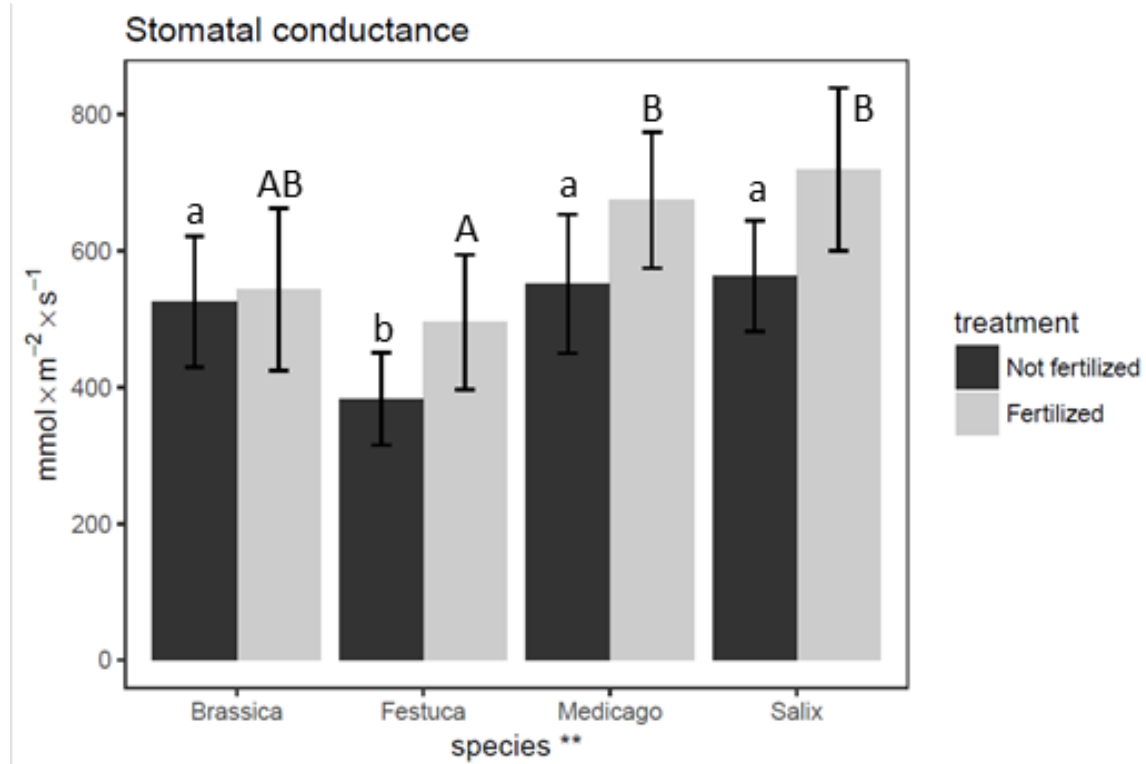


Figure 2.3. Mean stomatal conductance ( $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) for the months of June, July and August during the 2015 growing season. Error bars represent standard errors and significant effects are shown with asterisks: \*\* :  $p < 0.01$ . Letters above the bars indicate significant differences of post hoc species effects (Tukey  $<0.05$ ) : lower case for non fertilized plants, higher case for fertilized plants.

### 2.8.2. Accumulation of contaminants in aboveground plant biomass

Trace element concentrations were quantified in tissues of *Festuca arundinacea*, *Medicago sativa* and *Salix purpurea* (Figure 2.4.).

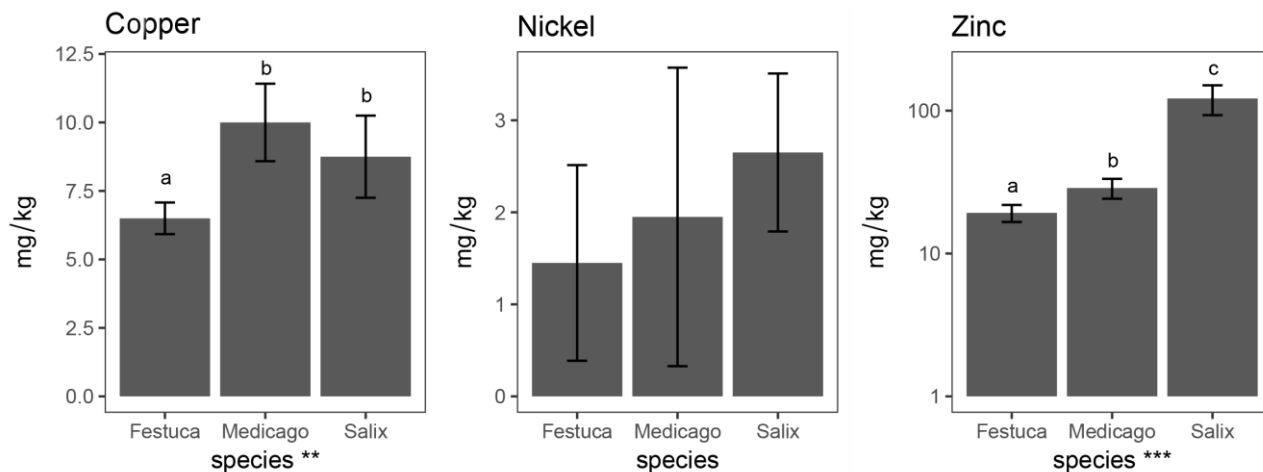


Figure 2.4. Accumulation  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  of copper, nickel, and zinc in *Festuca*, *Medicago* and *Salix* aerial parts at the end of the experiment (2015). \* As and Cr were below the limits of detection. Letters above the bars indicate significance assessed using Tuckey test. \*\*\* :  $p < 0.001$ , \*\* :  $p < 0.01$ .

The growth cycle of *B. juncea* appeared to be shorter than expected, ending in August. Although this species had initially shown promise for use in phytoremediation due to its large biomass production capacities combined to high concentrations of metal in the above-ground portions (Rathore et al., 2017) and despite being an annual, its short cycle under field testing conditions suggests that *B. juncea* might not be the most suitable candidate for phytoremediation practices in Quebec. It was therefore excluded from trace element quantification. Trace element concentrations in aerial parts of *F. arundinacea*, *M. sativa* and *S. purpurea* were respectively  $6.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  and  $8.75 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  for copper;  $1.45 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,  $1.75 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  and  $2.65 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  for nickel;  $19.25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,  $28.75 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  and  $121.75 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  for zinc (Figure 2.3). Lead was detected in one sample of *F. arundinacea* and one sample of *M. sativa* (both below  $0.5 \text{ mg/kg}$ ) but not in *S. purpurea* or in the other samples. Arsenic and chromium concentration were below the detection limits (table 2.5).

Table 2.3. Trace elements accumulation in aboveground plant tissues at the end of the 2015 growing season (mg.kg<sup>-1</sup> dry weight). LDR = detection limit F+ = plants treated with 30-10-10 fertilizer

	<b>LDR</b>	<b><i>Festuca</i> F+</b>	<b><i>Medicago</i> F+</b>	<b><i>Salix</i> F+</b>
Arsenic (As)	0.5	<0.5	<0.5	<0.5
Chromium (Cr)	0.5	<0.5	<0.5	<0.5
Copper (Cu)	1	6.5	10	8.75
Nickel (Ni)	0.5	1.45	1.75	2.65
Lead (Pb)	0.3	0.5	0.3	<0.3
Zinc (Zn)	1	19.25	28.75	121.75

Accumulation of dioxins and furans was measured in the aerial parts of *F. arundinacea*, *M. sativa* and *S. purpurea* at the end of the experiment (2015), revealing that tetra, penta, hexa and octa PCDD/F accumulated in these three species (Table 2.4). *F. arundinacea*, *M. sativa* and *S. purpurea* concentrated the 2,3,7,8-tetra CDD compound (toxic equivalency factor (TEF) of 1.0), which is the most toxic of the dioxin and furan congeners (Hanano et al., 2015), reaching 0.39 ng/kg for dioxins and 0.38 ng/kg for furans in willows (Table 2.4). Moreover, *F. arundinacea* concentrated up to 63.00 ng/kg dry weight of chlorodibenzo-p-dioxin and 27.40 ng/kg of chlorodibenzo-furans (Table 2.4.).



Table 2.4. Dioxin and furan content in *Festuca*, *Medicago* and *Salix* aerial parts (2015). \*CDD = Chloro Dibenzo Dioxin. \*\* CDF = Chloro Dibenzo Furan

parameters	units	2015		
		Festuca	Medicago	Salix
2,3,7,8-Tetra CDD *	ng/kg	0.25	0.22	0.39
1,2,3,7,8-Penta CDD *	ng/kg	0.33	0.37	0.37
1,2,3,4,7,8-Hexa CDD *	ng/kg	0.3	0.3	0.43
1,2,3,6,7,8-Hexa CDD *	ng/kg	0.26	0.29	0.38
1,2,3,7,8,9-Hexa CDD *	ng/kg	0.23	0.28	0.37
1,2,3,4,6,7,8-Hepta CDD *	ng/kg	0.6	0.5	1.2
Octachlorodibenzo-p-dioxin	ng/kg	3.2	8.4	0.25
Tétrachlorodibenzo-p-dioxins	ng/kg	0.25	0.24	0.39
Pentachlorodibenzo-p-dioxins	ng/kg	0.33	0.38	0.41
Hexachlorodibenzo-p-dioxins	ng/kg	0.28	0.26	0.45
Heptachlorodibenzo-p-dioxins	ng/kg	0.5	0.46	1.8
Chlorodibenzo-p-dioxins total	ng/kg	63	17.2	8.3
2,3,7,8-Tetra CDF **	ng/kg	0.21	0.2	0.38
1,2,3,7,8-Penta CDF **	ng/kg	0.18	0.18	0.36
2,3,4,7,8-Penta CDF **	ng/kg	0.18	0.18	0.41
1,2,3,4,7,8,-Hexa CDF **	ng/kg	0.28	0.35	0.46
1,2,3,6,7,8-Hexa CDF **	ng/kg	0.19	0.18	0.3
2,3,4,6,7,8-Hexa CDF **	ng/kg	0.17	0.2	0.37
1,2,3,7,8,9-Hexa CDF **	ng/kg	0.18	0.22	0.36

1,2,3,4,6,7,8-Hepta CDF **	ng/kg	0.39	2	0.49
1,2,3,4,7,8,9-Hepta CDF **	ng/kg	0.24	0.29	0.35
Octachlorodibenzofuran	ng/kg	0.8	0.7	0.9
Tétrachlorodibenzofurans	ng/kg	0.23	0.19	0.34
Pentachlorodibenzofurans	ng/kg	0.18	0.21	0.4
Hexachlorodibenzofurans	ng/kg	0.15	0.3	0.43
Heptachlorodibenzofurans	ng/kg	0.21	0.33	0.37
Chlorodibenzo furans total	ng/kg	27.4	22.6	2.9

### 2.8.3. Evolution of soil contamination between 2010 and 2015

Trace elements were quantified in the soil in 2010 and 2015 to document the effect of plants on soil decontamination (Table 2.5.).

Table 2.5 Soil contamination evolution between 2010 and 2015 (mg/kg dry weight). LDR = detection limit

	Bloc 1		Bloc 2		Bloc 3		Bloc 4		
	LDR	2010	2015	2010	2015	2010	2015	2010	2015
Arsenic	5	7	< 5	9	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
Chromium	<0.5	97	14	52	96	<0.5	12	<0.5	12
Copper	2	84	5	75	130	10	4	10	4
Nickel	1	42	15	33	57	3	19	3	19
Lead	5	56	6	6	10	<10	<5	<10	<5
Zinc	10	74	18	39	79	23	11	23	11

Arsenic concentration decreased in blocks 1 and 2, and remained below detection limits in blocks 3 and 4 throughout the experiment. Cadmium was undetectable throughout the study in all blocks. Chromium and nickel concentrations in soil decreased in block 1, but higher levels were found in blocks 2, 3 and 4 in 2015 in comparison to 2010. Copper, zinc and lead concentration decreased in blocks 1, 3 and 4 while their concentration increased in block 2 (Table 2.5). Concerning copper and chromium only, results show that block 1 was the most polluted, but concentrations of both contaminants decreased significantly ( $P < 0.05$ ) following plant establishment. Copper and zinc were the two most abundant trace elements in plant aerial parts at the end of the experiment. PCP concentration in soil decreased in the three sampling trenches from 3.5 mg/kg to below detection limits (<0.1 mg/kg) (Table 2.6). Neither HAP nor C10-C50 were detected in 2010 or in 2015 (HAP reported in table 2.6 do not include dioxins and furans).

Table 2.6. Organic contamination changes in soil from 2010 to 2015 (mg/kg dry weight)

LDR= detection limit

N/A = not applicable / not detected

A10, B10, C10 = sampling point for 2010 quantification

A15, B15, C15 = sampling point for 2015 quantification

	LDR	2010			2015		
		A10	B10	C10	A15	B 15	C15
<b>HAP</b>	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	N/A	N/A	N/A
<b>C10-C50</b>	100	<100	<100	<100	N/A	N/A	N/A
<b>PCP</b>	0.1	3.5	0.4	<0.1	<0.1	0.2	<0.1

## 2.9. Discussion

The main purpose of this study was to investigate the potential of four plant species (*S. purpurea*, *B. juncea*, *F. arundinacea* and *M. sativa*) to decontaminate a former storage site polluted by PCP (dioxins and furans) and CCA (chrome, arsenic and copper). The challenge for plant establishment in this trial was two-fold. Firstly, most soil samples from the site contained multiple contaminants (trace elements and organic pollutants) resulting from CCA and PCP leachates and, secondly, soil was highly mineralized and compacted. Yet, the results showed that all studied plants established successfully and showed relatively high biomass yields compared to other experiments conducted in similar conditions (Reshma and Krishma, (2015, 2014).

### 2.9.1. Plant responses to nitrogen fertilizer

Previous work has shown that the addition of nitrogen fertilizer (30-10-10) can be beneficial to biomass yields (Chang et al., 2013; Merkl et al., 2005). Surprisingly, in this experiment, nitrogen fertilizer did not significantly improve biomass production or stomatal conductance for the four

monitored species. However, it significantly increased chlorophyll content for all four. Since this last parameter is an indicator of healthy plant development, it might be tempting to conclude that nitrogen fertilizer contributed to species establishment in a remediation context. Moreover, despite not having significantly increased biomass production, a trend in this direction was observed for most species (Figure 2.1). Considering that the addition of nutrients via fertilization was previously shown to increase biological activity in the soil (Chu et al. ,2007; Su et al., 2015), nitrogen fertilization might have overall benefits for phytoremediation that didn't manifest directly in our study.

In the context of future work, it might be relevant to test fertilizers containing different phosphate concentrations. Several studies have suggested that, due to its chemical homology with arsenate, phosphate could modify arsenate bioavailability in the soil and increase its uptake in plant tissues (Meharg and Macnair 1992; Abedin et al. 2002). Hence, while further work is needed to optimize fertilizer selection, proper plant nutrition is an aspect that also needs to be considered in phytoremediation applications, as successful plant establishment and growth could potentially increase remediation efficiency.

## **2.9.2. Accumulation of contaminants in plant aboveground biomass**

### **2.9.2.1. Trace element extraction**

The quantification of trace elements in the aboveground biomass suggests that willows concentrated four times more zinc than *F. arundinacea* and *M. sativa* per kg of dry mass (Figure 2.4). Considering willows' high growth rate (Figure 2.1) they can be considered as an ideal candidate species for the remediation of zinc-contaminated soil. Surprisingly, *S. purpurea*, *F. arundinacea* and *M. sativa* did not differ significantly in terms of nickel uptake, while *S.*

*purpurea* and *M. sativa* concentrated significantly more copper than *F. arundinacea*. On the other hand, lead extraction was either low or below detection limit in all species monitored, suggesting that this element is not easily extracted by plants (Butcher, 2009; Blaustein, 2017; Tlustoš et al., 2007b). Previous research led by Butcher (2009) demonstrated that lead uptake is dependent on its chemical form in soil, and that, although the persistence of a chelating agent in the environment is a concern, its use could increase lead extraction. In the context of remediating this CCA polluted site, arsenic and chromium were not detected in aboveground plant tissues. However, several factors could explain these findings. Indeed, bioavailability of these trace elements could have decreased due to interactions with soil particles, as suggested by Fitz and Wenzel (2002). Also, due to their chemical analogy, arsenic and phosphate could compete to enter plant roots via phosphate transporters (Mohammed et al., 2002; Abedin et al., 2002). Another explanation could be that, after entering plant roots, arsenic is not or is minimally translocated to aboveground tissues, as observed by Liu et al. (2004) and Vamerli et al. (2009). This hypothesis is supported by previous hydroponic experiments showing that willows are able to concentrate arsenic mostly in roots, while being able to translocate it to aboveground tissues only when exposed to higher concentrations (Yanitch et al., 2017). Chromium extraction, on the other hand, has also been reported to be dependent on soil structure, and mostly sequestered in roots (Lotfy et al., 2014).

#### **2.9.2.2. Dioxin and furan extraction**

A particularly important finding in our study is that dioxins and furans were present in aboveground biomass of all tested plant species. To our knowledge, dioxin and furan haven't yet been reported to be extracted by plants and very little is known about their toxicity to plant metabolisms. Herein, distinction is made between toxic furans from PCP residues, and the fatty

acid furans naturally occurring in some plant species (Gorst-Allman et al., 1988; Mawlong et al., 2016; Vetter et al., 2012). Two types of negative controls were included, among other measures, to avoid any bias during quantification results analysis and ensure result robustness. Consequently, we are confident that the dioxin and furan levels measured in plant tissues were linked to uptake from soil and not external contamination. These results are notable because they imply that the four tested species could be potential candidates for chlorodibenzo furan and chlorodibenzo dioxin remediation. Yet, they suggest that other plants growing on soils containing dioxins and furans might accumulate these compounds in their tissues. While testing for the presence of dioxins and furans in plant tissues is challenging for analytical and budgetary reasons, our results show that plant tissues harvested from sites contaminated by these compounds should also be considered to be contaminated by them, and, due to high carcinogenicity, treated accordingly to their potential toxicity. At a much wider scale and because of their ubiquitous character (Nieuwoudt et al., 2009), these contaminants might find an entry into the food chain if not treated properly and thus represent a potentially severe health concern.

### **2.9.3. Phytoremediation potential**

While mechanisms underlying phytoremediation have been extensively investigated and our knowledge in this field is growing, this technology still requires optimization depending on site conditions. Here, we revealed that our four candidate species, can grow on PCP and ACC contaminated sites, and could uptake inorganic and organic pollutants from soils. While soil contamination monitored between 2010 and 2015 revealed that this experiment decreased soil content for several inorganic pollutants; arsenic, copper, zinc and lead. Meanwhile, results regarding chrome and nickel evoke site heterogeneity, which could introduce bias in sampling

analysis. Another hypothesis that could explain such an increase is that while plants attract water and surrounding chemicals (nutrients and some pollutants), they also attract metals lying in deeper soil sections.

Interestingly, copper and zinc were the two trace elements most accumulated in aerial parts in this experiment, suggesting that these species could be relevant candidates for remediation projects. Organic pollutant concentrations were also monitored between 2010 and 2015. While HAP and C10-C50 remained below detection limits from 2010 to 2015, PCP decreased from 3.5 mg/kg at the most contaminated sampling point (A10 / 2010) to below detection limits (2015). This result suggests that the plant species selected for this experiment could be relevant for remediation of PCP-contaminated sites.

Concerning dioxins and furans, quantification was only monitored in plants aerial parts due to the analysis high cost. Yet, this experience emphasizes that the selected candidates appear to be able to accumulate those toxic pollutants. However, dioxins and furans soil contents, before and after the experience, would have to be compared and correlated to the concentration uptake by plants during this study in order to confirm plants potential for such remediation processes.

Dioxins and furans congeners are stable molecules that need decades to, abiotically, degrade themselves in soil through photolysis mechanisms (Eisenberg et al., 1998; Field and Sierra-Alvarez 2008). The stability of these molecules is thought to increase with the amount of chlorinated group they are attached to (Eisenberg et al., 1998; Köller et al., 2000). Moreover, their high hydrophobicity drastically affects their bioavailability and thus increases their persistence in the environment (Field and Sierra-Alvarez 2008; Kao et al. 2001).



From a bioremediation perspective, plants that can accumulate dioxin and furans represent a promising alternative to costly physical or chemical processes currently in use to remove persistent organic pollutants from soil. While costs involved in the management of contaminated residues would still need to be taken into account, soil decontamination with the classical method is so expensive that using phytoremediation in this context represents the most attractive option. Organizations with limited access to resources and technologies, or with no time constraints, could decontaminate organic contaminated sites using plant-assisted approaches.

### **2.10. Acknowledgments**

We would like to thank Hydro-Québec for financial support and access to the experimental site. Our thanks also to the CRIBIQ and MITACS for their financial support during this project.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### **2.11. Synthèse du chapitre 2**

Les résultats avancés dans le chapitre 2 décrivent les réponses physiologiques des plantes testées pour leurs capacités d'établissement et d'accumulation des polluants présents sur une ancienne cour d'entreposage de poteaux traités à l'ACC et au PCP. Les candidats ont montré une bonne tolérance à la contamination présente dans le sol et à la fin des quatre saisons de suivi, une diminution de la pollution du site en ce qui a trait à l'arsenic, le cuivre, le zinc et les PCP a été observée. L'apport d'azote, bien qu'ayant induit une augmentation de la synthèse

chlorophyllienne dans les quatre espèces testées, n'a pas satisfait les attentes formulées dans les hypothèses.

L'expérience a par ailleurs permis de soulever un point sanitaire d'importance qui n'a pas été décrit dans la littérature : la présence de dioxines et de furanes dans les tissus végétaux. Bien que nécessitant de plus amples analyses afin d'être confirmé, ce résultat suggère qu'il faut traiter avec les précautions nécessaires tout échantillon végétal provenant d'un site contaminé aux dioxines et furanes.

Bien que les données d'accumulation mesurées n'aient pas satisfait nos attentes concernant les parties aériennes échantillonnées, la diminution des concentrations de certains polluants du site suggère une accumulation dans les tissus racinaires. L'expérience présentée dans le deuxième volet de cette thèse doctorale, qui vise à décrire les mécanismes moléculaires à la base de l'accumulation de l'arsenic, apporte une meilleure compréhension des phénomènes observés dans ce suivi *in situ*.

## **Chapitre 3 : Étude transcriptomique**

Les résultats apportés par l'analyse décrite dans le chapitre 2 montrent que le saule est capable de supporter l'arsenic dans son substrat et suggèrent son accumulation au niveau racinaire. Lors de la seconde expérience, décrite dans ce troisième chapitre, le suivi précis des réactions physiologiques engendrées chez des saules exposés à plusieurs niveaux de concentration d'arsenic a été réalisé en milieu contrôlé. Les transcriptomes provenant des plantes cultivées en présence de  $5\text{mg.kg}^{-1}$  et en conditions non contaminées ont été comparés afin d'avoir la liste des gènes dont l'expression est spécifiquement induite par l'arsenic.

*Objectif* : Identifier les gènes spécifiquement exprimés en réponse à l'arsenic chez le saule *Salix purpurea*.

*Hypothèse* : Les saules cultivés en présence d'arsenic sont capables de l'accumuler et de modifier l'expression de certains groupes de gènes afin de répondre à la présence du métalloïde.

## Transcriptomic response of purple willow (*Salix purpurea*) to arsenic stress

Aymeric Yanitch<sup>1</sup>, Nicholas J. B. Brereton<sup>1†</sup>, Emmanuel Gonzalez<sup>2</sup>, Michel Labrecque<sup>1,3</sup>,  
Simon Joly<sup>1,3</sup>, Frederic E. Pitre<sup>1,3</sup>

†Corresponding author

3. Institut de recherche en biologie végétale, University of Montréal, Montréal QC H1X 2B2, Canada
4. Canadian Centre for Computational Genomics, C3G Montreal Node, McGill University and Genome Quebec Innovation Centre, Montréal (Quebec) Canada H3A 0G1
5. Montreal Botanical Garden, Montreal, QC H1X 2B2, Canada

### Authors' contributions

FP, SJ, and ML designed the study. AY performed the plant growth trials and sample preparation. AY, EG and NJBB analysed the data and drafted the manuscript. All authors edited the manuscript and approved the final manuscript.

Published in *Front. Plant Sci.*, 28 Juin 2017 | <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01115>

### 3.1. Abstract

Arsenic (As) is a toxic element for plants and one of the most common anthropogenic pollutants found at contaminated sites. Despite its severe effects on plant metabolism, several species can accumulate substantial amounts of arsenic and endure the associated stress. However, the genetic mechanisms involved in arsenic tolerance remain obscure in many model plant species used for land decontamination (phytoremediation), including willows.

The present study assesses the potential of *Salix purpurea* ‘Fish Creek’ for arsenic phytoextraction and reveals the genetic responses behind arsenic tolerance, phytoextraction and metabolism. Four weeks of hydroponic exposure to 0, 5, 30 and 100 mg/L revealed that plants were able to tolerate up to 5 mg/L arsenic. Concentrations of 0 and 5 mg/L of arsenic treatment were then used to compare alterations in gene expression of roots, stems and leaves using RNA sequencing.

Differential gene expression revealed transcripts encoding proteins putatively involved in entry of arsenic into the roots, storage in vacuoles and potential transport through the plant as well as primary and secondary (indirect) toxicity tolerance mechanisms. A major role for tannin as a compound used to relieve cellular toxicity is implicated as well as unexpected expression of the cadmium transporter *CAX2*, providing a potential means for internal arsenic mobility.

These insights into the underpinning genetics of a successful phytoremediation species present novel opportunities for selection of dedicated arsenic tolerant crops as well as the potential to integrate such tolerances into a wider *Salix* ideotype alongside traits including biomass yield, biomass quality, low agricultural inputs and phytochemical production.

**Keywords:** *Salix*, arsenic, phytoremediation, transcriptomics, Plant metal stress, Plant abiotic stress, RNA-seq, tannins, plant defences, trace elements.

### 3.2. Introduction

Arsenic is a trace element recognized as a worldwide contaminant and health hazard (Martinson and Reddy, 2009). Natural geologic activity is thought to be the main source of global arsenic pollution but highly contaminated sites are generally related to anthropogenic activities such as agriculture, mining, as well as the use of arsenic in electronics or as a wood preservative (Mandal et Suzuki, 2002).

Arsenic, a metalloid element, is highly toxic to microorganisms, plants and animals (Kaise et al., 1985). In animals, arsenic is absorbed through drinking water and food (Duxbury et al., 2003; Goering et al., 1999; Henry et al., 2013) and once ingested, arsenic enters in cells and can generate oxidative damage to DNA leading to a well-documented carcinogenic effect (Cohen et al., 2013; Ng, 2005). Arsenic toxicity to plants has been extensively studied (Carbonell et al., 1998; Dai et al., 2013; Tripathi et al., 2007; Woolson, 1973) and triggers symptoms such as root growth inhibition, desiccation or death in non-tolerant plants (Macnair and Cumbes, 1987; Meharg and Macnair, 1991).

The chemical state of arsenic is dependent on soil conditions such as pH, organic content and redox potential (Bolan et al., 2015.; Mandal and Suzuki, 2002; Mishra et al., 2013; Zhao et al., 2009a). Arsenate ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) appears to be the most abundant form in aerobic conditions, while arsenite ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) is the major chemical state of this metalloid under a reducing environment (Mandal and Suzuki, 2002). The chemical similarity of the arsenate ion ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ) and phosphate creates competition between both compounds to be taken up via phosphate transporters across

the plasma membrane and once inside the cell cytoplasm, arsenate can replace phosphate in respiration processes, disrupting cellular metabolism by generating unstable ADP-As in place of ATP (Meharg, 1994). Arsenite ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) toxicity is predominantly due to its high reactivity with sulfhydryl groups present in a broad range of metabolic enzymes (Abedin et al., 2002).

The decontamination of soil and water contaminated with arsenic presents a challenge for environmental rehabilitation. The traditional decontamination technique is to excavate the soil and dispose of it in a protected landfill. Phytoremediation is a potential environmentally sustainable alternative to the physical (excavation and disposal to landfill) or chemical (chelation, thermic desorption, soil washing, etc.) decontamination processes (Mench et al., 2009; Pulford and Watson, 2003; Wan, 2015). It relies on natural plants properties that, while taking up water and nutrients from soil, can also import pollutants into their tissues (Pulford and Watson, 2003).

Substantial arsenic phytoremediation research has focused on hyperaccumulating plants that can concentrate high amount of metal per gram of tissue (Ma et al., 2001; Poynton et al., 2004; Wang et al., 2002). However, hyperaccumulators are generally limited by a low biomass production. One of the most well-studied and effective plants which concentrate arsenic is the Chinese Brake fern (*Pteris vittata*) that can tolerate  $1.5 \text{ mg.g}^{-1}$  of soil arsenic and accumulate up to  $150 \text{ mg.g}^{-1}$  arsenic in its tissues (the majority being above-ground in fronds) (Ma et al., 2001; Meharg and Hartley-Whitaker, 2002). In contrast, willows (*Salix* sp.) generally take up a lower concentration of trace elements per gram of tissue but, due to their higher biomass productivity, can extract comparable net amounts of pollutant (Purdy and Smart, 2008). *Salix* is a diverse genus with about 450 species (Argus 1997; Lauron-Moreau et al. 2015), some of which have been shown to have potential for phytoremediation processes such as *Salix viminalis* and *Salix*

*purpurea* (Cloutier-Hurteau et al., 2013; Desjardins et al., 2015; Grenier et al., 2015; Mleczek et al., 2010; Vollenweider et al., 2006). *Salix spp.* response to metal contamination has predominantly investigated cadmium (Cd) and zinc (Zn). For instance, *Salix caprea* can accumulate considerable amounts of Zn and Cd in their aboveground organs (Chen et al., 2013; Dos Santos Utmazian et al., 2007; Robinson et al., 2000; Unterbrunner et al., 2007). However, a study performed by Purdy and Smart (2008) has shown that some willow species can also uptake arsenic, suggesting they could also be used to directly phytoremediate arsenic.

Plant gene expression response to arsenic presence has previously been described in species such as rice (*Oriza sativa*) (Li et al., 2009; Ma et al., 2007b; Song et al., 2014; Zhao et al., 2010), velvet grass (*Holcus lanatus*) (Bleeker et al., 2006), *Arabidopsis thaliana* (Catarcha et al., 2007; Kamiya et al., 2009) and Chinese Brake fern (*Pteris vittata*) (Ellis et al., 2006). Several transporters have been shown to interact with arsenic to transport it across plasma membrane. High affinity phosphate transporters appear to be involved in arsenate entry (Catarcha et al., 2007, 2007), while silicon transporters (such as Lsi1) transport arsenite and methylated forms of arsenic (Li et al., 2009; Zhao et al., 2010). Once in root cells, arsenate could be reduced to arsenite by a CDC-25 phosphatase (Bleeker et al., 2006; Duan et al., 2007). Then arsenite can form a complex with phytochelatin (Hartley-Whitaker et al., 2001) and will be transported by ABC transporters (Song et al., 2010) to be stored in the vacuole in order to prevent cell damage. Little research into *Salix* gene expression in response to metal contaminants has been undertaken to date, but typical responses to metal contamination are likely to involve radical oxygen species (ROS) production (Dietz et al., 1999) and expression of common detoxification mechanisms, such as the glutathione pathway (Gonzalez et al., 2015). In this study, *Salix purpurea* are grown



hydroponically under different arsenic concentrations to assess arsenic accumulation and alterations to gene expression.

### **3.3. Materials and methods**

#### **3.3.1. Hydroponic experiment**

*Salix purpurea* 'Fish Creek' stem cuttings of 20 cm length were established under hydroponic conditions in tanks (15cm x 25cm x 12cm = 3.8 L) containing 0.25x of Hoagland solution with an aeration system to prevent lack of oxygen (Durell, 1941; Moreno-Jiménez et al., 2010). Pumps providing four litres of air per minute were used as recommended by Durell (1941). After two weeks of growth, 64 cuttings were exposed to one of four levels of arsenic contamination: 0, 5, 30 and 100 mg.L<sup>-1</sup> (element concentration, added as sodium heptahydrate arsenate Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0, 21 mg.L<sup>-1</sup>, 125 mg.L<sup>-1</sup>, 416 mg.L<sup>-1</sup> of salt, respectively). The treatment application was randomized and the volume of each tank was maintained to a constant 3.8 L over the two weeks by addition of water alone. Consequently, the total amount of arsenic applied was 0 mg, 19 mg, 114 mg and 380 mg respectively. Plants were cultivated under controlled conditions: 18-25 °C with a 18h light/6h dark photoperiod (Purdy and Smart, 2008) under light intensity of 500 μmol.m<sup>-2</sup>. A total of 16 tanks were used and distributed in four experimental blocks (four arsenic concentrations distributed on four blocks). Of the four plants per tank: one was sampled for RNA extraction and sequencing two weeks after treatment application, and another was used for non-destructive chlorophyll content and stomatal conductance assessment. Tissue collected for RNA analysis (from roots, stems and leaves) was immediately flash frozen using liquid nitrogen and stored at -80°C until extraction. Chlorophyll content was monitored using an "atLEAF+" chlorophyll meter (FT Green LLC, DE, USA). Stomatal conductance was

recorded with a leaf porometer (Decagon Devices Inc., WA, USA). Both chlorophyll content and stomatal conductance were estimated following manufacturer's instructions twice a week between 10:00 and 12:00. One plant per treatment per block was destructively harvested for biomass yield and arsenic accumulation measurements at the beginning of the treatment, after 7 days and 14 days. Biomass production was evaluated destructively by weighing fresh roots, stems and leaves separately. Arsenic quantification in each plant tissue was performed using an inductively coupled plasma mass spectrometer (LCP-MS) at AGAT Laboratories (specializing in laboratory analysis and accredited by the Standards Council of Canada (SCC)). Results from the four treatments were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) and pairwise comparisons with Tukey's HSD test ( $\alpha = 0.05$ ).

### **3.3.2. Transcriptomic analyses**

All frozen tissues were ground to a powder using a mortar and pestle. Total RNA isolation was then performed following a hexadecyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) protocol (Chang et al., 1993; Gambino et al., 2008) using 100mg of tissue. RNA integrity was assessed with a Bioanalyzer RNA 6000 Nano Kit (RIN > 9; Agilent, Santa Clara, CA, USA).

Sequencing was performed on root, stem and leaf tissue for control and plants grown in 5 mg.L<sup>-1</sup> arsenic. Sequencing libraries were produced at Genome Quebec Innovation Centre using the TruSeq 100 bp paired-ends kit (Illumina® TruSeq® RNA Sample Preparation Kit), which included a polyA mRNA purification step and a random hexamer cDNA synthesis. Samples were sequenced using an Illumina HiSeq 2000 sequencing platform. Reads were filtered using Trimmomatic (Lindgreen, 2012). Reads under 40bp after filtering were discarded. A *de novo* transcriptome was assembled using Trinity software with default parameters (Grabherr et al., 2011; Haas et al., 2013) and contigs shorter than 200 bp were removed. Contig abundance was

estimated and normalized using Bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012) and eXpress (Trapnell et al., 2012) using default parameters. Differential gene expression between treatment was tested with EBSeq (Leng et al., 2013) at default parameters with an false discovery rate (FDR) set to 5 % and significance identified and expressed as posterior probability differential expression (PPDE) greater or equal to 0.95.

Annotation of differentially expressed contigs was performed following Gonzalez et al. (2015) using *Salix purpurea* 94006 reference Genome (*Salix purpurea* v1.0, DOE-JGI) as well as three protein databases: nr, Swissprot, Trembl. Best hits were selected based on the highest bitscore. Gene ontology (PANTHER - Protein ANALysis THrough Evolutionary Relationships) was used to speculate at an overview of general transcriptome function (Mi et al., 2007; Thomas et al., 2003). Using the Panther analysis tool (<http://www.pantherdb.org/>), an over-representation test was performed to identify panther terms that were more or less represented ( $\alpha = 0.05$  for statistical tests) in the transcriptome of arsenic treated plants (Mi et al., 2013).

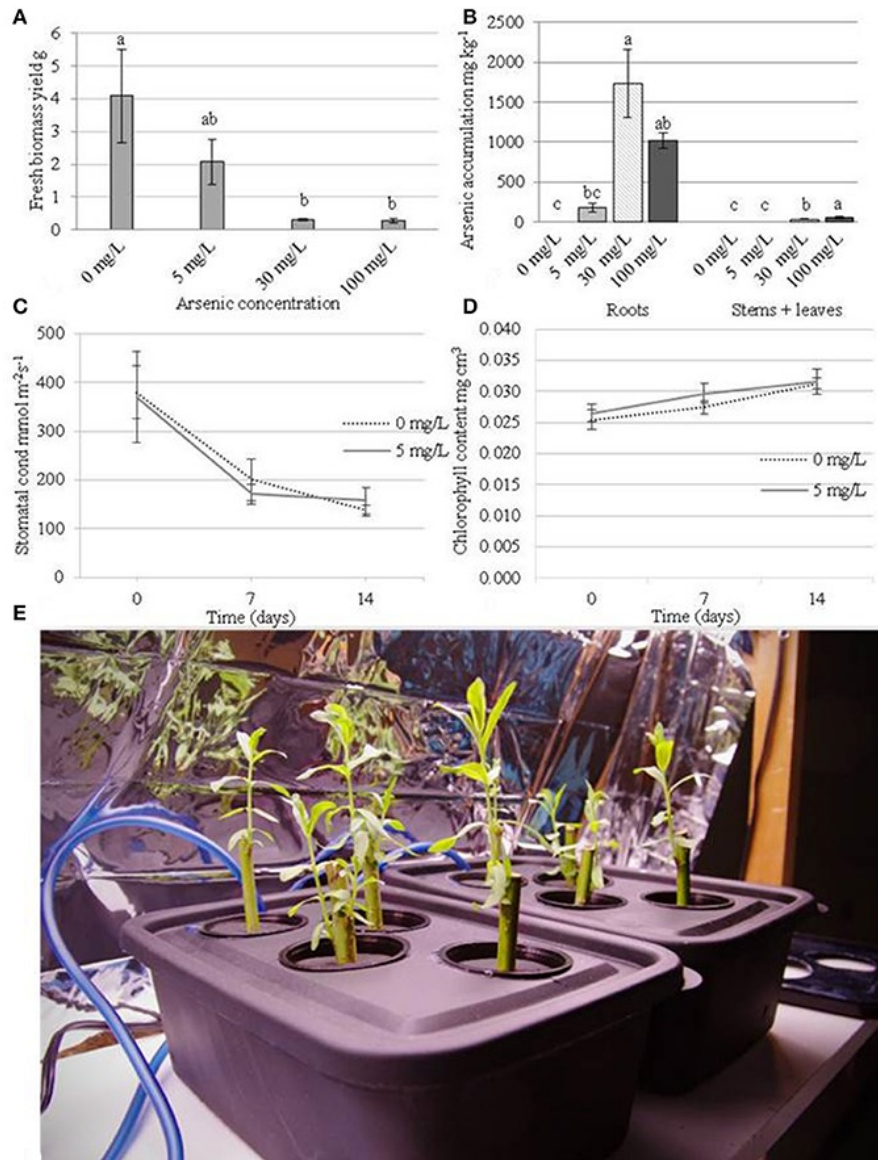
### **3.4. Results**

#### **3.4.1. Arsenic uptake and physiological response to treatment**

The 30 mg.L<sup>-1</sup> and 100 mg.L<sup>-1</sup> arsenic treatments reduced biomass yields by 92.7% and 93.4% respectively when compared to control plants (Figure 3.1A) after two weeks of treatment. The lowest arsenate treatment of 5 mg.L<sup>-1</sup> also had substantial reduction in biomass of 49.1% compared to control plants (albeit not significant using Tukey's HSD  $p > 0.05$ ). At a concentration of 5 mg.L<sup>-1</sup> of arsenic, treated plants accumulated up to 183 mg.kg<sup>-1</sup> arsenic in their roots while the level was below detection limit (e.g., < 5 mg.kg<sup>-1</sup>) in the aboveground organs (Figure 3.1B). Plants exposed to 30 mg.L<sup>-1</sup> arsenic accumulated a concentration of 1,731

mg.kg<sup>-1</sup> in their roots (195 mg total arsenic) and 32 mg.kg<sup>-1</sup> (6 mg total arsenic) in their aboveground tissues. At the most concentrated condition (100 mg.L<sup>-1</sup>), plants showed severe necrotic symptoms after 7 days of treatment but were able to accumulate 1,015 mg.kg<sup>-1</sup> arsenic in their roots (134 mg total arsenic) and 841 mg.kg<sup>-1</sup>arsenic in their stems and leaves (836 mg total arsenic).

Plant transpiration rate, as measured by stomatal conductance, and chlorophyll content could not be measured at 30 mg.L<sup>-1</sup> and 100 mg.L<sup>-1</sup> arsenic treatments due to the extent of plant necrosis. Transpiration rate did not differ significantly between control plants (average 239 mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) and the 5 mg.L<sup>-1</sup> treatment (average 231 mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) (Figure 3.1C). Similarly, chlorophyll content did not differ significantly between control plants and the 5 mg.L<sup>-1</sup> arsenic treatment (Figure 3.1D).



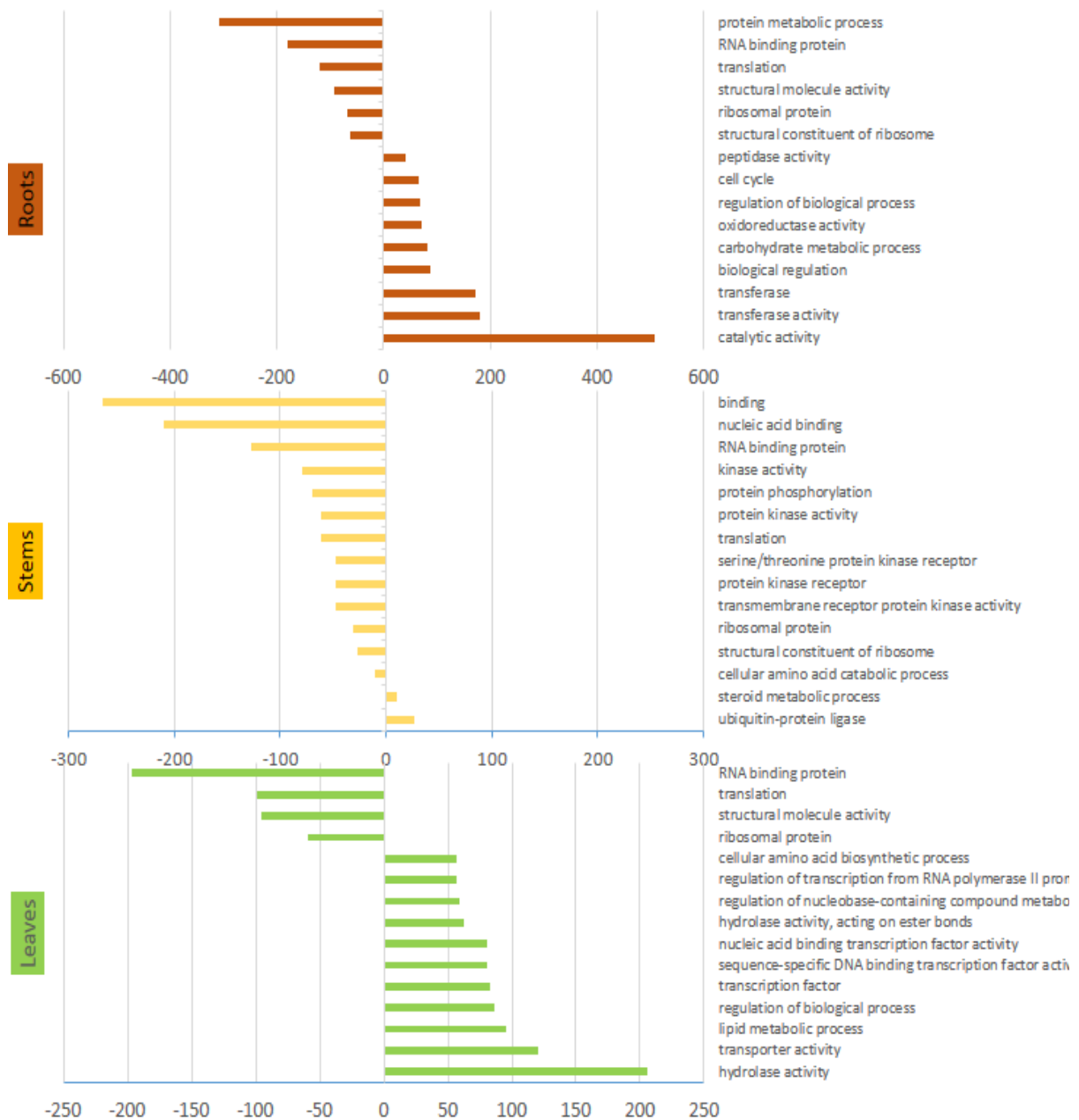
**Figure 3.1. Physiological measurements of the plants during arsenic exposure.** Plants were cultivated for 14 days before treatment with arsenic concentrations of 0, 5, 30 or 100 mg.L<sup>-1</sup>. A: Fresh weight biomass yield (g) after 14 days of treatment (28 days of growth). B: Arsenic accumulation in organs after 14 days of treatment. C: Chlorophyll content mg.cm<sup>3</sup> (day 0 represents treatment application date). D: stomatal conductance mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (day 0 represents treatment application date). Error bars represent standard error (n = 4 blocks). Tukey's Honestly Significant Difference ( $\alpha = 0.05$ ) is represented by lettering. E: presentation of the hydroponic system

### **3.4.2. Arsenic Treatment Transcriptome**

A total of 451,706 contigs were assembled from 24 RNA samples extracted from roots, stems and leaves of 4 treated and 4 control plants. Transcript length averaged 1,647 bp (N50: 2966 bp) with a mean GC content of 40 %. Across all tissues, 10,613 contigs were identified as differentially expressed (2.35 %). Of these, 86.7 % were best annotated as *Salix* in origin, while 5.7 % were best annotated from non-salix organisms (henceforth assumed to be transcripts) and 7.6 % had no confident BLASTx hit in either NCBI nr, SwissProt, TrEMBL or the *Salix purpurea* 94006 genome (no hit, bitscore < 50 or e-value > 10<sup>-4</sup>, classified here as unknown).

#### **3.4.2.1. Differential expression in roots**

Gene ontology analyses revealed that the most represented ontology category among DE genes in arsenic treated plants was catalytic activity, followed by transferase activity and biological regulation, while the most down-regulated categories included protein metabolic processes and RNA binding (Figure 3.2).



**Figure 3.2. Gene ontology terms.** Results from the statistical overrepresentation analysis showing significantly more and less represented Panther terms from organs of arsenic treated plants. Only the 15 most abundant terms are shown. Panther terms for each DE gene are given in supplementary file 1 if present.

Variation in transcripts encoding transporter proteins such as phosphate transporters and aquaporins could be predicted upon entry of arsenic into the roots. Transcripts encoding the phosphate transporter PHO1 (SapurV1A.0063s0550.x.p) were indeed up-regulated (1.70 fold) in roots of arsenic treated trees (Table 3.1). Three transcripts encoding the aquaporin NIP1.1 (SapurV1A.0029s0170.x.p) were also up-regulated in the presence of arsenic (3.13, 4.76 and 2.49 fold higher respectively) with one (comp88567\_c0\_seq20) being in very high normalized abundance, 34.85 Fragments Per Kilobase per Million reads mapped (FPKM). Conversely, the aquaporin TIP2 (SapurV1A.0805s0180) was down-regulated (7.34 fold). The well-known silicon transporter, Lsi1, was not differentially expressed in roots.



**Table 3.1. A selection of differentially expressed genes in roots** (all genes have a posterior probability of being differentially expressed >0.95). The full list is available in Supplementary File 1.

<i>De novo</i> assembly Contig id	Mean FPKM		Regulation	Fold Change	Salix purp V1.0 Protein ID	Annotation Description
	Control	Arsenic				
<b>TRANSPORTERS</b>						
<i>Phosphate transporter</i>						
comp94662_c0_seq9	1.51	2.57	+	1.70	SapurV1A.0063s0550.2.p	Phosphate transporter PHO1-like protein
<i>NIP1.1</i>						
comp88567_c0_seq20	0.15	0.70	+	4.77	SapurV1A.0029s0170.1.p	Aquaporin NIP1.1
comp88567_c0_seq18	0.41	1.29	+	3.14	SapurV1A.0029s0170.1.p	Aquaporin NIP1.1
comp88567_c0_seq24	14.03	34.85	+	2.48	SapurV1A.0029s0170.1.p	Aquaporin NIP1.1
<i>TIP2</i>						
comp83540_c0_seq2	2.04	0.28	-	7.34	SapurV1A.0805s0180.1.p	Aquaporin TIP2
<i>CAX2</i>						
comp93893_c1_seq57	0.05	0.24	+	5.05	SapurV1A.1071s0020.11.p	Vacuolar cation/proton exchanger 2
comp93893_c1_seq50	1.90	8.74	+	4.61	SapurV1A.0338s0120.1.p	Vacuolar cation/proton exchanger 2
<i>ABC transporters</i>						
comp90450_c0_seq1	0.02	0.37	+	22.39	SapurV1A.0084s0020.1.p	White-brown-complex ABC transporter
comp88754_c0_seq6	0.15	0.84	+	5.58	SapurV1A.0771s0060.1.p	Multidrug exporter, ABC transporter
comp77006_c0_seq14	0.27	0.75	+	2.75	SapurV1A.1733s0060.2.p	ABC1-domain protein
comp79446_c0_seq6	0.51	1.27	+	2.49	SapurV1A.0001s1760.1.p	ABC(ATP-binding) family transporter
comp93840_c0_seq5	1.61	3.89	+	2.42	SapurV1A.0202s0010.1.p	Multidrug resistance protein ABC transporter
comp91076_c0_seq38	0.51	1.12	+	2.21	SapurV1A.0317s0290.1.p	ABC transporter B
comp91858_c0_seq22	4.24	6.81	+	1.61	SapurV1A.1189s0020.1.p	Multidrug resistance pump protein
comp88754_c0_seq19	1.57	2.34	+	1.49	SapurV1A.0438s0120.1.p	Multidrug exporter, ABC transporter
comp94792_c2_seq58	0.14	0.00	-	54.58	SapurV1A.0326s0140.1.p	ABC transporter G family protein
comp36900_c0_seq1	0.44	0.01	-	43.43	SapurV1A.1188s0080.1.p	ABC transporter
comp84963_c0_seq2	10.39	0.57	-	18.32	SapurV1A.1334s0010.1.p	ABC transporter, phospholipid flippase
comp90794_c0_seq50	0.56	0.03	-	17.32	SapurV1A.1019s0010.1.p	ABC transporter
comp93051_c1_seq45	0.45	0.03	-	14.18	SapurV1A.0028s0110.1.p	Multidrug resistance protein ABC transporter
comp94792_c2_seq63	1.08	0.08	-	14.06	SapurV1A.0326s0140.1.p	ABC transporter G family protein
comp94792_c2_seq32	1.00	0.08	-	13.34	SapurV1A.0326s0140.1.p	ABC transporter G family protein
comp94792_c2_seq37	0.18	0.01	-	13.34	SapurV1A.0326s0140.1.p	ABC transporter G family protein
comp92573_c0_seq2	0.17	0.02	-	9.60	SapurV1A.1230s0070.1.p	ABC transporter family B, PpABCB26
comp92573_c0_seq10	0.25	0.04	-	6.64	SapurV1A.1230s0070.1.p	ABC transporter B protein PpABCB26
comp89364_c0_seq6	0.84	0.14	-	5.90	SapurV1A.0902s0030.1.p	ABC1
comp95190_c0_seq25	0.62	0.22	-	2.83	SapurV1A.0479s0010.1.p	Multidrug resistance protein ABC transporter
comp94365_c1_seq15	1.54	0.83	-	1.85	SapurV1A.0169s0040.1.p	ABC transporter
comp89676_c0_seq3	0.74	0.43	-	1.71	SapurV1A.0252s0220.1.p	Multidrug resistance protein ABC transporter
comp87484_c0_seq75	0.78	0.51	-	1.53	SapurV1A.0153s0550.1.p	Multidrug resistance protein ABC transporter
comp94768_c0_seq5	4.77	3.14	-	1.52	SapurV1A.0038s0650.1.p	Multidrug exporter, ABC transporter
comp95190_c0_seq28	1.56	1.08	-	1.45	SapurV1A.0479s0010.1.p	Multidrug resistance protein ABC transporter
comp94768_c0_seq2	2.55	1.84	-	1.39	SapurV1A.0038s0650.1.p	Multidrug exporter, ABC transporter
comp95238_c0_seq3	3.34	2.72	-	1.23	SapurV1A.0294s0380.1.p	Multidrug exporter, ABC transporter

De novo assembly Contig id	Mean FPKM		Regulation	Fold Change	Salix purp V1.0 Protein ID	Annotation Description
	Control	Arsenic				
<b>ARSENIC METABOLISM</b>						
<i>Tyrosine phosphatase</i>						
comp939333_c0_seq5	1.26	2.61	+	2.08	SapurV1A.0142s0310.2.p	Tyrosine phosphatase
comp95075_c2_seq9	1.67	0.85	-	1.97	SapurV1A.0243s0430.1.p	Tyrosine phosphatase
<i>GS</i>						
comp94552_c0_seq13	4.18	9.31	+	2.23	SapurV1A.1124s0080.1.p	Glutathione synthetase
comp94552_c0_seq17	46.34	93.13	+	2.01	SapurV1A.1124s0080.1.p	Glutathione synthetase
comp94552_c0_seq22	3.82	5.87	+	1.54	SapurV1A.1124s0080.1.p	Glutathione synthetase
<i>PCS</i>						
comp91524_c1_seq2	0.09	0.96	+	10.33	SapurV1A.1703s0010.4.p	Phytochelatin synthetase-like protein
comp91524_c1_seq9	0.38	2.26	+	6.01	SapurV1A.1703s0010.4.p	Phytochelatin synthetase-like protein
comp92922_c0_seq2	0.42	1.36	+	3.22	SapurV1A.0160s0210.1.p	Phytochelatin synthase
<i>SAM</i>						
comp82683_c0_seq2	0.11	0.53	+	4.98	SapurV1A.0015s0590.1.p	S-adenosyl-L-methionine:carboxyl MT
comp91039_c3_seq21	0.16	0.52	+	3.34	SapurV1A.0335s0120.2.p	S-adenosylmethionine-dependent MT
comp91039_c3_seq16	1.57	4.72	+	3.01	SapurV1A.0335s0120.2.p	S-adenosylmethionine-dependent MT
comp91039_c3_seq41	0.34	1.01	+	2.94	SapurV1A.0335s0120.2.p	S-adenosylmethionine-dependent MT
comp85603_c0_seq18	0.90	2.24	+	2.49	SapurV1A.0447s0070.1.p	S-adenosyl-L-methionine-dependent MT
comp89150_c0_seq9	1.78	3.40	+	1.91	SapurV1A.0011s0500.1.p	S-adenosylmethionine-dependent MT
comp82009_c0_seq4	6.42	10.63	+	1.66	SapurV1A.0515s0050.1.p	S-adenosyl-L-methionine-dependent MT
comp91683_c1_seq5	0.15	0.00	-	41.04	SapurV1A.0176s0200.1.p	S-adenosyl-L-methionine-dependent MT
comp95439_c0_seq35	0.36	0.06	-	6.28	SapurV1A.0386s0140.1.p	S-adenosyl-L-methionine:SA carboxyl MT
comp95439_c0_seq22	0.09	0.02	-	5.03	SapurV1A.0386s0140.1.p	S-adenosyl-L-methionine:SA carboxyl MT
comp94259_c1_seq52	0.55	0.21	-	2.55	SapurV1A.0214s0280.2.p	S-adenosyl-L-methionine-dependent MT
comp95439_c0_seq24	3.98	2.37	-	1.68	SapurV1A.0386s0140.1.p	S-adenosyl-L-methionine:SA carboxyl MT
comp95439_c0_seq8	3.82	2.51	-	1.52	SapurV1A.0386s0140.1.p	S-adenosyl-L-methionine:SA carboxyl MT
<i>ACC synthase</i>						
comp82878_c0_seq1	0.48	0.95	+	1.97	SapurV1A.2160s0020.1.p	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase
<i>EIN</i>						
comp94650_c1_seq1	0.14	1.36	+	9.74	SapurV1A.0070s0670.1.p	Ethylene insensitive 3 class TF

Genes known to be involved in arsenic reduction could also be expected to be differentially expressed in the roots to decrease cellular toxicity. Two transcripts of CDC25-like tyrosine phosphatase, an arsenate reductase, were differentially expressed in roots; one up-regulated after arsenic treatment (SapurV1A.0142s0310) (2.08 fold) and the other down-regulated (SapurV1A.0243s0430) (1.97 fold) (Table 3.1). The first step of phytochelatin (PC) production involves gamma-glutamylcystein synthetase ( $\gamma$ ECS) to generate gamma-glutamylcystein from cysteine.  $\gamma$ ECS in roots were not differentially expressed between arsenic and control plants; however, expression levels of three glutathione synthase (GS) transcripts encoding the same protein (SapurV1A.1124s0080) were found to be in the most abundant transcripts in roots exposed to arsenic (one at 93.13 FPKM; Table 3.1, and Supplementary File 1). Phytochelatin production from glutathione (GSH) involves phytochelatin synthetase (PCS). PCS transcription was also up-regulated in plants exposed to arsenic; three transcripts encoding two PCS proteins

(SapurV1A.1703s0010.x.p and SapurV1A.0160s0210.x.p) were up-regulated in roots of treated trees.

Once complexed to phytochelatin, arsenite could be taken up by ABC transporters and stored in the vacuole. A large number of transcripts encoding ABC transporters were differentially expressed; eight transcripts were up-regulated in arsenic treated trees while 19 transcripts were down-regulated (Table 3.1). Two vacuolar cation/proton exchanger 2 (CAX2) transcripts, encoding two different proteins (SapurV1A.0338s0120.x.p and SapurV1A.1071s0020.x.p), were both up-regulated in arsenic treated roots (respectively 4.61 and 5.05 fold higher) (Table 3.1).

S-adenosyl methionine (SAM)-dependent methyltransferase mediated arsenic methylation is thought to be a principal plant physiological detoxification process. Seven transcripts from five SAM-dependent methyltransferase genes were up-regulated in arsenate treated plants whereas six transcripts from three genes were down-regulated (Table 3.1). Ethylene is a phytohormone known to be involved in organs cross communication during a stress. One transcript encoding aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACC synthase; SapurV1A.2160s0020.x.p), producing the ethylene precursor ACC, was up-regulated (7.95 fold higher) in response to the treatment. Transcripts associated to ethylene Insensitive factor (EIN; SapurV1A.0070s0670.x.) were also up-regulated in treated trees.

#### **3.4.2.2. Differential expression in stems**

Gene ontology analysis showed that 17 of 20 most abundant Panther terms identified by pooling differentially expressed genes were more abundant in control plants. The majority of these were

categories associated to DNA, RNA or protein synthesis or regulation (Figure 3.2). The up-regulated categories comprised ubiquitin ligase (+activity) and steroid metabolism.

Transcripts encoding a silicon transporter (SapurV1A.1225s0080.x.p), previously identified as being involved in loading of methylated forms of arsenic into the stem (Li et al. 2009), were up-regulated in stem tissue from treated plants (1.61 fold higher) (Table 3.2). As in roots, CAX2 transcripts (SapurV1A.0338s0120.x.p), thought to be involved in arsenite sequestration into vacuole, were also found to be up-regulated in stems from treated plants (3.39 fold higher). Conversely, two others CAX transcripts encoding one *Salix* gene (SapurV1A.0619s0210) were down-regulated in stems.

Expression of transcripts encoding ribosomal proteins appeared to be consistently down-regulated in arsenic treated stems. Thirty-one ribosomal transcripts were all found to be down-regulated in treated stems (Table 3.2). Within the cellulose biosynthesis pathway, three transcripts encoding *Salix* cellulose synthase A (CesA) were down-regulated in treated plants (SapurV1A.0437s0060.x/ SapurV1A.0336s0010.x/ SapurV1A.2489s0010.x), while one CesA 9 encoding transcript was up-regulated following arsenic treatment (13.81 fold higher) (SapurV1A.0828s0050.x). Abundance of a transcript encoding fasciclin-like arabinogalactan protein (FLA, SapurV1A.0258s0160.x.p), a cell wall glycoprotein, was down-regulated in stems (4.84 fold lower).

Further alterations to carbon partitioning were indicated by up-regulation of three transcripts encoding sucrose phosphate synthase (SPS) (SapurV1A.0034s0100.x.p) in treated stems (Table 3.2). Callose production is often thought to be involved in metal stress response and metal

diffusion limitation. Two transcripts encoding callose synthase (SapurV1A.0009s0010.x.p) were down-regulated (2.12 and 1.57 fold lower) in treated stems as well as a transcript encoding  $\beta$ -1, 3-glucan synthase (SapurV1A.0752s0050), a mandatory enzyme for callose synthesis (1.80 fold lower).

**Table 3.2. A selection of differentially expressed genes in stems** (all genes have a posterior probability of being differentially expressed > 0.95). The full list is available in Supplementary File 1.

De novo assembly Contig id	Mean FPKM		Regulation	Fold Change	Salix purp V1.0 Protein ID	Annotation Description
	Control	Arsenic				
<b>TRANSPORTERS</b>						
<i>Silicon transporter</i>						
comp87154_c0_seq2	1.31	2.11	+	1.61	SapurV1A,1225s0080,1,p	Silicon transporter
<i>Cation vacuolar</i>						
comp66704_c0_seq4	0.17	0.58	+	3.39	SapurV1A,0338s0120,1,p	Vacuolar cation/proton exchanger 2
comp92964_c1_seq3	10.06	3.47	-	2.90	SapurV1A,0619s0210,1,p	Vacuolar cation/proton exchanger
comp47917_c0_seq1	9.51	3.45	-	2.76	SapurV1A,0619s0210,1,p	Vacuolar cation/proton exchanger
<b>RIBOSOMAL PROTEIN</b>						
comp93888_c0_seq29	0.01	0.17	+	13.89	SapurV1A,0013s1150,1,p	50S ribosomal protein L5
comp89712_c0_seq27	0.51	1.02	+	2.00	SapurV1A,2715s0010,1,p	Ribosomal protein L15
comp90500_c1_seq47	0.38	0.03	-	13.44	SapurV1A,1939s0020,1,p	60S ribosomal protein L23a
comp89290_c0_seq18	0.32	0.02	-	13.14	SapurV1A,0032s0190,1,p	50S ribosomal protein L21
comp94061_c0_seq84	0.09	0.01	-	11.55	SapurV1A,1667s0040,1,p	Ribosomal protein L18
comp92144_c0_seq9	1.26	0.26	-	4.79	SapurV1A,0470s0210,1,p	60S ribosomal protein L2
comp77477_c0_seq1	1.32	0.41	-	3.20	SapurV1A,0023s0480,1,p	Ribosomal protein S23
comp93434_c0_seq51	6.16	1.95	-	3.16	SapurV1A,0435s0080,1,p	40S ribosomal protein S3
comp49167_c0_seq4	0.39	0.14	-	2.80	SapurV1A,0205s0160,1,p	50S ribosomal protein L13
comp88461_c0_seq2	1.21	0.46	-	2.62	SapurV1A,1377s0110,1,p	50S ribosomal protein L17
comp90935_c0_seq43	45.54	17.73	-	2.57	SapurV1A,0045s0130,1,p	40S ribosomal protein S15a
comp93434_c0_seq18	14.76	6.83	-	2.16	SapurV1A,0435s0080,1,p	40S ribosomal protein S3
comp94423_c6_seq14	6.75	3.28	-	2.06	SapurV1A,0508s0040,1,p	60S ribosomal protein L6
comp90563_c0_seq4	38.69	19.56	-	1.98	SapurV1A,0101s0170,1,p	40S ribosomal protein S7
comp94786_c1_seq23	9.32	4.82	-	1.93	SapurV1A,0061s0080,1,p	60S acidic ribosomal protein PO
comp93980_c0_seq16	6.68	3.46	-	1.93	SapurV1A,0021s0480,1,p	60S ribosomal protein L23
comp92282_c0_seq18	1.35	0.71	-	1.91	SapurV1A,0231s0170,1,p	40S ribosomal protein S6
comp94958_c2_seq16	1.72	0.93	-	1.85	SapurV1A,0037s0170,1,p	40S ribosomal protein S2
comp90935_c0_seq47	100.02	56.77	-	1.76	SapurV1A,0045s0130,1,p	40S ribosomal protein S15a
comp91986_c1_seq7	3.95	2.28	-	1.73	SapurV1A,0580s0150,1,p	40S ribosomal protein S15
comp94958_c2_seq13	2.09	1.22	-	1.72	SapurV1A,0037s0170,1,p	40S ribosomal protein S2
comp88868_c2_seq4	1.28	0.75	-	1.70	SapurV1A,0517s0140,1,p	60S ribosomal protein L34
comp86140_c0_seq8	16.27	9.58	-	1.70	SapurV1A,0661s0130,1,p	40S ribosomal protein S24
comp91836_c0_seq2	9.77	6.47	-	1.51	SapurV1A,0171s0040,1,p	50S ribosomal protein L18
comp91413_c1_seq3	1.98	1.34	-	1.48	SapurV1A,0626s0140,1,p	Ribosomal protein S6
comp92282_c0_seq19	155.47	106.79	-	1.46	SapurV1A,0231s0170,1,p	40S ribosomal protein S6
comp86140_c0_seq5	267.28	190.78	-	1.40	SapurV1A,0676s0040,1,p	40S ribosomal protein S24
comp84942_c0_seq4	283.88	207.22	-	1.37	SapurV1A,0096s0140,1,p	60S ribosomal protein L17
comp91376_c0_seq3	178.10	130.91	-	1.36	SapurV1A,0621s0100,1,p	40S ribosomal protein S5
comp94019_c0_seq1	297.57	219.36	-	1.36	SapurV1A,0416s0090,1,p	40S ribosomal protein S9
comp58229_c0_seq1	201.73	152.08	-	1.33	SapurV1A,0036s0380,1,p	40S ribosomal protein S17
comp83386_c0_seq7	3.73	2.81	-	1.33	SapurV1A,0278s0080,1,p	Ribosomal protein S21
comp93206_c0_seq1	45.61	34.82	-	1.31	SapurV1A,0136s0430,1,p	50S ribosomal protein L27

De novo assembly Contig id	Mean FPKM		Regulation	Fold Change	Salix purp V1.0 Protein ID	Annotation Description
	Control	Arsenic				
<b>CELL WALL</b>						
<i>Cellulose biosynthesis</i>						
comp92704_c0_seq29	0.05	0.72	+	13.81	SapurV1A,0828s0050,1,p	Cellulose synthase A catalytic subunit 9
comp90822_c0_seq8	4.83	2.99	-	1.62	SapurV1A,2489s0010,1,p	Cellulose synthase A, catalytic subunit
comp89528_c1_seq5	2.20	0.71	-	3.11	SapurV1A,0336s0010,1,p	Cellulose synthase catalytic subunit
comp82751_c0_seq4	1.52	1.12	-	1.36	SapurV1A,0437s0060,1,p	Cellulose synthase-like protein D
FLA						
comp91090_c1_seq10	0.29	0.06	-	4.84	SapurV1A,0258s0160,2,p	Fasciclin-like arabinogalactan protein
SPS						
comp93322_c0_seq9	0.04	0.46	+	11.28	SapurV1A,0034s0100,1,p	Sucrose phosphate synthase
comp93322_c0_seq21	0.04	0.28	+	7.94	SapurV1A,0034s0100,1,p	Sucrose phosphate synthase
comp93322_c0_seq27	0.06	0.46	+	7.30	SapurV1A,0034s0100,1,p	Sucrose phosphate synthase
<i>Callose synthesis</i>						
comp95276_c0_seq24	0.89	0.42	-	2.12	SapurV1A,0009s0010,1,p	Callose synthase
comp95276_c0_seq70	26.36	16.84	-	1.57	SapurV1A,0009s0010,1,p	Callose synthase
<i>1,3-β-glucan synthesis</i>						
comp82416_c0_seq2	2.50	1.39	-	1.80	SapurV1A,0752s0050,1,p	1,3-beta-glucan synthase
<b>GROSS COMMUNICATION</b>						
SAM						
comp93789_c1_seq28	1.12	0.52	-	2.14	SapurV1A,0589s0070,1,p	S-adenosylmethionine synthase
ACO						
comp69294_c0_seq2	3.81	0.53	-	7.16	SapurV1A,0904s0050,1,p	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
Ethylene						
comp88649_c1_seq70	0.55	0.19	-	2.87	SapurV1A,0052s0240,1,p	Ethylene receptor

A general pattern of down-regulation of ethylene related proteins was found in stems of plants exposed to arsenic. Transcripts encoding S-adenosylmethionine synthase (SAM synthase; SapurV1A.0589s0070.x.p), involved in the early steps of ethylene synthesis, were down-regulated (2.14 fold lower) (Table 3.2) as well as transcripts encoding the enzyme involved in the last step of ethylene production: aminocyclopropane carboxylate oxidase (ACO; SapurV1A.0904s0050.x.p) (7.16 fold lower) in addition to the ethylene receptor (SapurV1A.0052s0240.x.p) (2.87 fold lower). Moreover, 3 transcripts encoding an ethylene-response factor and 13 transcripts encoding an ethylene-response factor 2 were also all down-regulated in stems of treated plants (Supplementary File 1).

Salicylic acid is an important transduction signal involved in several defence mechanisms against both biotic and abiotic stresses (including metal stress). A transcript encoding salicylic acid carboxyl methyltransferase (SapurV1A.1772s0020.x.p), the enzyme involved in the last

step of salicylic acid production, was up-regulated in treated stems (2.27 fold higher) (Table 3.2).

### **3.4.2.3. Differential expression in leaves**

Gene ontology enrichment analysis indicated hydrolase and transporter activity were the most represented categories in arsenic treated leaves (Figure 3.2). The transporter activity was reflected in transcripts putatively involved in arsenic import from other organs that were differentially expressed in the leaves. Two transcripts encoding the phosphate transporter PHO1 (SapurV1A.0060s0410.x.p and SapurV1A.0139s0260.x.p) were up-regulated (1.85 and 1.38 fold higher respectively) in leaves from arsenic treated trees, while another PHO1 encoding transcript (SapurV1A.0063s0550.x.p) was down-regulated (4.18 fold lower) (Table 3.3). Similar to both root and stem differential expression, several transcripts encoding aquaporin transporters, NIP (SapurV1A.3123s0010.x.p), NIP1.1 (SapurV1A.0285s0290.x.p), TIP1 (SapurV1A.0146s0060.x.p) and SIP1 (SapurV1A.0014s1220.x.p), were up-regulated in arsenic treated plants (3.38, 1.27 and 1.45 fold higher, respectively), although a single NIP transcript was also down-regulated. A transcript encoding a boron transporter (SapurV1A.0014s0200.x.p) was also significantly up-regulated in leaves from arsenic treated plants (2.20 fold higher and in high abundance: 21.13 FPKM).

**Table 3.3. A selection of differentially expressed genes in leaves** (all genes have a posterior probability of being differentially expressed > 0.95). The full list is available in Supplementary File 1.

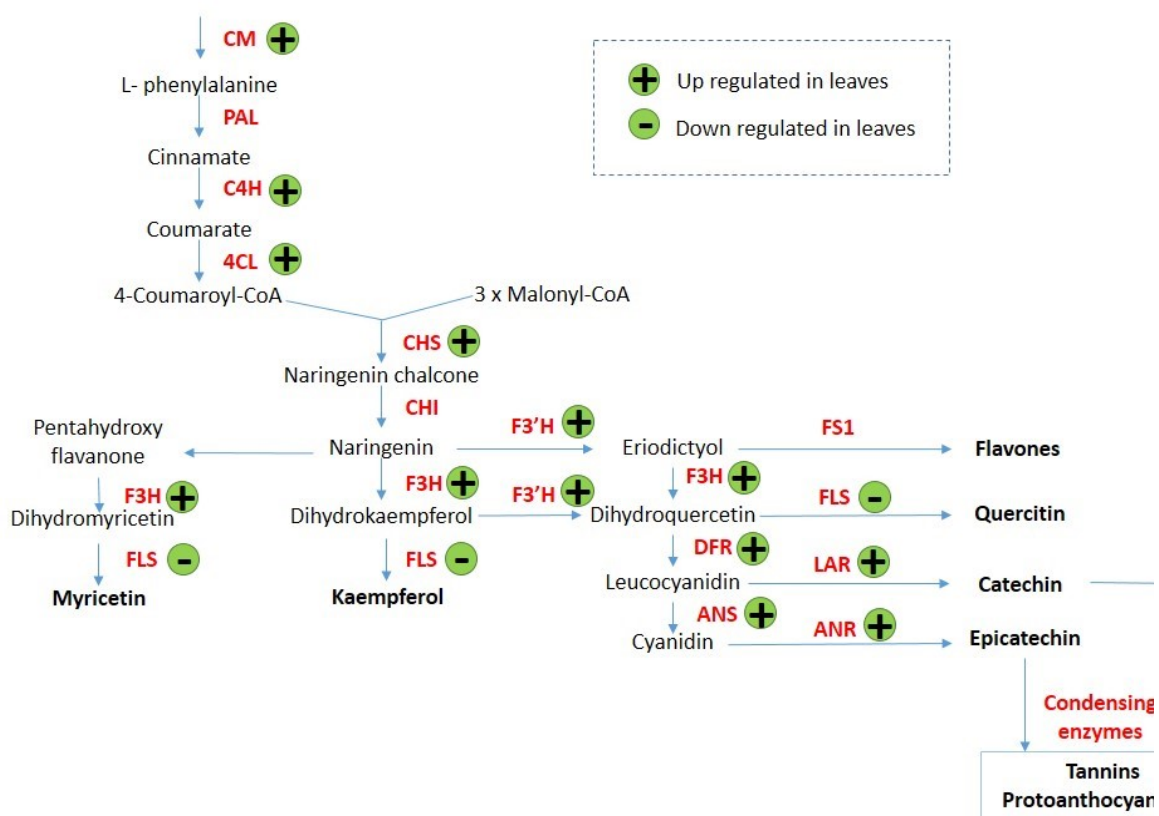
De novo assembly Contig id	Mean FPKM		Regulation	Fold Change	Salix purp V1.0 Protein ID	Annotation Description
	Control	Arsenic				
<b>TRANSPORTERS</b>						
<i>Phosphate transporters</i>						
comp94906_c0_seq32	1.33	2.46	+	1.85	SapurV1A,0060s0410,1,p	Phosphate transporter 1
comp81621_c0_seq7	37.84	52.18	+	1.38	SapurV1A,0139s0260,1,p	Sodium-dependent phosphate transporter
comp94662_c0_seq31	0.80	0.19	-	4.18	SapurV1A,0063s0550,2,p	Phosphate transporter PHO1-like protein
<i>Boron transporter</i>						
comp94619_c1_seq9	9.62	21.13	+	2.20	SapurV1A,0014s0200,2,p	Boron transporter
<i>Aquaporins</i>						
comp92063_c0_seq9	5.64	19.07	+	3.38	SapurV1A,3123s0010,1,p	Aquaporin NIP domain protein
comp76373_c0_seq4	10.56	21.73	+	2.06	SapurV1A,1058s0060,1,p	Aquaporin, SIP subfamily protein
comp94505_c0_seq2	2.97	4.33	+	1.46	SapurV1A,0014s1220,1,p	Aquaporin SIP1
comp42155_c0_seq2	5.68	7.23	+	1.27	SapurV1A,0146s0060,1,p	RINT-1/TIP-1 family protein
comp91892_c0_seq6	2.27	1.11	-	2.04	SapurV1A,0835s0150,1,p	Aquaporin, NIP subfamily protein
<i>CAX2</i>						
comp93893_c1_seq42	0.83	1.76	+	2.10	SapurV1A,1071s0020,11,p	Vacuolar cation/proton exchanger 2
comp93893_c1_seq13	2.02	3.33	+	1.65	SapurV1A,1071s0020,1,p	Vacuolar cation/proton exchanger 2
comp93893_c1_seq60	36.45	48.00	+	1.32	SapurV1A,0338s0120,1,p	Vacuolar cation/proton exchanger 2
<i>CAX1</i>						
comp89654_c0_seq26	9.65	3.65	-	2.65	SapurV1A,0001s0630,1,p	Vacuolar cation/proton exchanger
comp92964_c1_seq6	10.21	4.26	-	2.40	SapurV1A,0077s0070,1,p	Vacuolar cation/proton exchanger
<i>ABC transporters</i>						
comp91866_c4_seq18	0.77	23.45	+	30.49	SapurV1A,0258s0220,1,p	ABC transporter G family protein
comp91866_c4_seq106	0.04	1.18	+	27.73	SapurV1A,0258s0220,1,p	ABC transporter G family protein
comp91866_c4_seq86	0.02	0.49	+	26.40	SapurV1A,0258s0220,6,p	ABC transporter G family protein
comp91866_c4_seq29	0.03	0.41	+	15.99	SapurV1A,0258s0220,1,p	ABC transporter G family protein
comp87641_c0_seq2	0.04	0.69	+	15.84	SapurV1A,0053s0430,1,p	ABC-type transport system protein
comp91866_c4_seq20	0.17	2.46	+	14.83	SapurV1A,0258s0220,1,p	ABC transporter G family protein
comp95281_c0_seq19	0.10	0.86	+	8.47	SapurV1A,0398s0290,1,p	ABC transporter family protein
comp90794_c0_seq42	0.15	0.77	+	5.29	SapurV1A,0546s0020,1,p	ABC transporter family protein
comp93444_c1_seq11	0.22	1.17	+	5.27	SapurV1A,0526s0020,1,p	ABC transporter family protein
comp77006_c0_seq8	0.07	0.26	+	3.70	SapurV1A,1733s0060,1,p	ABC1-domain protein
comp91866_c4_seq52	0.10	0.33	+	3.36	SapurV1A,0298s0170,1,p	ABC transporter G family protein
comp77006_c0_seq25	0.08	0.26	+	3.29	SapurV1A,1733s0060,2,p	ABC1-domain protein
comp91866_c4_seq71	1.65	5.06	+	3.07	SapurV1A,0258s0220,6,p	ABC transporter G family protein
comp95496_c1_seq34	0.52	1.36	+	2.59	SapurV1A,0025s0120,1,p	ABC transporter family
comp84707_c0_seq1	0.15	0.35	+	2.37	SapurV1A,0068s0530,5,p	ABC transporter B family protein
comp84707_c0_seq4	0.69	1.53	+	2.21	SapurV1A,0068s0530,1,p	ABC transporter family protein
comp92192_c0_seq8	0.33	0.68	+	2.04	SapurV1A,0791s0090,4,p	ABC-type transport system protein
comp92950_c1_seq42	1.69	2.86	+	1.69	SapurV1A,1105s0100,1,p	ABC transporter family protein
comp71729_c1_seq5	36.43	52.73	+	1.45	SapurV1A,0054s0480,3,p	ABC1 family protein
comp77006_c0_seq20	5.71	7.74	+	1.36	SapurV1A,1733s0060,1,p	ABC1-domain protein
comp92950_c1_seq47	0.10	0.00	-	19.61	SapurV1A,1105s0100,1,p	ABC transporter family protein
comp93743_c0_seq2	1.14	0.67	-	1.70	SapurV1A,1255s0030,1,p	ABC-type transport system protein
comp88957_c0_seq8	1.26	0.78	-	1.61	SapurV1A,0035s0100,3,p	ABC transporter F family protein
comp87641_c0_seq9	32.79	25.02	-	1.31	SapurV1A,0053s0430,1,p	ABC-type transport system protein
<i>FCS</i>						
comp94813_c0_seq53	11.71	1.36	-	8.63	SapurV1A,0546s0010,1,p	Phytochelatin synthetase-like protein
comp91524_c1_seq18	0.56	0.25	-	2.25	SapurV1A,0323s0100,1,p	Phytochelatin synthetase-like protein



De novo assembly Contig id	Mean FPKM		Regulation	Fold Change	Salix purp V1.0 Protein ID	Annotation Description
	Control	Arsenic				
<b>PHENYLPROPANOID PATHWAY</b>						
<i>Chorismate mutase</i>						
comp84798_c0_seq4	0.07	0.33	+	4.56	SapurV1A,0372s0140,1,p	Chorismate mutase
<i>C4H</i>						
comp93666_c1_seq12	0.39	4.16	+	10.76	SapurV1A,0215s0280,1,p	P450 family 73 cinnamate 4-hydroxylase
<i>4CL</i>						
comp87029_c0_seq27	0.00	0.36	+	91.87	SapurV1A,1384s0010,1,p	4-coumarate:CoA ligase
comp87029_c0_seq11	0.03	1.98	+	75.82	SapurV1A,1384s0010,1,p	4-coumarate:CoA ligase
comp87029_c0_seq16	0.02	0.66	+	39.10	SapurV1A,1384s0010,1,p	4-coumarate:CoA ligase
comp87029_c0_seq21	0.12	3.64	+	31.44	SapurV1A,1384s0010,1,p	4-coumarate:CoA ligase
comp87029_c0_seq17	0.15	3.20	+	21.42	SapurV1A,1384s0010,1,p	4-coumarate:CoA ligase
<i>CHS</i>						
comp92924_c0_seq6	0.02	4.89	+	265.38	SapurV1A,0820s0070,1,p	Chalcone synthase
comp92851_c3_seq6	0.08	13.40	+	176.87	SapurV1A,0056s0660,1,p	Chalcone synthase
comp92851_c3_seq1	0.18	10.77	+	61.19	SapurV1A,0820s0080,1,p	Chalcone synthase
comp92924_c0_seq2	0.06	3.45	+	59.52	SapurV1A,0820s0070,1,p	Chalcone synthase
comp92924_c0_seq1	1.29	65.97	+	51.18	SapurV1A,0056s0640,1,p	Chalcone synthase
comp92851_c3_seq5	4.59	214.20	+	46.67	SapurV1A,0820s0070,1,p	Chalcone synthase
comp92924_c0_seq9	0.17	7.59	+	45.89	SapurV1A,0056s0640,1,p	Chalcone synthase
comp92924_c0_seq3	4.61	207.87	+	45.07	SapurV1A,0820s0070,1,p	Chalcone synthase
comp92851_c3_seq2	4.07	175.83	+	43.18	SapurV1A,0056s0640,1,p	Chalcone synthase
comp92851_c3_seq4	7.84	313.55	+	40.01	SapurV1A,0820s0080,1,p	Chalcone synthase
comp92924_c0_seq8	1.73	66.37	+	38.44	SapurV1A,0056s0640,1,p	Chalcone synthase
comp92924_c0_seq10	0.08	2.72	+	34.45	SapurV1A,0056s0640,1,p	Chalcone synthase
comp92924_c0_seq4	4.96	152.70	+	30.78	SapurV1A,0820s0070,1,p	Chalcone synthase
comp92924_c0_seq11	0.02	0.34	+	20.61	SapurV1A,0056s0640,1,p	Chalcone synthase
comp92924_c0_seq7	0.02	0.38	+	20.14	SapurV1A,0056s0660,1,p	Chalcone synthase
comp75793_c0_seq1	6.38	111.69	+	17.51	SapurV1A,0542s0090,1,p	Chalcone synthase
comp92924_c0_seq5	0.09	1.22	+	12.93	SapurV1A,0056s0640,1,p	Chalcone synthase
<i>CHI</i>						
comp95229_c1_seq6	0.22	2.86	+	13.17	SapurV1A,0245s0030,1,p	Chalcone-flavanone isomerase
comp93564_c1_seq7	0.70	0.33	-	2.13	SapurV1A,0130s0520,1,p	Chalcone-flavanone isomerase
<i>F3H</i>						
comp93715_c0_seq5	0.93	28.97	+	31.12	SapurV1A,1567s0010,1,p	Flavanone 3-hydroxylase
comp93715_c0_seq2	0.87	26.63	+	30.44	SapurV1A,1567s0010,1,p	Flavanone 3-hydroxylase
comp93715_c0_seq4	1.35	12.11	+	9.00	SapurV1A,1567s0010,1,p	Flavanone 3-hydroxylase
<i>FLS</i>						
comp93365_c1_seq19	1.22	0.16	-	7.54	SapurV1A,1087s0040,1,p	Flavonol synthase
comp94406_c0_seq5	18.33	12.03	-	1.52	SapurV1A,1595s0040,1,p	Flavonol synthase
comp94406_c0_seq24	19.86	14.07	-	1.41	SapurV1A,1595s0040,1,p	Flavonol synthase
<i>F3'5'H</i>						
comp46256_c0_seq1	0.04	1.03	+	25.07	SapurV1A,1430s0020,1,p	Flavonoid 3',5'-hydroxylase
<i>F3'H</i>						
comp84735_c0_seq3	1.07	11.53	+	10.81	SapurV1A,0426s0030,1,p	Flavonoid 3'-hydroxylase
comp84735_c0_seq1	0.11	1.16	+	10.64	SapurV1A,0426s0030,1,p	Flavonoid 3'-hydroxylase
<i>DFR</i>						
comp77300_c0_seq1	0.03	0.86	+	33.95	SapurV1A,0188s0360,1,p	Dihydroflavonol 4-reductase
comp77300_c0_seq2	3.03	90.20	+	29.77	SapurV1A,0006s0390,1,p	Dihydroflavonol 4-reductase
comp81865_c0_seq1	1.55	3.12	+	2.02	SapurV1A,5526s0010,1,p	Dihydroflavonol-4-reductase
comp90439_c0_seq11	1.10	0.43	-	2.57	SapurV1A,1769s0020,1,p	Dihydroflavonol-4-reductase
<i>ANR</i>						
comp85880_c0_seq3	0.02	1.15	+	46.15	SapurV1A,0028s0410,1,p	Anthocyanidin reductase ANR1-1
comp85880_c0_seq4	0.72	18.48	+	25.61	SapurV1A,0028s0410,1,p	Anthocyanidin reductase ANR1-1
comp85880_c0_seq11	7.28	135.20	+	18.58	SapurV1A,0028s0410,1,p	Anthocyanidin reductase ANR1-1
comp85880_c0_seq9	0.27	4.19	+	15.80	SapurV1A,0028s0410,1,p	Anthocyanidin reductase ANR1-1
comp85880_c0_seq6	0.10	1.59	+	15.69	SapurV1A,0028s0410,1,p	Anthocyanidin reductase ANR1-1
comp85880_c0_seq8	0.11	1.16	+	10.52	SapurV1A,0028s0410,1,p	Anthocyanidin reductase ANR1-1
<i>ANS</i>						
comp89298_c0_seq1	1.88	79.16	+	42.18	SapurV1A,0260s0310,1,p	Anthocyanidin synthase
comp89298_c0_seq2	0.16	3.30	+	20.57	SapurV1A,0260s0310,1,p	Anthocyanidin synthase
<i>LAR</i>						
comp86991_c0_seq2	0.21	2.16	+	10.30	SapurV1A,4044s0010,1,p	Leucoanthocyanidin reductase

Twenty-four transcripts encoding ABC transporter proteins were differentially expressed, twenty of which were up-regulated in leaves from treated plants (Table 3.3). Additionally, three transcripts of the vacuolar cation/proton exchanger 2 (CAX2), encoding the same two proteins differentially expressed in the roots (SapurV1A.0338s0120.x.p and SapurV1A.1071s0020.x.p), were also up-regulated in treated leaves. In contrast to this, two transcripts encoding two vacuolar cation/proton exchanger (CAX) proteins (SapurV1A.0001s0630.x.p and SapurV1A.0077s0070.x.p) were down-regulated in response to treatment. Two transcripts encoding proteins previously associated to cadmium presence were also up-regulated in treated leaves; a cadmium induced protein (SapurV1A.0051s0540.x.p) (1.85 fold higher) and a cadmium resistance protein (SapurV1A.0227s0040.x.p) (2.70 fold higher). Distinctive from root gene expression, two transcripts encoding phytochelatin synthetases proteins (SapurV1A.0323s0100.x.p and SapurV1A.0546s0010.x.p) were down-regulated (2.25 and 8.63 fold lower respectively) in leaves of arsenic treated plants. In terms of plant communication, differentially expressed genes involved in ethylene biosynthesis were more abundant in leaves of arsenic treated plants: four transcripts encoding aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO) (three proteins SapurV1A.1406s0060.x.p, SapurV1A.0666s0130.x.p and SapurV1A.0285s0010.x.p) were up-regulated in treated leaves while one (SapurV1A.0874s0100.x.p) were down-regulated.

Transcripts encoding enzymes regulating the phenylpropanoid and flavonoid pathways were differentially expressed in leaves in response to arsenic treatment. The first steps of these pathways are shared and involve chorismate mutase (SapurV1A.0372s0140.x.p), whose transcripts were up-regulated in treated leaves (4.56 fold higher) (Table 3.3 and figure 3.3).



**Figure 3.3. Proposed phenylpropanoid/flavonoid pathway expression alterations in *Salix purpurea* leaves exposed to arsenic.**

(+) up-regulation and (-) down-regulation represented within differentially expressed genes (having a posterior probability of being differentially expressed > 0.95). CM = chorismate mutase PAL = phenylalanine ammonialyase; C4H = cinnamate 4-hydroxylase; 4CL = 4-coumarate-CoA ligase; CAD = *cinnamyl alcohol dehydrogenase*; CCR = cinnamoyl CoA reductase; CHS = chalcone synthase; CHI = chalcone isomerise; F3H = flavanone 3-hydroxylase; F3'H = flavonoid 3'-hydroxylase; FS1 = flavone synthase; FLS = flavonol synthase; DFR = dihydro-flavonol 4-reductase; LAR = leucoanthocyanidin; ANS = anthocyanidin synthase; ANR = anthocyanidin reductase. Adapted from (Anderson et al., 2014; Winkel-Shirley, 2002)

A subsequent key enzyme in the pathway is phenylalanine ammonia-lyase (PAL), which was not identified as differentially expressed, but whose action generates the substrate for the next enzyme shared by these pathways; cinnamate-4-hydroxylase (SapurV1A.0215s0280.x.p), encoded by a single differentially expressed transcript here which was up-regulated (10.76 fold) in arsenic treated leaves. Five transcripts encoding coumarate CoA ligase (SapurV1A.1384s0010.x.p) were all up-regulated (between 21 and 91 fold higher) in treated leaves as were all of 15 transcripts encoding chalcone synthase (CHS). Three out of these 15 CHS transcripts were the three most abundant transcripts found in leaves (Table 3.3 and figure 3.3). The subsequent enzyme downstream of CHS, chalcone isomerase (CHI), had one down-regulated transcript and one up-regulated transcript (encoding SapurV1A.0130s0520.x.p and SapurV1A.0245s0030.x.p respectively) in response to treatment in leaves. Six transcripts encoding Flavanone-3 $\beta$ -hydroxylase (F3H) production were differentially expressed during arsenic treatment; three (encoding SapurV1A.1567s0010.x.p) were up-regulated in treated leaves and 3 were down-regulated (encoding SapurV1A.1087s0040.x.p and SapurV1A.1595s0040.x.p). Two Flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) transcripts (encoding SapurV1A.0426s0030.x.p) were also up-regulated in treated leaves (10.64 and 10.81 fold higher respectively) as well as transcript encoding Flavonoid 3'-5' hydroxylase (F3'5'H) (SapurV1A.1430s0020.x.p; 25.07 fold higher). Flavone synthase (FS1) wasn't differentially expressed due to arsenic treatment in leaves but three flavonol synthase (FLS) transcripts (encoding SapurV1A.1595s0040.x.p and SapurV1A.1087s0040.x.p) were all down-regulated in treated leaves. Three dihydroflavonol-4-reductase (DFR) transcripts (encoding SapurV1A.0188s0360.x.p, SapurV1A.0006s0390.x.p and SapurV1A.5526s0010.x.p) were up-regulated in treated leaves (33.95, 29.77 and 2.02 fold higher respectively), including one

expressed in extraordinarily high abundance in treated plants (90.20 FPKM), while one was down-regulated (SapurV1A.1769s0020.x.p) (2.57 fold lower).

Transcripts of key enzymes regulating the production of anthocyanins were found to be affected by arsenic stress. Two anthocyanidin synthase (ANS) transcripts (encoding SapurV1A.0260s0310.x.p) were up-regulated in arsenic treated leaves (respectively 42.18 and 27.57 fold higher) as was a transcript encoding leucoanthocyanidin reductase (LAR) (SapurV1A.4044s0010.x.p; 10.30 fold higher). All six transcripts encoding the final enzyme for flavan-3-ol production, anthocyanidin reductase (ANR; SapurV1A.0028s0410.x.p), were all up-regulated in leaves of arsenic treated plants. However, UDP-glycose:flavonoid-O-glycosyltransferase (UGFT) was not identified as differentially expressed.

#### **3.4.2.4. Non-plant gene expression**

A total of 67 transcripts annotated from organisms other than plants were differentially expressed in response to arsenic treatment: three transcripts in leaves, three in stems and 61 in roots (Supplementary File 1). Only six of these transcripts were up-regulated due to arsenic treatment with the vast majority down-regulated. The majority of down-regulated sequences were annotated as originating from Amoebozoa, Metazoa and fungi (including an unknown *Fomitiporia mediterranea* transcript expressed at high abundance in controls, 28.64FPKM). Of the five transcripts up-regulated in response to arsenic treatment, three were annotated from the fresh water rotifer *Philodina roseola*.

### 3.5. Discussion

#### 3.5.1. Response to arsenic and arsenic accumulation

Each of the three arsenic concentrations applied hydroponically to juvenile willow trees had significant detrimental effects on plant development, showing the extremity of arsenic toxicity is similar to that seen in other generally high-tolerance species such as *Pteris vittata* (Chinese brake), *Typha latifolia* and *Oryza sativa* (rice) (Dai et al., 2013; Dushenko et al., 1995; Sahoo et Kim, 2013). The majority of up-taken arsenic accumulated in the roots. Little or no arsenic was translocated to the aboveground tissues at the lowest concentration of 5 mg.L<sup>-1</sup> arsenic but translocation was observed in the most concentrated condition of 100 mg.L<sup>-1</sup>. These findings support previous results indicating willows have the capability to translocate arsenic from roots to above ground organs (Sylvain et al., 2016) but could be the cause or result of general plant dysfunction at this high concentration. Although arsenic was not detected at the lowest arsenic treatment, small amounts below the detection limit could potentially have been translocated from the growth solution to the leaves. The impact of the two higher arsenate concentrations, 30 mg.L<sup>-1</sup> and 100 mg.L<sup>-1</sup>, on tree development was so severe that measurements such as chlorophyll content and stomatal conductance could not be taken. In contrast to this in plants exposed to 5 mg.L<sup>-1</sup> arsenic, although the plants had an almost 50% reduction in final biomass production, chlorophyll content and stomatal conductance could be measured and were not significantly different to control plants (Fig 3.1). Given there was no variation in chlorophyll content and transpiration rate, it seems likely that the mechanisms inducing a reduction of growth between 0 and 5 mg.L<sup>-1</sup> are independent of photoassimilation rates. Due to plant survival and thus tolerance of arsenic at 5 mg.L<sup>-1</sup>, this treatment level was selected as suitable for further genetic investigations of successful tolerance mechanisms.

### 3.5.2. Differential gene expression in roots

While arsenic uptake was clearly measured in treated willows, the chemical form of intracellular arsenic is hard to qualitatively assess. In the environment, arsenic exists predominantly in two forms; arsenate ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) and arsenite ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) depending on pH, redox conditions and potential ligands (Tripathi et al., 2007; Zhao et al., 2009a). At the soil/root interface, arsenate can enter roots using phosphate transporters, while arsenite can be taken up by aquaporins (Bhattacharjee et al., 2008). As arsenate was added to the system, it is perhaps unsurprising that the phosphate transporter PHO1 was upregulated. Quaghebuer *et al.* (2004) suggested that uptake inhibition (through the *down*-regulation of phosphate transporters) is a key mechanism for successful tolerance. This was demonstrated by Meharg and Macnair (1992) in *Holcus lanatus*, an arsenic tolerant perennial grass, which inhibit phosphate transport by down-regulation of associated genes, simultaneously reducing arsenate uptake and damage to tissues. If this paradigm of arsenic exclusion tolerance is accepted, then *Salix purpurea* would not be considered tolerant as uptake occurs. Thus, *Salix pupurea* not being an exclusion tolerance plant could explain increases in arsenic toxicity endurance in its tissues, through a necessity for a more effective detoxification than exclusion tolerant plants.

Aquaporins, in particular NIP1.1, were also differentially expressed in response to arsenic treatment, suggesting arsenate had been reduced to arsenite and was present in the roots. NIP1.1 has previously been reported as mediating arsenite entry into roots (Kamiya et al., 2009) raising the possibility that arsenate reduction could have occurred prior to its entry into the plant. On the other hand, as described by Bienert (2008), NIP1.1 can function as a bidirectional channel for both arsenite uptake and export (Zhao et al., 2010), so could also be the result of increased arsenite extrusion and consequently improved tolerance within willow. Another aquaporin

TIP2.1 was down-regulated in treated roots, suggesting that NIP1.1 transcription response is specific to arsenic treatment as opposed to generalized stress aquaporin upregulation. As arsenite is a structural analogue of silicic acid, arsenite could also enter root epidermal cells using silicon transporter Lsi1 (low silicon 1), a homolog of the NIP2.1 aquaglyceroporin. Ma et al. (2008) showed Lsi1 to be the major entry point of arsenite and methylated arsenite in the roots of rice. Silicon transporter expression wasn't, however, differentially expressed in roots here, suggesting either a potential point of divergence in tolerance strategies between the two crops or that the transport activity is not related to transcript abundance.

Reduction of arsenate to arsenite shortly following uptake into root cells could occur via either a non-enzymatic reaction with glutathione (GSH) or by an arsenate reductase (Bleeker et al., 2006; Dhankher et al., 2002; Duan et al., 2005; Ellis et al., 2006) such as a tyrosine phosphatase (Mukhopadhyay and Rosen, 2002). Interestingly, one tyrosine phosphatase was up-regulated in treated plants (SapurV1A.0142s0310.x.p) while another was down-regulated (SapurV1A.0243s0430.x.p). This observation gives more weight to the hypothesis that SapurV1A.0142s0310.x.p expressed in treated plants (highly divergent from SapurV1A.0243s0430.x.p) could be involved in arsenate reduction to arsenite. Genes involved in GSH production, the non-enzymatic reduction pathway, were up-regulated in response of arsenic treatment, allowing the potential for both mechanisms of arsenate reduction to be considered. Especially given that glutathione synthetase (GS) was one the most abundant of all transcripts in treated plants.

One of the potential fates of arsenite, if uptaken directly (as opposed to partitioning after internal reduction of arsenate), could be extrusion or efflux back into the soil. The principal mechanism



for arsenite efflux is thought, again, to be the bidirectional channel Lsi1 (Zhao et al., 2010). This phenomenon has been reported in several plants species ( Xu et al., 2007; Zhang et al., 2009) suggesting that arsenite extrusion could be a general, and understandable, arsenic detoxification process in plants. As *Salix* potentially doesn't use Lsi1 as a means of detoxification, tolerance could rely on other extrusion actors such as the previously described NIP aquaporin (Bienert et al., 2008) or on more efficient sequestration mechanisms relying on vacuolar transporters such as ABC or CAX.

Methylation of arsenic often occurs to facilitate the detoxification process (Schmöger et al., 2000; Verbruggen et al., 2009) and has been reported in numerous tolerant plants species (Williams et al., 2005; Wu et al., 2002). Ma et al. (2008) suggested that methylated forms of arsenic could be taken up by Lsi2, a silicon transporter and transferred through xylem to aboveground tissues. Up-regulation of S-adenosyl methionine (SAM)-dependent methyltransferase in treated roots, a mandatory enzyme for the methylation, could therefore indicate a methylation detoxification mechanism. Although numerous SAM-dependent methyltransferase transcripts were significantly upregulated, a roughly equal number were downregulated, demonstrating the complexity of these regulatory processes.

In the cytosol of root cells, arsenite toxicity originates from reacting with sulfhydryl groups to disrupt cell function. In order to reduce this reactivity, arsenite is complexed to glutathione or phytochelatins (PCs) (Pickering et al., 2000). The transient complexes have low stability and need to be transferred to the vacuole where acidic conditions improve stability (Schmöger et al., 2000). Numerous members of the ATP-binding cassette (ABC) transporter family, potentially transporting arsenite-PC into vacuoles (Song et al., 2010, 2014) were upregulated due to

treatment, however, a greater number were downregulated (Table 3.1). Future research needs to establish functional differences between these important ABC transporters before this complex expression pattern can be resolved. CAX 2, a transporter involved in cadmium transfer to vacuoles (Verbruggen et al., 2009), has yet to be directly implicated in arsenite-PC transport. Interestingly, CAX2 expression was highly increased in treated plants, indicating a potential role in arsenic vacuolar loading. This idea has been considered by Salt and Rauser (1995), who suggested that arsenite-PC should be taken up in the same manner as cadmium-PC. Unsurprisingly, phytochelatin production itself is considered a likely critical factor of detoxification and endurance of metal contamination in many plants species (Arnetoli et al., 2008; Hartley-Whitaker et al., 2001; Verbruggen et al., 2009).  $\gamma$  Glutamyl cysteine synthetase ( $\gamma$ ECS), which is thought to be the limiting enzyme in phytochelatin production (Arisi et al., 1997; Dhankher, 2005), was not differentially expressed in roots here. Regulation of PC biosynthesis begins, however, with the production of glutathione (GSH). Unlike  $\gamma$ ECS, glutathione synthase (GS) was clearly up-regulated in roots of arsenic treated trees, as was phytochelatin synthetase itself. Interestingly, previous work in *Salix* exposed to arsenic suggested PCs may not be involved in heavy metal tolerance in *Salix* species (Landberg and Greger, 2004). Our results contradict this and suggest that PC complexing is a mechanism used in *Salix* for arsenic tolerance.

Although hormone responses to treatment are difficult to observe at a transcript level due to the complexity of communication regulatory networks, ACC synthase was upregulated, presenting the potential for ethylene as a means of communication between the roots and stems in response to arsenic exposure.

### 3.5.3. Differential gene expression in stems

Gene ontology enrichment from the stem tissue indicated a global reduction in cellular processes due to arsenic treatment. Terms including nucleic acid binding, RNA binding, translation and ribosome protein panther terms were reduced in stems of arsenic treated plants. Aligned with this, downregulation of ribosome expression was a stark pattern in treated stems: four R40s proteins had strongly reduced abundance encoded by the ten most abundant transcripts in control stems (Table 3.2). Interestingly, Byrne et al. (2009) linked a lower ribosome production, potentially associated to a lower rate of protein production, to a reduced growth. This could be expected given the observed reduction in biomass yield. Additionally, while the up-regulation of ubiquitin ligase activity Panther term due to treatment could represent post-translational protein modification relating to most cellular processes, there is the potential that, in the context of arsenic treatment, this could represent a toxicity coping/amino acid scavenging mechanism through general increased activity of the ubiquitin proteasome degradation pathway (Figure 3.2).

Although no arsenic was observed in stems, detection limits are high ( $>5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) in relation to what could be physiologically relevant levels and several genes were differentially expressed in stems which indicate a likelihood that there may be arsenic in stems below detection limit. Silicon transporters, such as Lsi1, have the capacity to be key xylem loading transporters of MMA (mono-methyl arsenic) and DMA (dimethyl arsenic) for transport to above-ground tissues of plants (Li et al., 2009; Raab et al., 2007) (Figure 3.4). Lsi1 was upregulated in the stems of arsenic treated plants. Additionally, as S-Adenosyl-Methyltransferase (SAM) was upregulated in roots (thought to be involved in methylation (Zhao et al., 2009a)), such that xylem loading and transport of methylated arsenic to above-ground tissues is a strong endurance mechanism

candidate in *Salix* grown under arsenic hydroponic conditions. Although the observed variation in gene expression could be a response to secondary effects of arsenic treatment, such as desiccation or oxidative stress, transport above-ground would be expected as based upon high arsenic concentration applications (30 mg.L<sup>-1</sup> and 100 mg.L<sup>-1</sup>) which, while killing the plants, did contain transported arsenic in above-ground tissues. This is further supported by the up-regulation of the vacuolar transporter CAX2 in response of arsenic treatment, similar to treated roots. The CAX2 protein encoded by the transcript expressed in stems (SapurV1A.0338s0120.x.p) was the same as one of those upregulated in roots (the roots also upregulated a second putative CAX2 protein; SapurV1A.1071s0020.x.p).

Reduced biomass yield of treated plants is also potentially reflected in, or a consequence of, the lower abundance of cellulose synthase. Surprisingly, sucrose phosphate synthase (SPS), important for carbon partitioning and in cellulose biosynthesis (Li et al., 2013), were up-regulated in treated plants. This could represent an increase in mobilization of stored glucose in starch due to increased energy or carbon demand, for example to supplement a reduced rate of photosynthesis due to leaf damage in arsenic treated plants (although chlorophyll content and stomatal conductance were unchanged in response to treatment). Another expression pattern which could be associated with the reduced biomass yield could be the lower expression of Fasciclin-like arabinogalactan (FLA) transcripts in treated stems which have been shown to contribute to plant stem development and cellulose deposition (MacMillan et al., 2010). Two enzymes involved in callose synthesis were down-regulated during arsenic exposure. This is surprising if *Salix* is indeed not employing an exclusion tolerance strategy as callose synthesis has been reported as an early defence reaction to metal contamination (Małachowska and Gnida,

2015) with deposition hypothesized as a mechanism to reduce metal ion entry via diffusion into cells.

A reduction of expression in genes relating to ethylene signalling in stems of treated plants was distinct from roots. Ethylene is usually produced in substantial amounts in the stem after 6 weeks post-establishment in regular growth conditions, therefore a reduction in treated plants could be caused by a delay in development of treated plants (Andersson-Gunnerås et al., 2003; Morgan and Drew, 1997). Interestingly, transcription of genes from the salicylic acid (SA) biosynthesis pathway, widely considered as biotic stress response specific in willow (Loake and Grant, 2007), were substantially up-regulated in response to arsenic treatment. This is in agreement with research conducted in *Thlaspi* sp. , a nickel (Ni) hyperaccumulator, that demonstrated a role for SA signalling in Ni tolerance (Freeman et al., 2005).

#### **3.5.4. Differential gene expression in leaves**

Transporter activity was the second most represented category in gene ontology enrichment (Panther terms) found in leaves of arsenic treated plants (Figure 3.2). Up-regulation of the transporters due to arsenic treatment might signify the presence of arsenic in leaves (Figure 3.4). As hypothesized with regard to stems, several differentially expressed genes in leaves could suggest the presence of a small concentration of arsenic. Contrary to this hypothesis, following the measured entry of arsenic into root cells from soil, signals could have been sent to aboveground tissue in order to prepare organs for potential arsenic toxicity provoking gene expression patterns indicative of direct arsenic tolerance mechanisms in leaves. Differentially expressed genes in leaves similar to those of stems and/or roots included the phosphate transporter PHO1. While distinct PHO1 proteins were up and down-regulated due to treatment

in leaves, the same protein up-regulated in roots was down-regulated in leaves. Although, as stated, the phosphate is a structural analogue of arsenate the potential interactions driving expression here become complex as the higher transcription of PHO1 in roots could be the consequence of phosphate deprivation due to arsenate competition with this physiologically essential compound. Aquaporins are seemingly involved in arsenic response in leaves with NIP, NIP1.1, TIP1 and SIP1 up-regulated. Similar expression of NIP1.1 in roots and leaves gives some additional weight to the hypothesis of direct arsenite transport. In contrast to TIP2, down-regulated in treated roots, TIP1 was upregulated. As TIP family proteins are not considered arsenic transporters (Zhao et al., 2009a), further functional investigation into their potential roles may be fruitful. An unexpected result in leaves was the up-regulation a boron transporter (SapurV1A.0014s0200.x.p) in response to arsenic treatment. Boron and arsenic belong to the same chemical family, so this may reflect a lack of the specificity indicated from annotation. As observed in roots and stems, the vacuolar transporter CAX2 were also differentially expressed and up-regulated in leaves of arsenic treated plants. In contrast to this, CAX1 expression was down-regulated. This again adds more weight to the hypothesis that CAX2 has arsenic transport capacity in addition to cadmium and also potentially highlights a point of distinction between CAX1 and CAX2 (both of which have are reported as cadmium vacuolar transporters) (Baliardini et al., 2015; M. Zhang et al., 2016).

Genes within the phenylpropanoid pathway and, markedly, those driving flavonoid biosynthesis, were upregulated in leaves of arsenic treated plants. Chalcone synthase (CHS) transcripts were the most abundant of all the differential expression in leaves; moreover, expression of downstream genes within flavonoid biosynthesis which lead specifically to proanthocyanidin (tannins) production were up-regulated due to arsenic treatment. This suggests

a potential role for tannins in arsenic metabolism, or as a secondary consequence of arsenic treatment, such as oxidative stress mitigation, in *Salix purpurea*. It has been hypothesized that flavonoids could have a role in metal chelation (Winkel-Shirley, 2002) and previous research has described chelating power of tannins with copper, zinc, cobalt and aluminium (Kainja et al., 1998; McDonald et al., 1996). Davis et al. (2001) also proposed that in hyperaccumulators, tannins may function as metal-binding compounds, allowing for some potential overlap of metal stress tolerance mechanisms between hyperaccumulators and *Salix purpurea*. This high level of upregulation of genes towards tannin biosynthesis is interesting in the context of recent research published by Gonzalez et al. (2015) that suggested cross-tolerance of contamination treated *Salix* against biotic stress in the form of a herbivorous arthropod. The agency of this cross-tolerance was hypothesized as tannin upregulation due to organic hydrocarbon contamination in soil, as tannins are recognized as highly unpalatable to many herbivorous arthropods (Gonzalez et al., 2015). As the similar response of tannin upregulation in leaves here was induced by arsenic contamination, it seems likely to be in response to secondary toxicity conditions in the plant, such as oxidative stress which would be commonly induced by both contaminants, as opposed to a direct response to the presence of arsenic in the leaves. Although treated plants had reduced biomass yields within this hydroponic system, willows cultivated in the field at low concentrations of trace elements can often maintain relatively high biomass yields. One mechanism potentially explaining this could be such cross-tolerance mechanisms whereby increased leaf tannin concentrations confer an advantage by reducing arthropod predation in field conditions (which would not be observed within a hydroponic cultivation system).

### 3.5.5. Differential gene expression of foreign organisms associated with *Salix* tissue

Differentially expressed transcripts from putative non-plant organisms were observed in the assembled de novo transcriptome, which was possible due to the unconstrained annotation procedure and important as to assess as such gene expression can both technically (Brereton et al. 2016) and biologically (Gonzalez et al., 2015) confound transcriptome data analysis. Although “foreign” differential gene expression was observed, the numbers of identified contigs (67) were minor and we, therefore, do not consider the results of the plant gene expression to likely be confounded through metatranscriptomic or microbiome interactions. Moreover, although the presence of the species (or close relatives) that these transcripts were best annotated from was not directly confirmed, the overall expression pattern observed might be insightful regarding the molecular processes in the system. Within these sequences, amoeba, fungi, metazoa and proteobacteria expression was identified (most represented within roots, 91%) and was almost comprehensively downregulated in treated plants. Two of the most represented genera in these transcripts from roots were *Dictyostelium* (a slime mold) and *Acanthamoeba*, both bacterivores common to fresh water and soil, and perhaps unsurprising inhabitants of a hydroponic system. Whilst these organisms were presumably not arsenic tolerant, resulting in the down-regulation of their differentially expressed genes, three differentially expressed genes annotated as coming from *Philodina roseola* (isolated from roots and stems) were all upregulated in arsenic treated plants. Intriguingly *P. roseola* has been shown to decrease cadmium metal presence by 76% at similar concentrations (slightly higher 10ug/ml) within investigations of the species as an urban wastewater bioremediator (Rehman et al., 2008). Another one of very few upregulated transcripts, from the *Bacteroides* sp. 2\_1\_33B, was a putative phosphatase family protein. Many microbial communities have abilities for arsenic



tolerance and Tiwari et al. (2016) recently discovered an arsenic resistant endophytic bacteria from *Pteris vittata* roots capable of arsenate reduction. Bacterial arsenate reduction using phosphatase is well characterized (Zegers et al., 2001) and the up-regulated phosphatase in arsenic treated *Salix* roots may indeed represent a similar arsenic tolerant endophyte, although bacterial isolation and assessment of arsenate reduction activity is needed to confirm this hypothesis.

### **3.6. Conclusion**

While not considered as a metal hyperaccumulating species, *Salix purpurea* appears to be able to react to arsenic using molecular mechanisms usually observed in tolerant hyperaccumulator species as opposed to utilizing contaminant exclusion tolerance strategies. Based on the results reported here, we also suggest that willows respond to arsenic contamination by inducing the biosynthesis of phenylpropanoids that may culminate with the increased production of tannins. This non-exclusion physiological response to metal contamination, coupled with high biomass yields, makes willow sp. an attractive option for contaminated site phytoremediation and, importantly, selection towards improved arsenic accumulation capabilities.

### **3.7. Acknowledgements**

We thank the Genome Quebec Innovation Centre for support and Calcul Quebec for computing resources. The project was funded by the GenoRem Project (Genome Canada and Genome Québec) as well as BioFuelNet Canada and NCE (Networks of Center of Excellence). We also would like to thank Hydro Quebec, the CRIBIQ and MITACS for their great support during this project.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Supplementary File 1 Differentially expressed sequences and annotation (excel tab available on demand)

### **3.8. Synthèse du chapitre 3**

Les données apportées dans ce chapitre valident l'hypothèse émise au départ selon laquelle *S. purpurea* est capable de tolérer la présence d'arsenic dans son substrat de culture. Les mesures effectuées ont montré que les saules ont supporté jusqu'à au moins 5mg.kg<sup>-1</sup> d'arsenic sans symptôme significatif, tout en accumulant dans leurs tissus. Les comparaisons de transcriptomes ont permis d'obtenir la liste des gènes dont l'expression est spécifiquement induite par l'arsenic. Au sein de ces transcrits, plusieurs groupes de fonctions avaient déjà été décrits dans la littérature (transporteurs PHO1, Lsi1, notamment) alors que d'autres n'avaient pas encore été liés à la réaction à l'arsenic (CAX2 ou la voie de production des tannins).

La pertinence de ces données pourrait être transférable à la sélection de plantes d'intérêt basée sur la présence ou l'absence de certains gènes dans leur ADN. Ces résultats pourraient également être utilisés dans un contexte de création d'organismes génétiquement modifiés pour améliorer leur capacité d'accumulation, par exemple.

## **Chapitre 4 : Discussion générale**

### **4.1. Rappel de la problématique**

La contamination à l'arsenic représente une problématique d'ampleur mondiale (Mandal et Suzuki 2002). La majorité des sites présentant des concentrations élevées d'arsenic résultent de l'activité humaine, comme cela peut être observé sur d'anciens sites miniers, des raffineries ou des espaces de stockages de bois traités à l'arséniate de cuivre chromaté (ACC), comme dans ce projet.

Du fait de sa haute toxicité, la décontamination du grand nombre de sites contaminés à l'arsenic nécessite une solution durable, facilement accessible et applicable n'importe où sur Terre. Le recours aux techniques de bioremédiation connues représente une alternative écologique aux moyens de traitement traditionnels généralement envisagés (Wang et Xiao, 2013). La phytoremédiation est une option prometteuse, aussi bien pour la réhabilitation de sites pollués aux contaminants organiques qu'aux métaux (Ali et al., 2013). Cependant, bien que plus économique et soucieuse de l'environnement, cette approche est souvent mise de côté à cause de sa moindre efficacité (Wan, Lei, et Chen 2015). En effet, alors que des techniques d'excavation permettent de retirer la pollution d'un site rapidement (pour le traiter ailleurs), les approches de bioremédiation *in situ* nécessitent plusieurs années pour se mettre en place et diminuer la présence de contaminants dans le sol. En somme, un des freins à l'utilisation de la phytoremédiation réside dans la durée nécessaire à son efficacité. De plus, certaines questions demandent encore à être résolues par la recherche.

Des travaux comme ceux effectués dans le cadre de ce projet doctoral ont pour but de faire avancer les connaissances relatives au domaine de la phytoremédiation afin d'optimiser les techniques utilisées. Le choix d'espèces candidates est un paramètre primordial duquel découle le résultat des procédures de réhabilitation d'un site. Ainsi, connaître quelles espèces végétales présentent les caractères de tolérance et d'accumulation en fonction du type de pollution est une étape nécessaire au bon fonctionnement du processus. Face à ce type de problématique, deux types d'approches sont envisageables : l'approche appliquée, qui compare les performances de plusieurs espèces candidates sur un site dont le profil de contamination est connu, ou une approche moléculaire, plus fondamentale, qui vise à sélectionner des espèces candidates en fonction de la présence ou de l'absence de traits génétiques d'intérêt (tolérance accrue, accumulation, meilleure production de biomasse, etc.) au sein de leur ADN. Cependant, ce genre de tri nécessite au préalable de connaître quels sont les gènes liés à l'expression de ces paramètres recherchés. C'est là qu'interviennent des travaux visant à comparer les niveaux d'expressions de l'ensemble des gènes d'une plante en réponse à la présence de l'arsenic. La comparaison des niveaux d'expression des transcrits entre un plant cultivé en présence d'arsenic et un autre cultivé en conditions saines permet d'obtenir ce portrait des gènes potentiellement pertinents pour la phytoremédiation de l'arsenic.

#### **4.2. Rappel des objectifs**

Dans un premier temps, la comparaison des réponses physiologiques ainsi que les capacités d'accumulation de quatre espèces végétales d'intérêt (saule, moutarde, luzerne et fétuque) sur un site contaminé aux polluants organiques et inorganiques avait pour but d'établir leur pertinence respective dans un contexte de phytoremédiation. En parallèle les effets d'un traitement de fertilisation à forte teneur en azote ont été étudiés en vue d'aider l'établissement

végétale.. Durant la seconde partie du projet, l'objectif était d'approfondir les connaissances génétiques liées au métabolisme et à l'accumulation de l'arsenic chez le saule *Salix purpurea*. Dans une expérience où tous les paramètres sont contrôlés, l'étude des variations d'expression de l'ensemble des gènes en présence ou en absence d'arsenic a permis d'obtenir une liste des transcrits produits en réponse au métal polluant spécifiquement. Ces niveaux de transcrits, par la suite associés aux gènes correspondants, donnent une image précise de l'ensemble des facteurs génétiques potentiellement impliqués dans l'accumulation et la métabolisation de l'arsenic. Alors que l'expérience *in situ* ne permet pas d'isoler l'effet de l'arsenic uniquement afin d'en observer ses répercussions sur le métabolisme des plantes, l'étude en hydroponie ne reflète qu'une vision partielle des conditions de croissance d'un site contaminé. Ainsi, la complémentarité de ces approches semble nécessaire afin d'obtenir une vision plus intégrale des effets de l'arsenic sur les plantes jumelées à un profil de réactions moléculaires propres à la présence de ce métalloïde toxique dans les tissus végétaux.

### **4.3. Retour sur les hypothèses et faits saillants**

#### **4.3.1. Expérience sur site multicontaminé**

L'expérience réalisée sur la cour d'entreposage de poteaux traités au ACC à Drummondville (QC, Canada) visait à démontrer que les plantes sélectionnées étaient capables de tolérer et d'accumuler les polluants du site sur plusieurs saisons de culture. La caractérisation des échantillons de sol prélevés montrait des niveaux supérieurs aux limites prescrites par le guide d'intervention en site contaminé du Québec (Beaulieu 2019) concernant notamment le cuivre et l'arsenic, ainsi que des concentrations importantes de PCP, entre autres polluants organiques. Comme envisagé, les quatre espèces choisies (saule, moutarde, luzerne, fétuque) ont montré de

bonnes capacités d'établissement sur le site expérimental. L'ajout de fertilisant complet à forte teneur en azote, quant à lui, n'a pas apporté les résultats espérés. Cependant, bien qu'ayant eu peu d'effets significatifs positifs, il pourrait représenter une pratique pertinente à plusieurs niveaux. D'un côté, l'apport en azote a augmenté significativement la synthèse chlorophyllienne et a donc potentiellement aidé à l'établissement des plantes. Par ailleurs, il est connu que l'ajout d'azote acidifie le sol (Czarnecki et Düring 2014), ce qui pourrait contribuer aux réactions chimiques de réduction dans la rhizosphère. Il semble pertinent d'approfondir les recherches afin de documenter plus précisément les effets d'un fertilisant complet à forte teneur en azote sur les capacités de bioremédiation des communautés microbiennes associées aux racines de plantes spécifiquement. Dans l'expérience réalisée sur le terrain, pour des raisons budgétaires, notamment, nous avons dû nous restreindre à ne tester que les niveaux de contaminations accumulées dans les tissus aériens des plantes ayant reçu du fertilisant complet à forte teneur en azote. Une comparaison des capacités d'accumulation dans les tissus racinaires et aériens, avec ou sans intrant, permettrait de valider la pertinence d'un tel traitement.

Par ailleurs, il semble important d'envisager la comparaison des effets de l'ajout d'autres types de fertilisant. Différentes concentrations de phosphate, notamment, pourraient être envisagées dans une optique d'accumulation d'arsenic. Étonnamment, les conclusions sur ce sujet divergent. En effet, d'un côté, des travaux sur l'orge (Lee 1982), des graminées (*Holcus lanatus* (Meharg et Macnair, 1992)) ou encore l'hyperaccumulateur *Pteris vittata* (Wang et al., 2002) suggèrent que l'accumulation de l'arsenic serait favorisée par une carence en phosphate. À l'inverse, les travaux réalisés par Liu et al. (2004) sur le riz rapportent une baisse des capacités de translocation de l'arsenic vers les parties aériennes de leurs plantes privées de phosphate. Les travaux de Chen et al. (2002) et de Niazi et al. (2017), quant à eux, font mention d'une

augmentation significative des capacités d'extraction et de translocation de l'arsenic quand les plantes reçoivent un supplément de phosphate. La pertinence d'un traitement à base de phosphate n'est donc pas écartée, mais de nouveaux travaux semblent nécessaires afin d'apporter un point de vue supplémentaire à ces résultats discordants.

Dans un autre ordre d'idées, les analyses réalisées sur des échantillons de sol du site à l'étude, prélevés avant l'expérience et après cinq ans d'établissement végétal, ont montré des diminutions importantes des concentrations en arsenic, en cuivre, en zinc et en PCP. Aussi, bien que les quantités de polluants inorganiques initialement visés (As, Cr, Cu) n'aient pas été retrouvées dans les tissus aériens, il semble que les candidats testés les aient accumulés dans leurs tissus racinaires ou à proximité de leurs racines.

Un des résultats les plus inattendus a été la présence de dioxines et de furanes dans toutes les plantes cultivées sur le site. Ce résultat n'avait jamais été mentionné dans la littérature, probablement à cause des coûts prohibitifs liés aux analyses de concentration de ces composés organiques. Ces résultats soulèvent cependant le point préoccupant de la toxicité potentielle de toutes les plantes cultivées sur des sites contaminés, les dioxines et les furanes étant des polluants organiques hautement toxiques.

#### **4.3.2. Expérience en milieu contrôlé**

Le second objectif visait à décrire les modifications sur le transcriptome directement imputables à la présence spécifique de l'arsenic dans le substrat de culture. Conformément à ce que nous avons envisagé en hypothèses, les saules ont été capables de tolérer l'arsenic et de l'accumuler. Aussi, les plantes exposées à  $5 \text{ mg.kg}^{-1}$  ont accumulé jusqu'à  $183 \text{ mg.kg}^{-1}$  dans leurs racines, tout en ne présentant que des symptômes légers de stress liés à la présence du polluant. À

l'inverse, les plantes exposées à 30 et 100 mg.kg<sup>-1</sup> ont accumulé plus d'arsenic, respectivement 1731 mg.kg<sup>-1</sup> et 1015 mg.kg<sup>-1</sup> dans leurs racines et transféré respectivement 32 mg.kg<sup>-1</sup> et 84,1 mg.kg<sup>-1</sup> dans leurs parties aériennes. Cependant, les plantes exposées à ces concentrations plus élevées ont rapidement développé des symptômes sévères d'intoxication à l'arsenic. Sur la base de ces résultats, nous supposons que les échantillons exposés à 5 mg.kg<sup>-1</sup> ont mis en place des mécanismes d'accumulation et de tolérance vis-à-vis de l'arsenic et sont techniquement capables de transférer l'arsenic dans leurs organes aériens. La mise en place de ces mécanismes est observable en quantifiant les variations d'expression de certains groupes de gènes. Probablement qu'à des niveaux supérieurs d'arsenic, ces mécanismes ne suffisent plus à protéger la plante. La comparaison des transcriptomes issus de plantes exposées avec des plantes cultivées en milieux non contaminés a généré une liste des gènes dont l'expression est modifiée par la présence d'arsenic.

Ainsi, la comparaison des différences d'expressions significatives a permis de produire un inventaire des gènes potentiellement impliqués dans le métabolisme de l'arsenic, depuis son entrée par les racines jusqu'à son accumulation dans les vacuoles cellulaires. Les résultats avancés par l'étude transcriptomique décrite dans le chapitre 3 semblent en accord avec ce qui a déjà été décrit dans la littérature concernant la prise en charge de l'arsenate (AsV) au niveau racinaire par les transporteurs de phosphate PHO1 (Meharg et Macnair 1992; Quaghebeur et Rengel 2004). Le transport membranaire de l'arsenite (AsIII) serait, quant à lui, géré par l'aquaporine NIP1 (Kamiya et al., 2009) ou le transporteur de silicone Lsi1 (Li et al., 2009). Une fois dans les cellules racinaires, l'arsenate peut être réduit en arsenite puis transporté par des transporteurs de type ABC (Briat, 2010) situés dans les membranes vacuolaires. Selon nos résultats, qui mériteraient d'être validés par une étude enzymatique spécifique, la prise en charge



de l'arsenite par des phytochelatines puis le stockage du complexe au niveau vacuolaire pourrait être réalisé par le transporteur CAX2. Les variations d'expressions des gènes associés aux mêmes voies de transports ont été observées dans les parties aériennes de la plante. Cela supporte l'hypothèse d'un potentiel pour la translocation des composés arséniés vers les parties récoltables de la plante comme l'illustre la Figure 4.1.

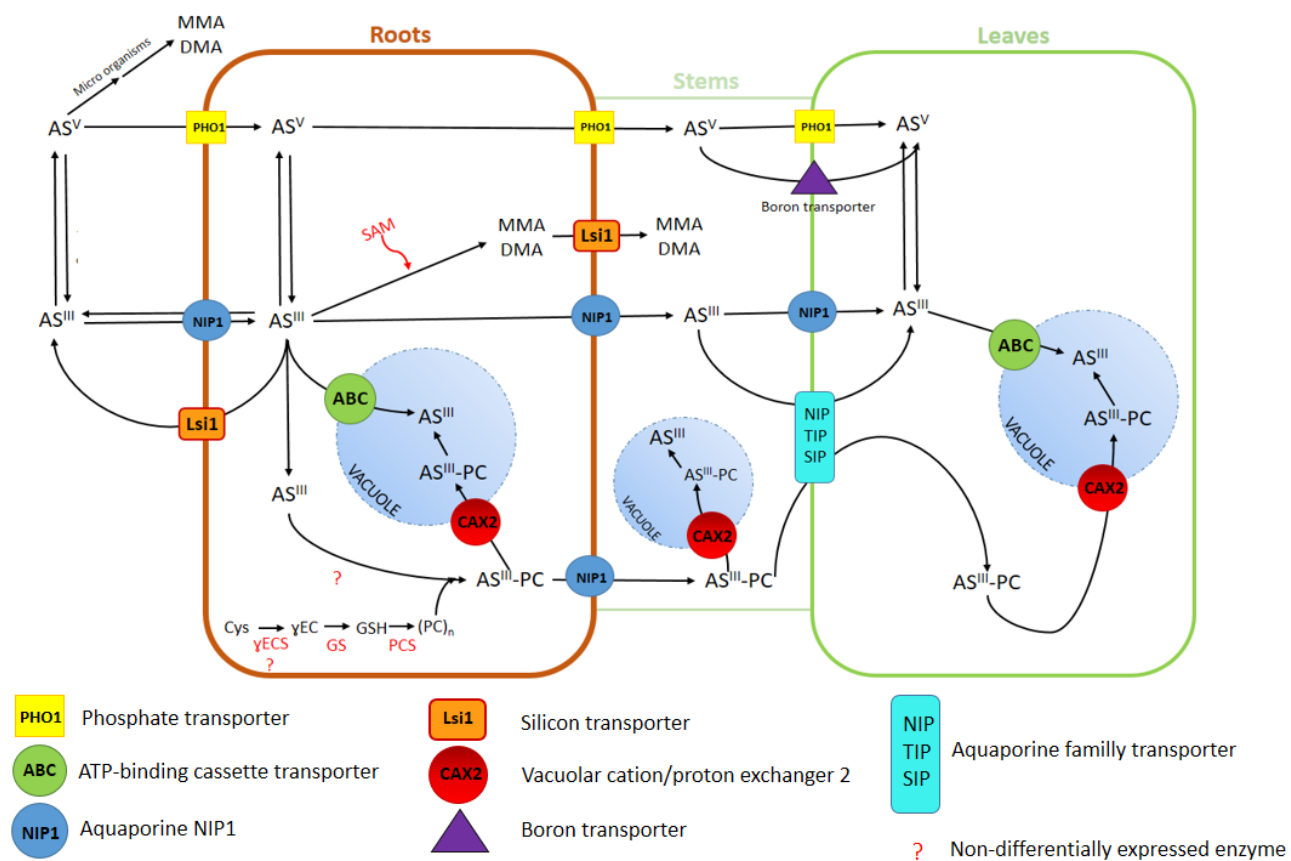


Figure 4.1. Carte du trajet proposé de l'arsenic dans les tissus de *Salix purpurea* basée sur les résultats de l'analyse transcriptomique (Yanitch et al. 2017).

De plus, les analyses transcriptomiques ont révélé des variations d'expressions dans certains groupes de gènes qui n'avaient pas encore été associés à une réponse vis-à-vis de l'arsenic dans la littérature. Alors que certains résultats sont novateurs en ce qui a trait au saule plus

particulièrement, d'autres n'avaient encore jamais été révélés pour aucune espèce végétale comme cela est le cas pour le transporteur CAX2. À ce titre, une des réactions métaboliques à la présence de métal toxique bien décrite chez plusieurs espèces végétales est la synthèse de phytochélatine (Schmöger et al., 2000). Cependant, elle n'avait pas encore été observée chez *S. purpurea*. Dans les racines des saules exposés pendant l'expérience, la surexpression des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des phytochélatines indique que *S. purpurea* pourrait aussi avoir recours à ce mécanisme de complexation pour diminuer la toxicité de l'arsenic dans ses cellules.

Un autre résultat novateur soulevé par cette étude est l'observation d'une surexpression des gènes associés au transporteur CAX2 dans l'ensemble des parties des saules exposés à 5 mg.kg<sup>-1</sup>. CAX2 est décrit dans la littérature comme une protéine antiport impliquée dans le transport du cadmium vers les vacuoles (Zhang et al., 2016). Les niveaux de surexpressions observés à la fois dans les racines, dans les tiges et dans les feuilles concordent vers une potentielle implication de CAX2 dans la réponse vis-à-vis de l'arsenic. L'hypothèse de son rôle dans la prise en charge de l'arsenite (AsIII) dans les membranes vacuolaires nécessiterait une étude enzymatique approfondie afin d'être validée.

De toutes les variations moléculaires observées, la plus marquée est celle liée à la production des tannins. Ces composés sont connus pour leur intervention dans la complexation des métaux afin d'en diminuer la toxicité au sein des tissus végétaux (Kainja et al., 1998). Alors que l'implication des tannins a été documentée pour la gestion du zinc, du cobalt, du cuivre ou de l'aluminium (McDonald et al., 1996; Winkel-Shirley, 2002; Kainja et al., 1998), aucune recherche n'a suggéré leur implication dans la gestion de l'arsenic. Ce point soulevé, il apparaît

important qu'une expérience future de quantification de tannins synthétisés dans des plantes exposées à l'arsenic vienne confirmer ou réfuter cette hypothèse.

#### **4.4. Synthèse et comparaison des résultats**

L'originalité de cette étude doctorale réside dans ses deux volets distincts : l'un *in situ*, directement sur le site expérimental et comportant plusieurs années de suivi, et l'autre plus court, en hydroponie, dans un milieu contrôlé. Les résultats découlant du premier volet suggèrent que les plantes testées ont réduit la concentration de certains métaux toxiques dans le sol en les accumulant dans leurs systèmes racinaires. L'absence de translocation vers les tissus aériens indique que le choix des espèces candidates n'est pas le plus approprié pour l'extraction de l'arsenic. D'ailleurs, dans le second volet, bien que montrant des résultats intéressants d'extraction et de tolérance, *S. purpurea* n'a transféré qu'un faible pourcentage de l'arsenic absorbé vers ses parties aériennes. Cela dit, les résultats exposés par l'étude transcriptomique associée à ce volet sont transposables et utilisables pour assister la sélection, ou l'amélioration, d'autres espèces végétales d'intérêt. Aussi, si *S. purpurea* ne semble pas le meilleur candidat pour la phytoextraction de l'arsenic, cette espèce présente toutefois un intérêt certain pour la phytostabilisation de cet élément.

La phytoremédiation est une approche qui, bien que connue et étudiée depuis quelques décennies, conserve une part de mystère. Aussi, en raison de sa complexité, les travaux réalisés au cours de cette thèse visaient à développer les connaissances sur les mécanismes moléculaires cachés derrière les réponses physiologiques précédemment documentées chez *S. purpurea*. Cette approche novatrice, combinant des données de terrain à des données issues d'analyses transcriptomiques en laboratoire, a permis d'obtenir une meilleure compréhension des

mécanismes moléculaires mis en place par les plantes confrontées à l'arsenic. Aussi, bien que certains résultats n'abondent pas dans le sens de nos hypothèses initialement émises, d'autres, plus inattendus sauront être utiles pour de futures recherches.

#### **4.5. Limites et questionnements soulevés**

Les conclusions apportées par cette thèse, bien que diverses et mitigées, constituent un apport d'importance pour la compréhension et la diffusion de la phytoremédiation. Plusieurs limites à ces interprétations doivent cependant être soulignées. Si l'expérience *in situ* a fait l'objet d'un suivi pendant quatre saisons de culture, l'expérience réalisée en hydroponie a été réalisée sur quatre semaines d'exposition à l'arsenic. Les données de translocation auraient peut-être différé si l'expérience avait été prolongée sur deux mois. Aussi, l'échantillonnage à des fins d'études physiologique et transcriptomique a été réalisé à  $t=7j$  et  $t=14j$  après le début de l'exposition à l'arsenic. Si le matériel disponible avait été suffisant, un temps d'échantillonnage aurait pu être ajouté pour comparer la réponse moléculaire à plus long terme, afin de voir s'il y a un établissement stable des mécanismes de réponses moléculaires au sein des saules exposés.

La transposabilité des résultats issus d'une étude en hydroponie a été longuement discutée. Nous sommes bien conscients des différences de biodisponibilité d'éléments en milieux solides et liquides, ainsi que des changements morphologiques engendrés sur le système racinaire. Cependant, dans le contexte d'une étude transcriptomique où tous les paramètres doivent être contrôlés, ce type de protocole de culture est celui qui semble, encore aujourd'hui, le plus approprié. Finalement, la similitude des résultats obtenus entre les deux volets concernant les profils d'accumulation (majoritairement racinaires) et les réponses physiologiques comparables donnent du poids aux résultats obtenus.

Ainsi, bien que les interprétations de données issues d'une culture hydroponique puissent sembler peu représentatives d'une réalité de terrain, nous demeurons confiants de la robustesse des conclusions avancées.

#### **4.6. Perspectives**

Bien que la phytoremédiation se soit beaucoup développée depuis la découverte de ses principes d'action, elle demeure une solution qui n'est pas envisagée en priorité pour des applications commerciales ou opérationnelles. Le facteur limitant reste sa relative lenteur d'action qui freine sa mise en application dans des projets de décontamination souvent urgents. Des travaux comme ceux entrepris dans le cadre de ce projet doctoral visent à optimiser l'efficacité de la phytoremédiation en fournissant des outils de sélection ou d'amélioration de plantes utilisables.

Bien que sa dimension éthique soit encore discutée, le recours à des espèces génétiquement modifiées est une avenue envisagée depuis plusieurs années. Le risque de perturbation écologique liée à l'introduction d'une espèce dont le *fitness* aurait été amélioré dans un environnement déjà perturbé par la pollution crée toutefois un blocage à l'utilisation de ce type d'approche. C'est pourquoi, à l'aide d'autres systèmes biologiques comme les bactéries, plusieurs équipes de chercheurs ont développé des procédures génétiques de mort programmée basée sur la transformation, avec des mini-transposons gérant des gènes de suicide cellulaire. Ce mécanisme serait activé en fin de processus de décontamination par l'absence d'un polluant déterminé (Pandey et al., 2005; Paul et al., 2005). Ce scénario, se rapprochant de la science-fiction, n'est pas si difficile à envisager avec les outils disponibles de nos jours. À l'heure actuelle, et malgré les techniques de contrôle existantes, le débat éthique relatif à l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés en phytoremédiation demeure ouvert.

Les données apportées par le volet transcriptomique de cette thèse sont utilisables tant dans un contexte de protection des cultures alimentaires que dans un contexte sanitaire. En effet, de nombreux pays sont touchés par la contamination de leurs récoltes cultivées sur des terres polluées à l'arsenic. Ainsi, la sélection d'espèces comestibles basée sur l'absence des gènes nécessaires au transport de l'arsenic apporterait une solution rapide et facilement applicable.

En conclusion, bien qu'étant une approche encore considérée comme moins efficace que les techniques de remédiation dites traditionnelles, la phytoremédiation continue d'évoluer grâce à des outils développés en recherche appliquée et fondamentale. La publicisation des possibilités de valorisation des produits provenant de la phytoremédiation, comme la biomasse (biocarburant) ou le phytominage (extraction de minerais d'intérêt comme l'or), permettrait de mieux faire connaître cette approche. Dans l'actuel contexte de prise de conscience écologique globale, que ce soit au niveau des grands décideurs de ce monde ou des petites municipalités, l'importance de mettre de l'avant des techniques de dépollution soucieuses de l'environnement est une priorité.

## Références bibliographiques

- Abedin, Md. Joinal, J. Cotter-Howells, et Andy A. Meharg. 2002. « Arsenic Uptake and Accumulation in Rice (*Oryza Sativa* L.) Irrigated with Contaminated Water ». *Plant and Soil* 240 (2): 311-19. <https://doi.org/10.1023/A:1015792723288>.
- Abedin, Mohammed Joinal, Jörg Feldmann, et Andy A. Meharg. 2002. « Uptake Kinetics of Arsenic Species in Rice Plants ». *Plant Physiology* 128 (3): 1120-28. <https://doi.org/10.1104/pp.010733>.
- Acar, Yalcin B., Robert J. Gale, Akram N. Alshawabkeh, Robert E. Marks, Susheel Puppala, Mark Bricka, et Randy Parker. 1995. « Electrokinetic remediation: Basics and technology status ». *Journal of Hazardous Materials, Soil Remediation: Application of Innovative and Standard Technologies*, 40 (2): 117-37. [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(94\)00066-P](https://doi.org/10.1016/0304-3894(94)00066-P).
- Adeyemi, Joseph A., Airton da Cunha Martins-Junior, et Fernando Barbosa. 2015. « Teratogenicity, genotoxicity and oxidative stress in zebrafish embryos (*Danio rerio*) co-exposed to arsenic and atrazine ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 172-173: 7-12. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.04.001>.
- Afzal, Muhammad, Qaiser M. Khan, et Angela Sessitsch. 2014. « Endophytic bacteria: Prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants ». *Chemosphere* 117: 232-42. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.078>.
- Ali, Hazrat, Ezzat Khan, et Muhammad Anwar Sajad. 2013. « Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications ». *Chemosphere* 91 (7): 869-81. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>.
- Anderson, C.G, L.G Twidwell, R.G Robin, et K.D Mills. 2014. « Arsenic hydrometallurgy; fundamentals, technology and applications. » *Proceedings of CIM Arsenic Symposium*, 2014. Conference of Metallurgists Proceedings ISBN: 978-1-926872-24-7 [https://mafiadoc.com/download/arsenic-hydrometallurgy-fundamentals-technology-\\_5b81753d097c4789088b45eb.html](https://mafiadoc.com/download/arsenic-hydrometallurgy-fundamentals-technology-_5b81753d097c4789088b45eb.html)
- Anderson, Nickolas A and Chapple, Clint. 2014. « Perturbing Lignin Biosynthesis: Metabolic Changes in Response to Manipulation of the Phenylpropanoid Pathway - Recent Advances in Polyphenol Research, Volume 4 - Anderson - Wiley Online Library ». 2014. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118329634.ch2/summary>.
- Andersson-Gunnerås, Sara, Jenny M. Hellgren, Simon Björklund, Sharon Regan, Thomas Moritz, et Björn Sundberg. 2003. « Asymmetric Expression of a Poplar ACC Oxidase Controls Ethylene Production during Gravitational Induction of Tension Wood ». *The Plant Journal* 34 (3): 339-49. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01727.x>.
- Argus, George W. 1997. « Infrageneric Classification of *Salix* (Salicaceae) in the New World ». *Systematic Botany Monographs* 52: 1-121. <https://doi.org/10.2307/25096638>.
- Arisi, Ana-Carolina M., Graham Noctor, Christine H. Foyer, et Lise Jouanin. 1997. « Modification of Thiol Contents in Poplars (*Populus Tremula* × *P. Alba*) Overexpressing Enzymes Involved in Glutathione Synthesis ». *Planta* 203 (3): 362-72. <https://doi.org/10.1007/s004250050202>.

- Armienta, M. A., et N. Segovia. 2008. « Arsenic and Fluoride in the Groundwater of Mexico ». *Environmental Geochemistry and Health* 30 (4): 345-53. <https://doi.org/10.1007/s10653-008-9167-8>.
- Arnetoli, Miluscia, Riet Vooijs, Wilma ten Bookum, Francesca Galardi, Cristina Gonnelli, Roberto Gabbrielli, Henk Schat, et Jos A. C. Verkleij. 2008. « Arsenate tolerance in *Silene paradoxa* does not rely on phytochelatin-dependent sequestration ». *Environmental Pollution* 152 (3): 585-91. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.07.002>.
- Aronsson, Pär, et Kurth Perttu. 2001. « Willow vegetation filters for wastewater treatment and soil remediation combined with biomass production ». *The Forestry Chronicle* 77 (2): 293-99. <https://doi.org/10.5558/tfc77293-2>.
- Atagana, Harrison Ifeanyichukwu, R. J. Haynes, et F. M. Wallis. 2006. « Fungal Bioremediation of Creosote-Contaminated Soil: A Laboratory Scale Bioremediation Study Using Indigenous Soil Fungi ». *Water, Air, and Soil Pollution* 172 (1-4): 201-19. <https://doi.org/10.1007/s11270-005-9074-x>.
- Baker, A. J. M., S. P. McGrath, C. M. D. Sidoli, et R. D. Reeves. 1994. « The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants ». *Resources, Conservation and Recycling, Environmental biotechnology in waste treatment and recycling*, 11 (1): 41-49. [https://doi.org/10.1016/0921-3449\(94\)90077-9](https://doi.org/10.1016/0921-3449(94)90077-9).
- Baker et Brooks. 1989. « Terrestrial Higher Plants Which Hyperaccumulate Metallic Elements. A Review of Their Distribution, Ecology and Phytochemistry. » *Biorecovery* 1 (0): 81-126. [https://www.researchgate.net/profile/Alan\\_Baker2/publication/247713966\\_Terrestrial\\_Higher\\_Plants\\_Which\\_Hyperaccumulate\\_Metallic\\_Elements\\_A\\_Review\\_of\\_Their\\_Distribution\\_E/links/004635368aaa870046000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Alan_Baker2/publication/247713966_Terrestrial_Higher_Plants_Which_Hyperaccumulate_Metallic_Elements_A_Review_of_Their_Distribution_E/links/004635368aaa870046000000.pdf)
- Baliardini, Cecilia, Claire-Lise Meyer, Pietrino Salis, Pierre Saumitou-Laprade, et Nathalie Verbruggen. 2015. « CAX1 Co-Segregates with Cd Tolerance in the Metal Hyperaccumulator *Arabidopsis Halleri* and Plays a Role in Limiting Oxidative Stress in *Arabidopsis* ». *Plant Physiology*, pp.01037.2015. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01037>.
- Banerjee, Mayukh, Nilanjana Banerjee, Pritha Bhattacharjee, Debapriya Mondal, Paul R. Lythgoe, Mario Martínez, Jianxin Pan, David A. Polya, et Ashok K. Giri. 2013. « High Arsenic in Rice Is Associated with Elevated Genotoxic Effects in Humans ». *Scientific Reports* 3. <https://doi.org/10.1038/srep02195>.
- Barrachina, A. Carbonell, F. Burlo Carbonell, et J. Mataix Beneyto. 1995. « Arsenic uptake, distribution, and accumulation in tomato plants: Effect of arsenite on plant growth and yield ». *Journal of Plant Nutrition* 18 (6): 1237-50. <https://doi.org/10.1080/01904169509364975>.
- Basta, N. T., J. A. Ryan, et R. L. Chaney. 2005. « Trace Element Chemistry in Residual-Treated Soil ». *Journal of Environmental Quality* 34 (1): 49-63. <https://doi.org/10.2134/jeq2005.0049dup>.
- Bates, Douglas, Martin Mächler, Ben Bolker, et Steve Walker. 2014. « Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4 ». *arXiv:1406.5823 [stat]*. <http://arxiv.org/abs/1406.5823>.
- Beaulieu, Michel. 2019. « Guide d'intervention – Protection des sols et réhabilitation des terrains contaminés. » Québec, ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques. [http://ocpm.qc.ca/sites/ocpm.qc.ca/files/pdf/P-84/5.4.3\\_a\\_guide-intervention-protection-rehab-juillet\\_2016.pdf](http://ocpm.qc.ca/sites/ocpm.qc.ca/files/pdf/P-84/5.4.3_a_guide-intervention-protection-rehab-juillet_2016.pdf)



- Bencko, Vladimír, et Karel Symon. 1977. « Health aspects of burning coal with a high arsenic content: I. Arsenic in hair, urine, and blood in children residing in a polluted area ». *Environmental Research* 13 (3): 378-85. [https://doi.org/10.1016/0013-9351\(77\)90018-4](https://doi.org/10.1016/0013-9351(77)90018-4).
- Berg, Michael, Hong Con Tran, Thi Chuyen Nguyen, Hung Viet Pham, Roland Schertenleib, et Walter Giger. 2001. « Arsenic Contamination of Groundwater and Drinking Water in Vietnam: A Human Health Threat ». *Environmental Science & Technology* 35 (13): 2621-26. <https://doi.org/10.1021/es010027y>.
- Bhattacharjee, Hiranmoy, Rita Mukhopadhyay, Saravanamuthu Thiyagarajan, et Barry P. Rosen. 2008. « Aquaglyceroporins: Ancient Channels for Metalloids ». *Journal of Biology* 7 (9): 33. <https://doi.org/10.1186/jbiol91>.
- Bhattacharya, Prosun, Arun B Mukherjee, Gunnar Jacks, et Sune Nordqvist. 2002. « Metal contamination at a wood preservation site: characterisation and experimental studies on remediation ». *Science of The Total Environment* 290 (1): 165-80. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)01073-7](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)01073-7).
- Bienert, Gerd P., Manuela D. Schüssler, et Thomas P. Jahn. 2008. « Metalloids: essential, beneficial or toxic? Major intrinsic proteins sort it out ». *Trends in Biochemical Sciences* 33 (1): 20-26. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.10.004>.
- Bienert, Gerd P., Michael Thorsen, Manuela D. Schüssler, Henrik R. Nilsson, Annemarie Wagner, Markus J. Tamás, et Thomas P. Jahn. 2008. « A Subgroup of Plant Aquaporins Facilitate the Bi-Directional Diffusion of As(OH)<sub>3</sub> and Sb(OH)<sub>3</sub> across Membranes ». *BMC Biology* 6 (1): 26. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-6-26>.
- Bissen, Monique, et Fritz H. Frimmel. 2003. « Arsenic — a Review. Part I: Occurrence, Toxicity, Speciation, Mobility ». *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 31 (1): 9-18. <https://doi.org/10.1002/ahch.200390025>.
- Blaustein, Richard. 2017. « Phytoremediation of Lead: What Works, What Doesn't ». *BioScience* 67 (9): 868-868. <https://doi.org/10.1093/biosci/bix089>.
- Bleeker, Petra M., Henk W.J. Hakvoort, Mattijs Blik, Erik Souer, et Henk Schat. 2006. « Enhanced Arsenate Reduction by a CDC25-like Tyrosine Phosphatase Explains Increased Phytochelatin Accumulation in Arsenate-Tolerant *Holcus Lanatus* ». *The Plant Journal* 45 (6): 917-29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02651.x>.
- Bolan, Nanthi, Santiago Mahimairaja, Anitha Kunhikrishnan, Balaji Seshadri, et Ramya Thangarajan. 2015. « Bioavailability and Ecotoxicity of Arsenic Species in Solution Culture and Soil System: Implications to Remediation ». *Environmental Science and Pollution Research*, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1827-2>.
- Boominathan, Rengasamy, et Pauline M. Doran. 2003. « Cadmium Tolerance and Antioxidative Defenses in Hairy Roots of the Cadmium Hyperaccumulator, *Thlaspi Caerulescens* ». *Biotechnology and Bioengineering* 83 (2): 158-67. <https://doi.org/10.1002/bit.10656>.
- Boyle, R. W., et I. R. Jonasson. 1973. « The geochemistry of arsenic and its use as an indicator element in geochemical prospecting ». *Journal of Geochemical Exploration* 2 (3): 251-96. [https://doi.org/10.1016/0375-6742\(73\)90003-4](https://doi.org/10.1016/0375-6742(73)90003-4).
- Brereton, Nicholas J. B., Emmanuel Gonzalez, Julie Marleau, Werther Guidi Nissim, Michel Labrecque, Simon Joly, et Frederic E. Pitre. 2016. « Comparative Transcriptomic Approaches Exploring Contamination Stress Tolerance in *Salix* Sp. Reveal the Importance for a Metaorganismal de Novo Assembly Approach for Nonmodel Plants ». *Plant Physiology* 171 (1): 3-24. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00090>.

- Briat, Jean-François. 2010. « Arsenic Tolerance in Plants: “Pas de Deux” between Phytochelatin Synthesis and ABC Vacuolar Transporters ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (49): 20853-54. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016286107>.
- Brooks, C.G. 2014. *Mineral Commodity Summary: Arsenic*. US Geological Survey & Orienteering S. Government Printing Office. [https://books.google.com/books/about/Mineral\\_Commodity\\_Summaries\\_2009.html?id=AT-Mh4wwL2gC](https://books.google.com/books/about/Mineral_Commodity_Summaries_2009.html?id=AT-Mh4wwL2gC)
- Brooks, Robert R, Michael F Chambers, Larry J Nicks, et Brett H Robinson. 1998. « Phytomining ». *Trends in Plant Science* 3 (9): 359-62. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01283-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01283-7).
- Bull, D. C. s. d. « The Chemistry of Chromated Copper Arsenate II. Preservative-Wood Interactions ». *Wood Science and Technology* 34 (6): 459-66. <https://doi.org/10.1007/s002260000066>.
- Butcher, David J. 2009. « Phytoremediation of Lead in Soil: Recent Applications and Future Prospects ». *Applied Spectroscopy Reviews* 44 (2): 123-39. <https://doi.org/10.1080/05704920802352580>.
- Byrne, Mary E. 2009. « A role for the ribosome in development ». *Trends in Plant Science* 14 (9): 512-19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.06.009>.
- Cangelosi, Virginia M., Melanie A. Pitt, W. Jake Vickaryous, Corinne A. Allen, Lev N. Zakharov, et Darren W. Johnson. 2010. « Design Considerations for the Group 15 Elements: The Pnictogen- $\pi$  Interaction As a Complementary Component in Supramolecular Assembly Design ». *Crystal Growth & Design* 10 (8): 3531-36. <https://doi.org/10.1021/cg100444n>.
- Carbonell, A.A, M.A Aarabi, R.D DeLaune, R.P Gambrell, et W.H Patrick Jr. 1998. « Arsenic in wetland vegetation: Availability, phytotoxicity, uptake and effects on plant growth and nutrition ». *Science of The Total Environment* 217 (3): 189-99. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00195-8](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00195-8).
- Catarecha, Pablo, Ma Dolores Segura, José Manuel Franco-Zorrilla, Berenice García-Ponce, Mónica Lanza, Roberto Solano, Javier Paz-Ares, et Antonio Leyva. 2007. « A Mutant of the Arabidopsis Phosphate Transporter PHT1;1 Displays Enhanced Arsenic Accumulation ». *The Plant Cell* 19 (3): 1123-33. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.041871>.
- Cebrian, Mariano E., Arnulfo Albores, Manuel Aguilar, et Enrique Blakely. 1983. « Chronic Arsenic Poisoning in the North of Mexico ». *Human Toxicology* 2 (1): 121-33. <https://doi.org/10.1177/096032718300200110>.
- Chang, Fang-Chih, Ya-Nang Wang, Pin-Jui Chen, et Chun-Han Ko. 2013. « Factors affecting chelating extraction of Cr, Cu, and As from CCA-treated wood ». *Journal of Environmental Management* 122: 42-46. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.02.012>.
- Chang, Shujun, Jeff Puryear, et John Cairney. 1993. « A Simple and Efficient Method for Isolating RNA from Pine Trees ». *Plant Molecular Biology Reporter* 11 (2): 113-16. <https://doi.org/10.1007/BF02670468>.
- Chang, Yu-Sen, Yu-Jie Chang, Chien-Tsan Lin, Ming-Chih Lee, Chun-Wei Wu, et Yun-Hui Lai. 2013. « Nitrogen Fertilization Promotes the Phytoremediation of Cadmium in *Pentas Lanceolata* ». *International Biodeterioration & Biodegradation Complete* (85): 709-14. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.05.021>.

- Chekol, Tesema, et Lester R. Vough. 2001. « A Study of the Use of Alfalfa (*Medicago Sativa* L.) for the Phytoremediation of Organic Contaminants in Soil ». *Remediation Journal* 11 (4): 89–101. <https://doi.org/10.1002/rem.1017>.
- Chen, Guangcai, Xiaoli Zou, Yuan Zhou, Jianfeng Zhang, et Gary Owens. 2013. « A Short-Term Study to Evaluate the Uptake and Accumulation of Arsenic in Asian Willow (*Salix* Sp.) from Arsenic-Contaminated Water ». *Environmental Science and Pollution Research* 21 (5): 3275-84. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2288-3>.
- Chen, Tongbin, Zhilian Fan, Mei Lei, Zechun Huang, et Chaoyang Wei. 2002. « Effect of Phosphorus on Arsenic Accumulation in As-Hyperaccumulator *Pteris Vittata* L. and Its Implication ». *Chinese Science Bulletin* 47 (22): 1876-79. <https://doi.org/10.1360/02tb9410>.
- Chilvers, D.C, et P.J Peterson. 1987. « Global cycling of arsenic ». In *Lead, mercury, cadmium and arsenic in the environment*, (T. C. Hutchinson and K. M. Meema. eds.) 279-301. <https://pdfs.semanticscholar.org/996c/8af60bf9d5b679fc7fcadb66a206591b2683.pdf>
- Chirakkara Reshma A., et Reddy Krishna R. 2014. « Synergistic Effects of Organic and Metal Contaminants on Phytoremediation ». *Geo-Congress 2014 Technical Papers, Proceedings* . <https://doi.org/10.1061/9780784413272.167>.
- . 2015. « Plant Species Identification for Phytoremediation of Mixed Contaminated Soils ». *Journal of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste* 19 (4): 04015004. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)HZ.2153-5515.0000282](https://doi.org/10.1061/(ASCE)HZ.2153-5515.0000282).
- Chirenje, Tait, L. Q Ma, C Clark, et M Reeves. 2003. « Cu, Cr and As distribution in soils adjacent to pressure-treated decks, fences and poles ». *Environmental Pollution* 124 (3): 407-17. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(03\)00046-0](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(03)00046-0).
- Chu, Haiyan, Xiangui Lin, Takeshi Fujii, Sho Morimoto, Kazuyuki Yagi, Junli Hu, et Jiabao Zhang. 2007. « Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management ». *Soil Biology and Biochemistry* 39 (11): 2971-76. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.05.031>.
- Clark, Ian D., et Kenneth G. Raven. 2004. « Sources and circulation of water and arsenic in the Giant Mine, Yellowknife, NWT, Canada ». *Isotopes in Environmental and Health Studies* 40 (2): 115-28. <https://doi.org/10.1080/10256010410001671014>.
- Cloutier-Hurteau, Benoît, Marie-Claude Turmel, Catherine Mercier, et François Courchesne. 2013. « The Sequestration of Trace Elements by Willow (*Salix Purpurea*)—Which Soil Properties Favor Uptake and Accumulation? ». *Environmental Science and Pollution Research* 21 (6): 4759-71. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2450-y>.
- Cohen, Samuel M., Lora L. Arnold, Barbara D. Beck, Ari S. Lewis, et Michal Eldan. 2013. « Evaluation of the carcinogenicity of inorganic arsenic ». *Critical Reviews in Toxicology* 43 (9): 711-52. <https://doi.org/10.3109/10408444.2013.827152>.
- Collins, J. F., J. P. Brown, G. V. Alexeeff, et A. G. Salmon. 1998. « Potency Equivalency Factors for Some Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Derivatives ». *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 28 (1): 45-54. <https://doi.org/10.1006/rtp.1998.1235>.
- Courchesne, François, Marie-Claude Turmel, Benoît Cloutier-Hurteau, Simon Constantineau, Lara Munro, et Michel Labrecque. 2017. « Phytoextraction of Soil Trace Elements by Willow during a Phytoremediation Trial in Southern Québec, Canada ». *International Journal of Phytoremediation* 19 (6): 545-54. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1267700>.

- Courchesne, François, Marie-Claude Turmel, Benoît Cloutier-Hurteau, Gilbert Tremblay, Lara Munro, Jacynthe Masse, et Michel Labrecque. 2017. « Soil Trace Element Changes during a Phytoremediation Trial with Willows in Southern Québec, Canada ». *International Journal of Phytoremediation* 19 (7): 632-42. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1278422>.
- Cui, Xing, Toshifumi Wakai, Yoshio Shirai, Naoyuki Yokoyama, Katsuyoshi Hatakeyama, et Seishiro Hirano. 2006. « Arsenic trioxide inhibits DNA methyltransferase and restores methylation-silenced genes in human liver cancer cells ». *Human Pathology* 37 (3): 298-311. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2005.10.013>.
- Cullen, W.R., et K.J. Reimer. 1989. « Arsenic speciation in the environment ». *Chemical Reviews*, n° 89: 713-64. <https://doi.org/10.1021/cr00094a002>
- Czarnecki, S., et R.-A. Düring. 2014. « Influence of long-term mineral fertilization on metal contents and properties of soil samples taken from different locations in Hesse, Germany ». *SOIL Discussions* 1 : 239-65. <https://doi.org/10.5194/soild-1-239-2014>.
- Dai, Wentao, Xuexi Yang, Hui Chen, Wenzhong Xu, Zhenyan He, et Mi Ma. 2013. « Phytotoxicities of Inorganic Arsenic and Dimethylarsinic Acid to Arabidopsis Thaliana and Pteris Vittata ». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 91 (6): 652-55. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1115-3>.
- Davis, Micheal A., Seth G. Pritchard, Robert S. Boyd, et Stephen A. Prior. 2001. « Developmental and Induced Responses of Nickel-Based and Organic Defences of the Nickel-Hyperaccumulating Shrub, *Psychotria Douarrei* ». *New Phytologist* 150 (1): 49-58. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00067.x>.
- Dawson, B.S.W., G.F. Parker, F.J. Cowan, et S.O. Hong. 1991. « Interlaboratory Determination of Copper, Chromium and Arsenic in Timber Treated with Preservative ». *The Analyst* 116 (4): 339-46. <https://doi.org/10.1039/AN9911600339>.
- Desch, H. E., et J. M. Dinwoodie. 1996. « Utilisation of Timber ». In *Timber Structure, Properties, Conversion and Use*, 181-210. Macmillan Education UK. [https://doi.org/10.1007/978-1-349-13427-4\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-349-13427-4_16).
- Desjardins, D., F. E. Pitre, W. Guidi Nissim, et M. Labrecque. 2015. « Differential uptake of silver, copper and zinc suggests complementary species-specific phytoextraction potential ». *International Journal of Phytoremediation* 0: 00-00. <https://doi.org/10.1080/15226514.2015.1086296>.
- Dhankher, Om Parkash. 2005. « Arsenic Metabolism in Plants: An inside Story ». *New Phytologist* 168 (3): 503-5. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01598.x>.
- Dhankher, Om Parkash, Yujing Li, Barry P. Rosen, Jin Shi, David Salt, Julie F. Senecoff, Nupur A. Sashti, et Richard B. Meagher. 2002. « Engineering Tolerance and Hyperaccumulation of Arsenic in Plants by Combining Arsenate Reductase and  $\gamma$ -Glutamylcysteine Synthetase Expression ». *Nature Biotechnology* 20 (11): 1140-45. <https://doi.org/10.1038/nbt747>.
- Dietz, K.-J., M. Baier, et U. Krämer. 1999. « Free Radicals and Reactive Oxygen Species as Mediators of Heavy Metal Toxicity in Plants ». In *Heavy Metal Stress in Plants*, 73-97. Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-07745-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-662-07745-0_4).
- Dos Santos Utmazian, Maria Noel, Gerlinde Wieshammer, Rosa Vega, et Walter W. Wenzel. 2007. « Hydroponic screening for metal resistance and accumulation of cadmium and zinc in twenty clones of willows and poplars ». *Environmental Pollution* 148 (1): 155-65. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.10.045>.

- Dua, Singh, Sethunathan, et Johri. 2002. « Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. » *Applied Microbiology and Biotechnology* 59 (2-3): 143-52. DOI: 10.1007/s00253-002-1024-6
- Duan, Gui-Lan, Ying Hu, Sabine Schneider, Joseph McDermott, Jian Chen, Norbert Sauer, Barry P. Rosen, Birgit Daus, Zijuan Liu, et Yong-Guan Zhu. 2016. « Inositol Transporters AtINT2 and AtINT4 Regulate Arsenic Accumulation in *Arabidopsis* Seeds ». *Nature Plants* 2 (1): 15202. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.202>.
- Duan, Gui-Lan, Yao Zhou, Yi-Ping Tong, Rita Mukhopadhyay, Barry P. Rosen, et Yong-Guan Zhu. 2007. « A CDC25 Homologue from Rice Functions as an Arsenate Reductase ». *New Phytologist* 174 (2): 311-21. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02009.x>.
- Duan, Gui-Lan, Yong-Guan Zhu, Yi-Ping Tong, Chao Cai, et Ralf Kneer. 2005. « Characterization of Arsenate Reductase in the Extract of Roots and Fronds of Chinese Brake Fern, an Arsenic Hyperaccumulator ». *Plant Physiology* 138 (1): 461-69. <https://doi.org/10.1104/pp.104.057422>.
- Durell, William Donald. 1941. « The effect of aeration on growth of the tomato in nutrient solution1 ». *Plant Physiology* 16 (2): 327-41. DOI: 10.1104/pp.16.2.327
- Dushenko, W.T., D.A. Bright, et K.J. Reimer. 1995. « Arsenic bioaccumulation and toxicity in aquatic macrophytes exposed to gold-mine effluent: relationships with environmental partitioning, metal uptake and nutrients ». *Aquatic Botany* 50 (2): 141-58. [https://doi.org/10.1016/0304-3770\(95\)00448-9](https://doi.org/10.1016/0304-3770(95)00448-9).
- Duxbury, J. M., A. B. Mayer, J. G. Lauren, et N. Hassan. 2003. « Food Chain Aspects of Arsenic Contamination in Bangladesh: Effects on Quality and Productivity of Rice ». *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 38 (1): 61-69. <https://doi.org/10.1081/ESE-120016881>.
- Eapen, Susan, et S. F. D'Souza. 2005. « Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals ». *Biotechnology Advances* 23 (2): 97-114. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.10.001>.
- Eisenberg, Joseph N. S., Deborah H. Bennett, et Thomas E. McKone. 1998. « Chemical Dynamics of Persistent Organic Pollutants: A Sensitivity Analysis Relating Soil Concentration Levels to Atmospheric Emissions ». *Environmental Science & Technology* 32 (1): 115-23. <https://doi.org/10.1021/es970337+>.
- Eisler, Ronald. 2004. « Arsenic Hazards to Humans, Plants, and Animals from Gold Mining ». In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 133-65. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. New York, NY: Springer New York. [https://doi.org/10.1007/0-387-21729-0\\_3](https://doi.org/10.1007/0-387-21729-0_3).
- Ellis, Danielle R., Luke Gumaelius, Emily Indriolo, Ingrid J. Pickering, Jo Ann Banks, et David E. Salt. 2006. « A Novel Arsenate Reductase from the Arsenic Hyperaccumulating Fern *Pteris Vittata* ». *Plant Physiology* 141 (4): 1544-54. <https://doi.org/10.1104/pp.106.084079>.
- Entry, James A., Nan C. Vance, Melinda A. Hamilton, Darlene Zabowski, Lidia S. Watrud, et Domy C. Adriano. 1996. « Phytoremediation of Soil Contaminated with Low Concentrations of Radionuclides ». *Water, Air, and Soil Pollution* 88 (1): 167-76. <https://doi.org/10.1007/BF00157420>.
- Esteban, Elvira, Ramón O. Carpena, et Andrew A. Meharg. 2003. « High-Affinity Phosphate/Arsenate Transport in White Lupin (*Lupinus Albus*) Is Relatively Insensitive

- to Phosphate Status ». *New Phytologist* 158 (1): 165–173. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00713.x>.
- Farhadian, Mehrdad, Cédric Vachelard, David Duchez, et Christian Larroche. 2008. « In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: A review ». *Bioresource Technology* 99 (13): 5296-5308. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.025>.
- Ferreccio, C., C. González, V. Milosavljevic, G. Marshall, A. M. Sancha, et A. H. Smith. 2000. « Lung Cancer and Arsenic Concentrations in Drinking Water in Chile ». *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 11 (6): 673-79. <http://www.academia.edu/download/4949445/10.1.1.61.4531.pdf>
- Field, Jim A., et Reyes Sierra-Alvarez. 2008. « Microbial degradation of chlorinated dioxins ». *Chemosphere* 71 (6): 1005-18. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.10.039>.
- Figueiredo, Bernardino Ribeiro de, Ricardo Perobelli Borba, et Rômulo Simões Angélica. 2007. « Arsenic Occurrence in Brazil and Human Exposure ». *Environmental Geochemistry and Health* 29 (2): 109-18. <https://doi.org/10.1007/s10653-006-9074-9>.
- Fitz, Walter J, et Walter W Wenzel. 2002. « Arsenic transformations in the soil–rhizosphere–plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation ». *Journal of Biotechnology* 99 (3): 259-78. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00218-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00218-3).
- Flocco, C. G., A. Lo Balbo, M. P. Carranza, et A. M. Giulietti. 2002. « Removal of Phenol by Alfalfa Plants (Medicago Sativa L.) Grown in Hydroponics and Its Effect on Some Physiological Parameters ». *Acta Biotechnologica* 22 (1-2): 43–54. [https://doi.org/10.1002/1521-3846\(200205\)22:1/2<43::AID-ABIO43>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1521-3846(200205)22:1/2<43::AID-ABIO43>3.0.CO;2-3).
- Frankenberger, W. T. 2002. « Environmental Chemistry of Arsenic. » *Environmental Chemistry of Arsenic*. <https://books.google.ca/books?hl=fr&lr=&id=wryblpnw4DAC&oi=fnd&pg=PR7&ots=OkGgbtIqsG&sig=8qfFrOpOhIaVlGLAs5XhgrClplw>
- Freeman, John L., Daniel Garcia, Donggiun Kim, Amber Hopf, et David E. Salt. 2005. « Constitutively Elevated Salicylic Acid Signals Glutathione-Mediated Nickel Tolerance in *Thlaspi* Nickel Hyperaccumulators ». *Plant Physiology* 137 (3): 1082-91. <https://doi.org/10.1104/pp.104.055293>.
- Fries, G. F, V. J Feil, R. G Zaylskie, K. M Bialek, et C. P Rice. 2002. « Treated wood in livestock facilities: relationships among residues of pentachlorophenol, dioxins, and furans in wood and beef ». *Environmental Pollution* 116 (2): 301-7. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(01\)00122-1](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00122-1).
- Frith, John. 2013. « Arsenic – the “Poison of Kings” and the “Saviour of Syphilis” ». In *Journal of Military and Veterans Health*, 24:11. 4. <https://jmvh.org/article/arsenic-the-poison-of-kings-and-the-saviour-of-syphilis/>.
- Galli, E., E. Brancaloni, F. Di Mario, E. Donati, M. Frattoni, C. M. Polcaro, et P. Rapanà. 2008. « Mycelium growth and degradation of creosote-treated wood by basidiomycetes ». *Chemosphere* 72 (7): 1069-72. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.04.014>.
- Gambino, Giorgio, Irene Perrone, et Ivana Gribaudo. 2008. « A Rapid and Effective Method for RNA Extraction from Different Tissues of Grapevine and Other Woody Plants ». *Phytochemical Analysis* 19 (6): 520-25. <https://doi.org/10.1002/pca.1078>.
- Garbisu, C., et I. Alkorta. 2003. « Basic concepts on heavy metal soil bioremediation ». *European Journal of Mineral Processing & Environmental Protection* 3 (1): 58-66. [https://www.researchgate.net/profile/Itziar\\_Alkorta/publication/266292146\\_Basic\\_con](https://www.researchgate.net/profile/Itziar_Alkorta/publication/266292146_Basic_con)

- cepts\_on\_heavy\_metal\_soil\_bioremediation/links/5500b20a0cf2d61f821030ee/Basic-concepts-on-heavy-metal-soil-bioremediation.pdf
- Geiszinger, Anita, Walter Goessler, et Walter Kosmus. 2002. « Organoarsenic Compounds in Plants and Soil on Top of an Ore Vein ». *Applied Organometallic Chemistry* 16 (5): 245–249. <https://doi.org/10.1002/aoc.294>.
- Gentleman, Robert. 1996. « R: A Language for Data Analysis and Graphics AU - Ihaka, Ross ». *Journal of Computational and Graphical Statistics* 5 (3): 299-314. <https://doi.org/10.1080/10618600.1996.10474713>.
- Gerhardt, Karen E., Xiao-Dong Huang, Bernard R. Glick, et Bruce M. Greenberg. 2009. « Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges ». *Plant Science* 176 (1): 20-30. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.09.014>.
- Goering, P. L., H. V. Aposhian, M. J. Mass, M. Cebrián, B. D. Beck, et M. P. Waalkes. 1999. « The Enigma of Arsenic Carcinogenesis: Role of Metabolism. » *Toxicological Sciences* 49 (1): 5-14. <https://doi.org/10.1093/toxsci/49.1.5>.
- Gonzalez, Emmanuel, Nicholas J. B. Brereton, Julie Marleau, Werther Guidi Nissim, Michel Labrecque, Frederic E. Pitre, et Simon Joly. 2015. « Meta-transcriptomics indicates biotic cross-tolerance in willow trees cultivated on petroleum hydrocarbon contaminated soil ». *BMC Plant Biology* 15: 246. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0636-9>.
- Gorst-Allman, Charles P., Volker Puchta, et G. Spiteller. 1988. « Investigations of the Origin of the Furan Fatty Acids (F-Acids) ». *Lipids* 23 (11): 1032-36. <https://doi.org/10.1007/BF02535648>.
- Grabherr, Manfred G., Brian J. Haas, Moran Yassour, Joshua Z. Levin, Dawn A. Thompson, Ido Amit, Xian Adiconis, et al. 2011. « Full-Length Transcriptome Assembly from RNA-Seq Data without a Reference Genome ». *Nature Biotechnology* 29 (7): 644-52. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>.
- Grant, C., et A. J. Dobbs. 1977. « The growth and metal content of plants grown in soil contaminated by a copper/chrome/arsenic wood preservative ». *Environmental Pollution (1970)* 14 (3): 213-26. [https://doi.org/10.1016/0013-9327\(77\)90121-5](https://doi.org/10.1016/0013-9327(77)90121-5).
- Grenier, Vanessa, Frédéric E. Pitre, Werther Guidi Nissim, et Michel Labrecque. 2015. « Genotypic Differences Explain Most of the Response of Willow Cultivars to Petroleum-Contaminated Soil ». *Trees* 29 (3): 871-81. <https://doi.org/10.1007/s00468-015-1168-5>.
- Guidi, Werther, Hafssa Kadri, et Michel Labrecque. 2012. « Establishment techniques to using willow for phytoremediation on a former oil refinery in southern Quebec: achievements and constraints ». *Chemistry and Ecology* 28 (1): 49-64. <https://doi.org/10.1080/02757540.2011.627857>.
- Gunduz, Orhan, Celalettin Simsek, et Altug Hasozbek. 2009. « Arsenic Pollution in the Groundwater of Simav Plain, Turkey: Its Impact on Water Quality and Human Health ». *Water, Air, and Soil Pollution* 205 (1): 43. <https://doi.org/10.1007/s11270-009-0055-3>.
- . 2010. « Arsenic Pollution in the Groundwater of Simav Plain, Turkey: Its Impact on Water Quality and Human Health ». *Water, Air, and Soil Pollution* 205 (1-4): 43-62. <https://doi.org/10.1007/s11270-009-0055-3>.
- Gunes, Aydin, David J. Pilbeam, et Ali Inal. 2009. « Effect of Arsenic–Phosphorus Interaction on Arsenic-Induced Oxidative Stress in Chickpea Plants ». *Plant and Soil* 314 (1): 211-20. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9719-9>.

- Guo, Jiangbo, Xiaojing Dai, Wenzhong Xu, et Mi Ma. 2008. « Overexpressing GSH1 and AsPCS1 simultaneously increases the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis thaliana* ». *Chemosphere* 72 (7): 1020-26. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.04.018>.
- Guo, Xin, Chu-Guang Zheng, et Ming-Hou Xu. 2004. « Characterization of Arsenic Emissions from a Coal-Fired Power Plant ». *Energy & Fuels* 18 (6): 1822-26. <https://doi.org/10.1021/ef049921b>.
- Gupta, D.K., M. Inouhe, M. Rodríguez-Serrano, M.C. Romero-Puertas, et L.M. Sandalio. 2013. « Oxidative stress and arsenic toxicity: Role of NADPH oxidases ». *Chemosphere* 90 (6): 1987-96. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.066>.
- Gupta, Meetu, Pallavi Sharma, Neera Bhalla Sarin, et Alok Krishna Sinha. 2009. « Differential response of arsenic stress in two varieties of *Brassica juncea* L. ». *Chemosphere* 74 (9): 1201-8. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.023>.
- Haas, Brian J., Alexie Papanicolaou, Moran Yassour, Manfred Grabherr, Philip D. Blood, Joshua Bowden, Matthew Brian Couger, et al. 2013. « De Novo Transcript Sequence Reconstruction from RNA-Seq Using the Trinity Platform for Reference Generation and Analysis ». *Nature Protocols* 8 (8): 1494-1512. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>.
- Hakmaoui, A., M. Barón, et M. Ater. 2006. « Environmental Biotechnology Screening Cu and Cd Tolerance in *Salix* Species from North Morocco ». *African Journal of Biotechnology* 5 (13). <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/43102>.
- Hakmaoui, Abdelmalek, Mohammed Ater, Károly Bóka, et Matilde Barón. 2014. « Copper and Cadmium Tolerance, Uptake and Effect on Chloroplast Ultrastructure. Studies on *Salix purpurea* and *Phragmites australis* ». *Zeitschrift für Naturforschung C* 62 (5-6): 417–426. <https://doi.org/10.1515/znc-2007-5-616>.
- Hanano, Abdulsamie, Ibrahim Almously, Mouhna Shaban, Nour Moursel, AbdAlbaset Shahadeh, et Eskander Alhajji. 2015. « Differential tissue accumulation of 2,3,7,8-Tetrachlorinated dibenzo-p-dioxin in *Arabidopsis thaliana* affects plant chronology, lipid metabolism and seed yield ». *BMC Plant Biology* 15. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0583-5>.
- Hartley-Whitaker, J., G. Ainsworth, et A. A. Meharg. 2001. « Copper- and Arsenate-Induced Oxidative Stress in *Holcus Lanatus* L. Clones with Differential Sensitivity ». *Plant, Cell & Environment* 24 (7): 713-22. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00721.x>.
- Hartley-Whitaker, Jeanette, Gillian Ainsworth, Riet Vooijs, Wilma Ten Bookum, Henk Schat, et Andrew A. Meharg. 2001. « Phytochelatins Are Involved in Differential Arsenate Tolerance In *Holcus Lanatus* ». *Plant Physiology* 126 (1): 299-306. <https://doi.org/10.1104/pp.126.1.299>.
- Hassinen, V. H., A. I. Tervahauta, H. Schat, et S. O. Kärenlampi. 2011. « Plant Metallothioneins – Metal Chelators with ROS Scavenging Activity? ». *Plant Biology* 13 (2): 225-32. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2010.00398.x>.
- Hatanaka, Takeshi, Akio Kitajima, et Masao Takeuchi. 2004. « Role of copper chloride in the formation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans during incineration ». *Chemosphere* 57 (1): 73-79. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.04.058>.
- Haynes, W.M. 2014. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. CRC press. <http://diyhpl.us/~nmz787/mems/unorganized/CRC%20Handbook%20of%20Chemistry%20and%20Physics%2085th%20edition.pdf>



- Hei, Tom K., et Metka Filipic. 2004. « Role of oxidative damage in the genotoxicity of arsenic ». *Free Radical Biology and Medicine* 37 (5): 574-81. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.003>.
- Helgesen, Hans, et Erik H. Larsen. 1998. « Bioavailability and Speciation of Arsenic in Carrots Grown in Contaminated Soil ». *Analyst* 123 (5): 791-96. <https://doi.org/10.1039/A708056E>.
- Henry, Heather F., Joel G. Burken, Raina M. Maier, Lee A. Newman, Steven Rock, Jerald L. Schnoor, et William A. Suk. 2013. « Phytotechnologies – Preventing Exposures, Improving Public Health ». *International Journal of Phytoremediation* 15 (9): 889-99. <https://doi.org/10.1080/15226514.2012.760521>.
- Hood, Ronald, et Sally Bishop. 1972. « Teratogenic Effects of Sodium Arsenate in Mice ». *Archives of Environmental Health: An International Journal* 24 (1): 62-65. <https://doi.org/10.1080/00039896.1972.10666051>.
- Hopenhayn-Rich, Claudia, Mary Lou Biggs, et Allan H. Smith. 1998. « Lung and Kidney Cancer Mortality Associated with Arsenic in Drinking Water in Córdoba, Argentina ». *International Journal of Epidemiology* 27 (4): 561-69. <https://doi.org/10.1093/ije/27.4.561>.
- Hutchinson, T. C., S. Aufreiter, et R. G. V. Hancock. 1982. « Arsenic Pollution in the Yellowknife Area from Gold Smelter Activities ». *Journal of Radioanalytical Chemistry* 71 (1): 59-73. <https://doi.org/10.1007/BF02516141>.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2012. « Arsenic, metals, fibres, and dusts. » *Iarc Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* 100 (PT C): 11-465. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4781271/>
- Isayenkov, Stanislav V., et Frans J. M. Maathuis. 2008. « The Arabidopsis Thaliana Aquaglyceroporin AtNIP7;1 Is a Pathway for Arsenite Uptake ». *FEBS Letters* 582 (11): 1625-28. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.04.022>.
- Izumikawa, Chiaki. 1996. « Metal recovery from fly ash generated from vitrification process for MSW ash ». *Waste Management, Cycle and Stabilization Technologies of MSW Incineration Residue*, 16 (5): 501-7. [https://doi.org/10.1016/S0956-053X\(96\)00092-X](https://doi.org/10.1016/S0956-053X(96)00092-X).
- Jamieson, Heather E. 2014. « The Legacy of Arsenic Contamination from Mining and Processing Refractory Gold Ore at Giant Mine, Yellowknife, Northwest Territories, Canada ». *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 79 (1): 533-51. <https://doi.org/10.2138/rmg.2014.79.12>.
- Jomova, K., Z. Jenisova, M. Feszterova, S. Baros, J. Liska, D. Hudecova, C. J. Rhodes, et M. Valko. 2011. « Arsenic: Toxicity, Oxidative Stress and Human Disease ». *Journal of Applied Toxicology* 31 (2): 95-107. <https://doi.org/10.1002/jat.1649>.
- Jr, William T. Frankenberger. 2001. *Environmental Chemistry of Arsenic*. CRC Press. [https://books.google.ca/books?hl=fr&lr=&id=wryblpnw4DAC&oi=fnd&pg=PR7&dq=Environmental+Chemistry+of+Arsenic&ots=OkGgbpHpsD&sig=zXAtfc8eIVkTSRsS0N\\_xtS39Fvc](https://books.google.ca/books?hl=fr&lr=&id=wryblpnw4DAC&oi=fnd&pg=PR7&dq=Environmental+Chemistry+of+Arsenic&ots=OkGgbpHpsD&sig=zXAtfc8eIVkTSRsS0N_xtS39Fvc)
- Kabata-Pendias, A., et H. Pendias. 1992. « Trace Elements in Soils and Plants. » *Trace Elements in Soils and Plants*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19931977635>.
- Kainja, C., L. Bates, et T. Acamovic. 1998. « Effect of Polyethylene Glycol on the Chelation of Trace Elements by Tannins. », *Toxic Plants and Other Natural Toxicants*, 111-14. <https://books.google.ca/books?hl=fr&lr=&id=5saa1x0y5iIC&oi=fnd&pg=PA111&dq=>

- Effect+of+Polyethylene+Glycol+on+the+Chelation+of+Trace+Elements+by+Tannins.  
&ots=NkQIQDKBjd&sig=15PZnOVHeo2xS00T298qMszhigY
- Kaise, Toshikazu, Shigenobu Watanabe, et Kazutoshi Itoh. 1985. « The acute toxicity of arsenobetaine ». *Chemosphere* 14 (9): 1327-32. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(85\)90153-5](https://doi.org/10.1016/0045-6535(85)90153-5).
- Kamiya, Takehiro, Mayuki Tanaka, Namiki Mitani, Jian Feng Ma, Masayoshi Maeshima, et Toru Fujiwara. 2009. « NIP1;1, an Aquaporin Homolog, Determines the Arsenite Sensitivity of Arabidopsis Thaliana ». *Journal of Biological Chemistry* 284 (4): 2114-20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806881200>.
- Kao, C. M., S. C. Chen, J. K. Liu, et M. J. Wu. 2001. « Evaluation of TCDD biodegradability under different redox conditions ». *Chemosphere* 44 (6): 1447-54. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00464-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00464-1).
- Karimi, Nooshin. 2013. « Comparative Phytoremediation of Chromium-Contaminated Soils by Alfalfa (Medicago sativa) and Sorghum bicolor (L) Moench ». *International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences (IJSRES)* 1 (3): p.44-49. <http://d.researchbib.com/f/5nq3q3Yzyp3WjqJVhL29gY3IjoT9uMUZipTSjMKWmY0yXH1WSH19WFyAFEIZgGJSIzWnKZI9WFyAFEIZgZGZgZGNhpTEz.pdf>
- Karlsson, Stefan, Viktor Sjöberg, et Anna Ogar. 2015. « Comparison of MP AES and ICP-MS for analysis of principal and selected trace elements in nitric acid digests of sunflower (Helianthus annuus) ». *Talanta* 135: 124-32. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.12.015>.
- Kawahigashi, Hiroyuki. 2009. « Transgenic plants for phytoremediation of herbicides ». *Current Opinion in Biotechnology, Food biotechnology / Plant biotechnology*, 20 (2): 225-30. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.01.010>.
- Kertulis-Tartar, G. M., L. Q. Ma, C. Tu, et T. Chirenje. 2006. « Phytoremediation of an Arsenic-Contaminated Site Using Pteris vittata L.: A Two-Year Study ». *International Journal of Phytoremediation* 8 (4): 311-22. <https://doi.org/10.1080/15226510600992873>.
- Kessel, Maris, Su Xian Liu, An Xu, Regina Santella, et Tom K. Heil. 2002. « Arsenic Induces Oxidative DNA Damage in Mammalian Cells ». In *Oxygen/Nitrogen Radicals: Cell Injury and Disease* 301-8. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1087-1\\_34](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1087-1_34).
- Kidd, Petra, Michel Mench, Vanessa Álvarez-López, Valérie Bert, Ioannis Dimitriou, Wolfgang Friesl-Hanl, Rolf Herzig, et al. 2015. « Agronomic Practices for Improving Gentle Remediation of Trace Element-Contaminated Soils ». *International Journal of Phytoremediation* 17 (11): 1005-37. <https://doi.org/10.1080/15226514.2014.1003788>.
- Kikuchi, Ryunosuke. 1998. « Vitrification Process for Treatment of Sewage Sludge and Incineration Ash ». *Journal of the Air & Waste Management Association* 48 (11): 1112-15. <https://doi.org/10.1080/10473289.1998.10463766>.
- Kim, Hekap, Dong-Jin Kim, Jin-Hoi Koo, Jeong-Gue Park, et Yong-Chul Jang. 2007. « Distribution and mobility of chromium, copper, and arsenic in soils collected near CCA-treated wood structures in Korea ». *Science of The Total Environment* 374 (2-3): 273-81. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.12.047>.
- Koch, Iris, Jörg Feldmann, Lixia Wang, Paul Andrewes, Ken J Reimer, et William R Cullen. 1999. « Arsenic in the Meager Creek hot springs environment, British Columbia, Canada ». *Science of The Total Environment* 236 (1): 101-17. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00273-9](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00273-9).

- Koch, Iris, Lixia Wang, Chris A. Ollson, William R. Cullen, et Kenneth J. Reimer. 2000. « The Predominance of Inorganic Arsenic Species in Plants from Yellowknife, Northwest Territories, Canada ». *Environmental Science & Technology* 34 (1): 22-26. <https://doi.org/10.1021/es9906756>.
- Köller, G., M. Möder, et K. Czihal. 2000. « Peroxidative Degradation of Selected PCB: A Mechanistic Study ». *Chemosphere* 41 (12): 1827-34. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00132-6](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00132-6).
- Kuznetsova, Alexandra, Per B. Brockhoff, et Rune Haubo Bojesen Christensen. 2017. « lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models ». *Journal of Statistical Software* 82 (13). <https://doi.org/10.18637/jss.v082.i13>.
- Laha, Shonali, Berrin Tansel, et Achara Ussawarujikulchai. 2009. « Surfactant–soil interactions during surfactant-amended remediation of contaminated soils by hydrophobic organic compounds: A review ». *Journal of Environmental Management* 90 (1): 95-100. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2008.08.006>.
- Lamparski, Lester L., Rudolph H. Stehl, et Robert L. Johnson. 1980. « Photolysis of pentachlorophenol-treated wood. Chlorinated dibenzo-p-dioxin formation ». *Environmental Science & Technology* 14 (2): 196-200. <https://doi.org/10.1021/es60162a001>.
- Landberg, Tommy, et Maria Greger. 2004. « No Phytochelatin (PC2 and PC3) Detected in *Salix Viminalis* ». *Physiologia Plantarum* 121 (3): 481-87. <https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.00347.x>.
- Langmead, Ben, et Steven L. Salzberg. 2012. « Fast Gapped-Read Alignment with Bowtie 2 ». *Nature Methods* 9 (4): 357-59. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
- Lauron-Moreau, Aurélien, Frédéric E. Pitre, George W. Argus, Michel Labrecque, et Luc Brouillet. 2015. « Phylogenetic Relationships of American Willows (*Salix* L., Salicaceae) ». *PLOS ONE* 10 (4): e0121965. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121965>.
- Lee, Rb. 1982. « Selectivity and Kinetics of Ion Uptake by Barley Plants Following Nutrient Deficiency ». *Annals of Botany* 50 (4): 429-49. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a086383>.
- Leng, Ning, John A. Dawson, James A. Thomson, Victor Ruotti, Anna I. Rissman, Bart M. G. Smits, Jill D. Haag, Michael N. Gould, Ron M. Stewart, et Christina Kendziorski. 2013. « EBSeq: An Empirical Bayes Hierarchical Model for Inference in RNA-Seq Experiments ». *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt087>.
- Lessl, Jason T., Lena Q. Ma, Bala Rathinasabapathi, et Charles Guy. 2013. « Novel Phytase from *Pteris vittata* Resistant to Arsenate, High Temperature, and Soil Deactivation ». *Environmental Science & Technology* 47 (5): 2204-11. <https://doi.org/10.1021/es3022073>.
- Li, Ren-Ying, Yukiko Ago, Wen-Ju Liu, Namiki Mitani, Jörg Feldmann, Steve P. McGrath, Jian Feng Ma, et Fang-Jie Zhao. 2009. « The Rice Aquaporin Lsi1 Mediates Uptake of Methylated Arsenic Species ». *Plant Physiology* 150 (4): 2071-80. <https://doi.org/10.1104/pp.109.140350>.
- Lindgreen, Stinus. 2012. « AdapterRemoval: easy cleaning of next-generation sequencing reads ». *BMC Research Notes* 5: 337. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-337>.
- Liu, Jie, Yuanfu Lu, Qin Wu, Robert A. Goyer, et Michael P. Waalkes. 2008. « Mineral Arsenicals in Traditional Medicines: Orpiment, Realgar, and Arsenolite ». *Journal of*

- Pharmacology and Experimental Therapeutics* 326 (2): 363-68. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.139543>.
- Liu, W.-J., Y.-G. Zhu, F. A. Smith, et S. E. Smith. 2004. « Do Phosphorus Nutrition and Iron Plaque Alter Arsenate (As) Uptake by Rice Seedlings in Hydroponic Culture? » *New Phytologist* 162 (2): 481-88. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01035.x>.
- Liu, Y., H. B. Wang, M. H. Wong, et Z. H. Ye. 2009. « The role of arsenate reductase and superoxide dismutase in As accumulation in four Pteris species ». *Environment International*, Arsenic geochemistry, transport mechanism in the soil-plant system, human and animal health issues, 35 (3): 491-95. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.07.012>.
- Liu, Zijuan, Jian Shen, Jennifer M. Carbrey, Rita Mukhopadhyay, Peter Agre, et Barry P. Rosen. 2002. « Arsenite Transport by Mammalian Aquaglyceroporins AQP7 and AQP9 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (9): 6053-58. <https://doi.org/10.1073/pnas.092131899>.
- Loake, Gary, et Murray Grant. 2007. « Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists ». *Current Opinion in Plant Biology*, Cell Signalling and Gene Regulation Edited by Jian-Kang Zhu and Ko Shimamoto, 10 (5): 466-72. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.08.008>.
- Logoteta, B., X. Y. Xu, M. R. Macnair, S. P. McGrath, et F. J. Zhao. 2009. « Arsenite Efflux Is Not Enhanced in the Arsenate-Tolerant Phenotype of *Holcus Lanatus* ». *New Phytologist* 183 (2): 340-48. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02841.x>.
- López, Martha L., Jose R. Peralta-Videa, Tenoch Benitez, et Jorge L. Gardea-Torresdey. 2005. « Enhancement of lead uptake by alfalfa (*Medicago sativa*) using EDTA and a plant growth promoter ». *Chemosphere* 61 (4): 595-98. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.02.028>.
- Lotfy, S. M., A. Z. Mostafa, S. M. Lotfy, et A. Z. Mostafa. 2014. « Phytoremediation of Contaminated Soil with Cobalt and Chromium ». *Journal of Geochemical Exploration Part B* (144): 367-73. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2013.07.003>.
- Lu, Yu-Ping, Ze-Sheng Li, et Philip A. Rea. 1997. « AtMRP1 Gene of *Arabidopsis* Encodes a Glutathione S-Conjugate Pump: Isolation and Functional Definition of a Plant ATP-Binding Cassette Transporter Gene ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (15): 8243-48. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.15.8243>
- Lucas, Alfred, et John Harris. 2012. « Ancient Egyptian Materials and Industries ». *Courier Corporation*. <http://www.bcin.ca/bcin/detail.app?id=51565>.
- Ma, Jian Feng, Kazunori Tamai, Masahiko Ichii, et Guo Feng Wu. 2002. « A Rice Mutant Defective in Si Uptake ». *Plant Physiology* 130 (4): 2111-17. <https://doi.org/10.1104/pp.010348>.
- Ma, Jian Feng, Kazunori Tamai, Naoki Yamaji, Namiki Mitani, Saeko Konishi, Maki Katsuhara, Masaji Ishiguro, Yoshiko Murata, et Masahiro Yano. 2006. « A Silicon Transporter in Rice ». *Nature* 440 (7084): 688-91. <https://doi.org/10.1038/nature04590>.
- Ma, Jian Feng, Naoki Yamaji, Namiki Mitani, Kazunori Tamai, Saeko Konishi, Toru Fujiwara, Maki Katsuhara, et Masahiro Yano. 2007a. « An Efflux Transporter of Silicon in Rice ». *Nature* 448 (7150): 209-12. <https://doi.org/10.1038/nature05964>.
- . 2007b. « An Efflux Transporter of Silicon in Rice ». *Nature* 448 (7150): 209-12. <https://doi.org/10.1038/nature05964>.

- Ma, Jian Feng, Naoki Yamaji, Namiki Mitani, Xiao-Yan Xu, Yu-Hong Su, Steve P. McGrath, et Fang-Jie Zhao. 2008. « Transporters of Arsenite in Rice and Their Role in Arsenic Accumulation in Rice Grain ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (29): 9931-35. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802361105>.
- Ma, Lena Q., Kenneth M. Komar, Cong Tu, Weihua Zhang, Yong Cai, et Elizabeth D. Kennelley. 2001. « A Fern That Hyperaccumulates Arsenic ». *Nature* 409 (6820): 579-579. <https://doi.org/10.1038/35054664>.
- MacMillan, Colleen P., Shawn D. Mansfield, Zbigniew H. Stachurski, Rob Evans, et Simon G. Southerton. 2010. « Fasciclin-like Arabinogalactan Proteins: Specialization for Stem Biomechanics and Cell Wall Architecture in Arabidopsis and Eucalyptus ». *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 62 (4): 689-703. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04181.x>.
- Macnair, Mark R., et Quinton Cumbes. 1987. « Evidence That Arsenic Tolerance in *Holcus Lanatus* L. Is Caused by an Altered Phosphate Uptake System ». *New Phytologist* 107 (2): 387-94. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1987.tb00190.x>.
- Mahar, Amanullah, Ping Wang, Amjad Ali, Mukesh Kumar Awasthi, Altaf Hussain Lahori, Quan Wang, Ronghua Li, et Zengqiang Zhang. 2016. « Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 126: 111-21. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.023>.
- Małachowska, Jutysz Anna, et Anna Gnida. 2015. « Mechanisms of stress avoidance and tolerance by plants used in phytoremediation of heavy metals / Mechanizmy unikania i tolerowania stresu przez rośliny używane w fitoremediacji metali ciężkich ». *Archives of Environmental Protection* 0 (0). <https://doi.org/10.1515/aep-2015-0045>.
- Mandal, Badal Kumar, et Kazuo T Suzuki. 2002. « Arsenic round the world: a review ». *Talanta* 58 (1): 201-35. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(02\)00268-0](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00268-0).
- Mari, Francesco, Aldo Poletti, Donatella Lippi, et Elisabetta Bertol. 2006. « The Mysterious Death of Francesco I de' Medici and Bianca Cappello: An Arsenic Murder? ». *BMJ* 333 (7582): 1299-1301. <https://doi.org/10.1136/bmj.38996.682234.AE>.
- Marques, Ana P. G. C., António O. S. S. Rangel, et Paula M. L. Castro. 2011. « Remediation of Heavy Metal Contaminated Soils: An Overview of Site Remediation Techniques ». *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 41 (10): 879-914. <https://doi.org/10.1080/10643380903299517>.
- Martinson, Carol A., et K. J. Reddy. 2009. « Adsorption of arsenic(III) and arsenic(V) by cupric oxide nanoparticles ». *Journal of Colloid and Interface Science* 336 (2): 406-11. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.04.075>.
- Mascher, René, Bärbel Lippmann, Sylvia Holzinger, et Hans Bergmann. 2002. « Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants ». *Plant Science* 163 (5): 961-69. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00245-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00245-5).
- Mawlong, Ibandalin, M. S. Sujith Kumar, et Dhiraj Singh. 2016. « Furan Fatty Acids: Their Role in Plant Systems ». *Phytochemistry Reviews* 15 (1): 121-27. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9388-7>.
- McDonald, Mark, Isabelle Mila, et Augustin Scalbert. 1996. « Precipitation of Metal Ions by Plant Polyphenols: Optimal Conditions and Origin of Precipitation ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (2): 599-606. <https://doi.org/10.1021/jf950459q>.

- Meharg, A. A. 1994. « Integrated Tolerance Mechanisms: Constitutive and Adaptive Plant Responses to Elevated Metal Concentrations in the Environment ». *Plant, Cell & Environment* 17 (9): 989-93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1994.tb02032.x>.
- Meharg, A. A., et M. R. Macnair. 1992. « Suppression of the High Affinity Phosphate Uptake System: A Mechanism of Arsenate Tolerance in *Holcus Lanatus* L. » *Journal of Experimental Botany* 43 (4): 519-24. <https://doi.org/10.1093/jxb/43.4.519>.
- Meharg, Andrew A., et Jeanette Hartley-Whitaker. 2002. « Arsenic Uptake and Metabolism in Arsenic Resistant and Nonresistant Plant Species ». *New Phytologist* 154 (1): 29-43. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00363.x>.
- Meharg, Andrew A., et Mark R. Macnair. 1991. « The Mechanisms of Arsenate Tolerance in *Deschampsia Cespitosa* (L.) Beauv. and *Agrostis Capillaris* L. » *New Phytologist* 119 (2): 291-97. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1991.tb01033.x>.
- Mench, Michel, Jean-Paul Schwitzguébel, Peter Schroeder, Valérie Bert, Stanislaw Gawronski, et Satish Gupta. 2009. « Assessment of Successful Experiments and Limitations of Phytotechnologies: Contaminant Uptake, Detoxification and Sequestration, and Consequences for Food Safety ». *Environmental Science and Pollution Research International* 16 (7): 876-900. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0252-z>.
- Menzel, Daniel B., Hisham K. Hamadeh, Edward Lee, Dianne M. Meacher, Victor Said, Ronald E. Rasmussen, Howard Greene, et Randy Neal Roth. 1999. « Arsenic binding proteins from human lymphoblastoid cells ». *Toxicology Letters* 105 (2): 89-101. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(98\)00380-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(98)00380-4).
- Merkl, Nicole, Rainer Schultze-Kraft, et Marianela Arias. 2005. « Influence of fertilizer levels on phytoremediation of crude oil-contaminated soils with the tropical pasture grass *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf ». *International Journal of Phytoremediation* 7 (3): 217-30. <https://doi.org/10.1080/16226510500215662>.
- Mi, Huaiyu, Nan Guo, Anish Kejariwal, et Paul D. Thomas. 2007. « PANTHER Version 6: Protein Sequence and Function Evolution Data with Expanded Representation of Biological Pathways ». *Nucleic Acids Research* 35 (suppl 1): D247-52. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl869>.
- Mi, Huaiyu, Anushya Muruganujan, et Paul D. Thomas. 2013. « PANTHER in 2013: Modeling the Evolution of Gene Function, and Other Gene Attributes, in the Context of Phylogenetic Trees ». *Nucleic Acids Research* 41 (D1): D377-86. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1118>.
- Minocha, Rakesh, P. Thangavel, Om Parkash Dhankher, et Stephanie Long. 2008. « Separation and quantification of monothiols and phytochelatins from a wide variety of cell cultures and tissues of trees and other plants using high performance liquid chromatography ». *Journal of Chromatography A* 1207 (1): 72-83. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.023>.
- Mishra, Seema, Gerd Wellenreuther, Jürgen Mattusch, Hans-Joachim Stärk, et Hendrik Küpper. 2013. « Speciation and Distribution of Arsenic in the Non-Hyperaccumulator Macrophyte *Ceratophyllum Demersum* L. » *Plant Physiology*, septembre, pp.113.224303. <https://doi.org/10.1104/pp.113.224303>.
- Mleczek, Mirosław, Zygmunt Kaczmarek, Zuzanna Magdziak, et Piotr K. Golinski. 2010. « Hydroponic estimation of heavy metal accumulation by different genotypes of *Salix* ». *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 45 (5): 569-78. <https://doi.org/10.1080/10934521003595316>.

- Moreno-Jiménez, E., E. Esteban, T. Fresno, C. López de Egea, et J.M. Peñalosa. 2010. « Hydroponics as a valid tool to assess arsenic availability in mine soils ». *Chemosphere* 79 (5): 513-17. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.02.034>.
- Morgan, P. W., et M. C. Drew. 1997. « Ethylene and plant responses to stress ». *Physiologia Plantarum* 100 (3): 620-30. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb03068.x>
- Mudroch, Alena, et T. A. Clair. 1986. « Transport of arsenic and mercury from gold mining activities through an aquatic system ». *Science of The Total Environment* 57 (décembre): 205-16. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(86\)90024-0](https://doi.org/10.1016/0048-9697(86)90024-0).
- Mueller, James G., Peter J. Chapman, et P. Hap Pritchard. 1989. « Creosote-contaminated sites. Their potential for bioremediation ». *Environmental Science & Technology* 23 (10): 1197-1201. <https://doi.org/10.1021/es00068a003>.
- Mukhopadhyay, Rita, et Barry P Rosen. 2002. « Arsenate reductases in prokaryotes and eukaryotes. » *Environmental Health Perspectives* 110 (Suppl 5): 745-48. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110s5745>
- Mulligan, Catherine N., Raymond N. Yong, Bernard F. Gibbs, Susan James, et H. P. J. Bennett. 1999. « Metal Removal from Contaminated Soil and Sediments by the Biosurfactant Surfactin ». *Environmental Science & Technology* 33 (21): 3812-20. <https://doi.org/10.1021/es9813055>.
- Natarajan, Seenivasan, Robert H. Stamps, Uttam K. Saha, et Lena Q. Ma. 2009. « Effects of Nitrogen and Phosphorus Levels, and Frond-Harvesting on Absorption, Translocation and Accumulation of Arsenic by Chinese Brake Fern (pteris Vittata L.) ». *International Journal of Phytoremediation* 11 (4): 313-28. <https://doi.org/10.1080/15226510802564918>.
- Neilson, Julia W., Janick F. Artiola, et Raina M. Maier. 2003. « Characterization of Lead Removal from Contaminated Soils by Nontoxic Soil-Washing Agents ». *Journal of Environmental Quality* 32 (3): 899-908. <https://doi.org/10.2134/jeq2003.8990>.
- Neubauer, O. 1947. « Arsenical Cancer: A Review ». *British Journal of Cancer* 1 (2): 192-251.
- Ng. 2005. « Environmental Contamination of Arsenic and its Toxicological Impact on Humans ». *Environmental Chemistry* 2 (3): 146-60. <https://doi.org/10.1071/EN05062>
- Niazi, Nabeel Khan, Irshad Bibi, Ayesha Fatimah, Muhammad Shahid, Muhammad Tariq Javed, Hailong Wang, Yong Sik Ok, et al. 2017. « Phosphate-assisted phytoremediation of arsenic by Brassica napus and Brassica juncea: Morphological and physiological response ». *International Journal of Phytoremediation* 19 (7): 670-78. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1278427>.
- Nickson, R. T., J. M. McArthur, P. Ravenscroft, W. G. Burgess, et K. M. Ahmed. 2000. « Mechanism of arsenic release to groundwater, Bangladesh and West Bengal ». *Applied Geochemistry* 15 (4): 403-13. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(99\)00086-4](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(99)00086-4).
- Nico, P.S., S.E. Fendorf, Y.W. Lowney, S.E. Holm, et M.V. Ruby. 2004. « Chemical Structure of Arsenic and Chromium in CCA-Treated Wood: Implications of Environmental Weathering ». *Environmental Science and Technology* 38 (19): 5253-60. <https://doi.org/10.1021/es0351342>.
- Nieuwoudt, Claudine, Laura P. Quinn, Rialet Pieters, Ilse Jordaan, Maret Visser, Henrik Kylin, Anders R. Borgen, John P. Giesy, et Henk Bouwman. 2009. « Dioxin-like Chemicals in Soil and Sediment from Residential and Industrial Areas in Central South Africa ». *Chemosphere* 76 (6): 774-83. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.04.064>.

- P., Davis Allen, et Hotha Bhaumik V. 1998. « Washing of Various Lead Compounds from a Contaminated Soil Column ». *Journal of Environmental Engineering* 124 (11): 1066-75. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(1998\)124:11\(1066\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(1998)124:11(1066)).
- Pagé, Antoine P., Étienne Yergeau, et Charles W. Greer. 2015. « *Salix Purpurea* Stimulates the Expression of Specific Bacterial Xenobiotic Degradation Genes in a Soil Contaminated with Hydrocarbons ». *PLOS ONE* 10 (7): e0132062. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132062>.
- Pandey, Gunjan, Debarati Paul, et Rakesh K. Jain. 2005. « Conceptualizing “suicidal genetically engineered microorganisms” for bioremediation applications ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 327 (3): 637-39. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.12.080>.
- Papassiopi, N., S. Tambouris, et A. Kontopoulos. 1999. « Removal of Heavy Metals from Calcareous Contaminated Soils by EDTA Leaching ». *Water Air and Soil Pollution* 109 (1-4): 1-15. <https://doi.org/10.1023/A:1005089515217>.
- Paul, Debarati, Gunjan Pandey, et Rakesh K. Jain. 2005. « Suicidal Genetically Engineered Microorganisms for Bioremediation: Need and Perspectives ». *BioEssays* 27 (5): 563-73. <https://doi.org/10.1002/bies.20220>.
- Pedron, F., G. Petruzzelli, M. Barbafieri, et E. Tassi. 2009. « Strategies to use phytoextraction in very acidic soil contaminated by heavy metals ». *Chemosphere* 75 (6): 808-14. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.044>.
- Perttu, K. L., et P. J. Kowalik. 1997. « *Salix* vegetation filters for purification of waters and soils ». *Biomass and Bioenergy* 12 (1): 9-19. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(96\)00063-3](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(96)00063-3).
- Peters, R. W. 1999. « Chelant Extraction of Heavy Metals from Contaminated Soils ». *Journal of Hazardous Materials* 66 (1-2): 151-210. [https://doi.org/10.1016/S0304-3894\(99\)00010-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3894(99)00010-2).
- Picault, N., A.C. Cazalé, A. Beyly, S. Cuié, P. Carrier, D.T. Luu, C. Forestier, et G. Peltier. 2006. « Chloroplast targeting of phytochelatin synthase in *Arabidopsis*: effects on heavy metal tolerance and accumulation ». *Biochimie* 88 (11): 1743-50. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.04.016>.
- Pichtel, J., et T.m. Pichtel. 1997. « Comparison of Solvents for Ex Situ Removal of Chromium and Lead from Contaminated Soil ». *Environmental Engineering Science* 14 (2): 97-104. <https://doi.org/10.1089/ees.1997.14.97>.
- Pickering, Ingrid J., Roger C. Prince, Martin J. George, Robert D. Smith, Graham N. George, et David E. Salt. 2000. « Reduction and Coordination of Arsenic in Indian Mustard ». *Plant Physiology* 122 (4): 1171-78. <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1171>.
- Pickering, Ingrid J., Carrie Wright, Ben Bubner, Danielle Ellis, Michael W. Persans, Eileen Y. Yu, Graham N. George, Roger C. Prince, et David E. Salt. 2003. « Chemical Form and Distribution of Selenium and Sulfur in the Selenium Hyperaccumulator *Astragalus Bisulcatus* ». *Plant Physiology* 131 (3): 1460-67. <https://doi.org/10.1104/pp.014787>.
- Popovic, A., D. Djordjevic, et P. Polic. 2001. « Trace and Major Element Pollution Originating from Coal Ash Suspension and Transport Processes ». *Environment International* 26 (4): 251-55. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(00\)00114-8](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(00)00114-8).
- Poynton, Charissa Y., Jianwei W. Huang, Michael J. Blaylock, Leon V. Kochian, et Mark P. Elless. 2004. « Mechanisms of Arsenic Hyperaccumulation in *Pteris* Species: Root As



- Influx and Translocation ». *Planta* 219 (6): 1080-88. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1304-8>.
- Pulford, I. D., et C. Watson. 2003. « Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees—a review ». *Environment International* 29 (4): 529-40. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00152-6](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00152-6).
- Purdy, Jason J., et Lawrence B. Smart. 2008. « Hydroponic Screening of Shrub Willow (*Salix* Spp.) for Arsenic Tolerance and Uptake ». *International Journal of Phytoremediation* 10 (6): 515-28. <https://doi.org/10.1080/15226510802115000>.
- Quaghebeur, Mieke, et Zed Rengel. 2004. « Arsenic Uptake, Translocation and Speciation in *Pho1* and *Pho2* Mutants of *Arabidopsis Thaliana* ». *Physiologia Plantarum* 120 (2): 280-86. <https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.0240.x>.
- Raab, A., P. N. Williams, A. Meharg, et J. Feldmann. 2007. « Uptake and translocation of inorganic and methylated arsenic species by plants ». *Environmental Chemistry* 4 (3): 197-203. <https://doi.org/10.1071/EN06079>
- Rahman, Mohammad Mahmudur, Uttam Kumar Chowdhury, Subhash Chandra Mukherjee, Badal Kumar Mondal, Kunal Paul, Dilip Lodh, Bhajan Kumar Biswas, et al. 2001. « Chronic Arsenic Toxicity in Bangladesh and West Bengal, India—A Review and Commentary ». *Clinical Toxicology* 39 (7): 683-700. <https://doi.org/10.1081/CLT-100108509>.
- Rathore, S. S., Kapila Shekhawat, Anchal Dass, B. K. Kandpal, et V. K. Singh. 2017. « Phytoremediation Mechanism in Indian Mustard (*Brassica Juncea*) and Its Enhancement Through Agronomic Interventions ». *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, <https://doi.org/10.1007/s40011-017-0885-5>.
- Ratnaik, R. N. 2003. « Acute and Chronic Arsenic Toxicity ». *Postgraduate Medical Journal* 79 (933): 391-96. <https://doi.org/10.1136/pmj.79.933.391>.
- Reed Brian E., Carriere Patrick C., et Moore Roderic. 1996. « Flushing of a Pb(II) Contaminated Soil Using HCl, EDTA, and CaCl<sub>2</sub> ». *Journal of Environmental Engineering* 122 (1): 48-50. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(1996\)122:1\(48\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(1996)122:1(48)).
- Rehman, A. (Punjab Univ, F. R. (Government Coll Univ Shakoori, et A. R. (Punjab Univ Shakoori. 2008. « Heavy metals resistant rotifers from a Chromium contaminated wastewater can help in environmental clean-up ». *Pakistan Journal of Zoology (Pakistan)*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=PK2009001197>.
- Risse, Guenter B. 1994. *History of western medicine from Hippocrates to germ theory*. The Cambridge World History of Human Disease. <https://doi.org/10.1017/CHOL9780521332866.003>
- Robinson, B. H., A. Chiarucci, R. R. Brooks, D. Petit, J. H. Kirkman, P. E. H. Gregg, et V. De Dominicis. 1997. « The nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii* as a potential agent for phytoremediation and phytomining of nickel ». *Journal of Geochemical Exploration* 59 (2): 75-86. [https://doi.org/10.1016/S0375-6742\(97\)00010-1](https://doi.org/10.1016/S0375-6742(97)00010-1).
- Robinson, Brett H., Tessa M. Mills, Daniel Petit, Lindsay E. Fung, Steve R. Green, et Brent E. Clothier. 2000. « Natural and Induced Cadmium-Accumulation in Poplar and Willow: Implications for Phytoremediation ». *Plant and Soil* 227 (1-2): 301-6. <https://doi.org/10.1023/A:1026515007319>.

- Rodríguez-Lado, Luis, Guifan Sun, Michael Berg, Qiang Zhang, Hanbin Xue, Quanmei Zheng, et C. Annette Johnson. 2013. « Groundwater Arsenic Contamination Throughout China ». *Science* 341 (6148): 866-68. <https://doi.org/10.1126/science.1237484>.
- Rodríguez-Ortiz, J. C., R. D. Valdez-Cepeda, J. L. Lara-Mireles, H. Rodríguez-Fuentes, R. E. Vázquez-Alvarado, R. Magallanes-Quintanar, et J. L. García-Hernández. 2006. « Soil Nitrogen Fertilization Effects on Phytoextraction of Cadmium and Lead by Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) ». *Bioremediation Journal* 10 (3): 105-14. <https://doi.org/10.1080/10889860600939815>.
- Rodushkin, Ilia, Thomas Ruth, et Åsa Huhtasaari. 1999. « Comparison of two digestion methods for elemental determinations in plant material by ICP techniques ». *Analytica Chimica Acta* 378 (1): 191-200. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00635-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00635-7).
- Rudnick, R. L., et S. Gao. 2003. « 3.01 - Composition of the Continental Crust ». In *Treatise on Geochemistry*, édité par Heinrich D. Holland et Karl K. Turekian, 1-64. Oxford: Pergamon. <https://doi.org/10.1016/B0-08-043751-6/03016-4>.
- Sahoo, Prafulla Kumar, et Kangjoo Kim. 2013. « A Review of the Arsenic Concentration in Paddy Rice from the Perspective of Geoscience ». *Geosciences Journal* 17 (1): 107-22. <https://doi.org/10.1007/s12303-013-0004-4>.
- Salido, Arthur L., Kelly L. Hasty, Jae-Min Lim, et David J. Butcher. 2003. « Phytoremediation of Arsenic and Lead in Contaminated Soil Using Chinese Brake Ferns (*Pteris vittata*) and Indian Mustard (*Brassica juncea*) ». *International Journal of Phytoremediation* 5 (2): 89-103. <https://doi.org/10.1080/713610173>.
- Salmikow, Konstantin, et Anatoly Zhitkovich. 2008. « Genetic and Epigenetic Mechanisms in Metal Carcinogenesis and Cocarcinogenesis: Nickel, Arsenic, and Chromium ». *Chemical Research in Toxicology* 21 (1): 28-44. <https://doi.org/10.1021/tx700198a>.
- Salt, D. E., et W. E. Rauser. 1995. « MgATP-Dependent Transport of Phytochelatins Across the Tonoplast of Oat Roots ». *Plant Physiology* 107 (4): 1293-1301. <https://doi.org/10.1104/pp.107.4.1293>.
- Salt, David E., Michael Blaylock, Nanda P. B. A. Kumar, Viatcheslav Dushenkov, Burt D. Ensley, Ilan Chet, et Ilya Raskin. 1995. « Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants ». *Nature Biotechnology* 13 (5): 468-74. <https://doi.org/10.1038/nbt0595-468>.
- Saxe, Jennifer K., Eric J. Wannamaker, Scott W. Conklin, Todd F. Shupe, et Barbara D. Beck. 2007. « Evaluating landfill disposal of chromated copper arsenate (CCA) treated wood and potential effects on groundwater: Evidence from Florida ». *Chemosphere* 66 (3): 496-504. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.05.063>.
- Schmöger, Marcus E. V., Matjaz Oven, et Erwin Grill. 2000. « Detoxification of Arsenic by Phytochelatins in Plants ». *Plant Physiology* 122 (3): 793-802. <https://doi.org/10.1104/pp.122.3.793>.
- Schnoor, Jerald. 2000. « Phytostabilization of metals using hybrid poplar trees ». *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean-up the environment*, 2000, New York, John Wiley & Sons, Inc édition.
- Schnoor, J.L. 1997. « Phytoremediation. Technology evaluation report TE-98-01 ». Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center. E Series TE-98-101. [https://clu-in.org/download/toolkit/phyto\\_e.pdf](https://clu-in.org/download/toolkit/phyto_e.pdf)

- Scilabra, Patrick, Giancarlo Terraneo, et Giuseppe Resnati. 2017. « Fluorinated elements of Group 15 as pnictogen bond donor sites ». *Journal of Fluorine Chemistry*, Special issue in honor of Antonio Togni, 203: 62-74. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2017.10.002>.
- Sharma, Babita, Arun Kumar Dangi, et Pratyooosh Shukla. 2018. « Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review ». *Journal of Environmental Management* 210: 10-22. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.12.075>.
- Shelmerdine, Paula A., Colin R. Black, Steve P. McGrath, et Scott D. Young. 2009. « Modelling phytoremediation by the hyperaccumulating fern, *Pteris vittata*, of soils historically contaminated with arsenic ». *Environmental Pollution*, Special Issue Section: Ozone and Mediterranean Ecology: Plants, People, Problems, 157 (5): 1589-96. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.12.029>.
- Shen, Shengwen, Xing-Fang Li, William R. Cullen, Michael Weinfeld, et X. Chris Le. 2013. « Arsenic Binding to Proteins ». *Chemical Reviews* 113 (10): 7769-92. <https://doi.org/10.1021/cr300015c>.
- Sheoran, V., A. S. Sheoran, et P. Poonia. 2009. « Phytomining: A review ». *Minerals Engineering* 22 (12): 1007-19. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2009.04.001>.
- Shri, Manju, Smita Kumar, Debasis Chakrabarty, Prabodh Kumar Trivedi, Shekhar Mallick, Prashant Misra, Devesh Shukla, et al. 2009. « Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (4): 1102-10. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.09.022>.
- Shu, W. S, Z. H Ye, C. Y Lan, Z. Q Zhang, et M. H Wong. 2001. « Acidification of lead/zinc mine tailings and its effect on heavy metal mobility ». *Environment International*, Environmental Geochemistry in the Tropics and Subtropics, 26 (5): 389-94. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(01\)00017-4](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(01)00017-4).
- Simón, M, F Martín, I Ortiz, I García, J Fernández, E Fernández, C Dorronsoro, et J Aguilar. 2001. « Soil pollution by oxidation of tailings from toxic spill of a pyrite mine ». *Science of The Total Environment* 279 (1): 63-74. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)00726-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)00726-4).
- Singh, Nandita, Anshita Raj, P.B. Khare, R.D. Tripathi, et Sarah Jamil. 2010. « Arsenic accumulation pattern in 12 Indian ferns and assessing the potential of *Adiantum capillus-veneris*, in comparison to *Pteris vittata*, as arsenic hyperaccumulator ». *Bioresource Technology* 101 (23): 8960-68. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.116>.
- Song, Won-Yong, Jiyoung Park, David G. Mendoza-Cózatl, Marianne Suter-Grotemeyer, Donghwan Shim, Stefan Hörtensteiner, Markus Geisler, et al. 2010. « Arsenic Tolerance in *Arabidopsis* Is Mediated by Two ABCC-Type Phytochelatin Transporters ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (49): 21187-92. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013964107>.
- Song, Won-Yong, Tomohiro Yamaki, Naoki Yamaji, Donghwi Ko, Ki-Hong Jung, Miho Fujii-Kashino, Gynheung An, Enrico Martinoia, Youngsook Lee, et Jian Feng Ma. 2014. « A Rice ABC Transporter, OsABCC1, Reduces Arsenic Accumulation in the Grain ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (44): 15699-704. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414968111>.
- Stoeva, N., M. Berova, et Z. Zlatev. 2003. « Physiological Response of Maize to Arsenic Contamination ». *Biologia Plantarum* 47 (3): 449-52. <https://doi.org/10.1023/B:BIOP.0000023893.12939.48>.

- Stolarski, Mariusz J., Stefan Szczukowski, Józef Tworkowski, Hanna Wróblewska, et Michał Krzyżaniak. 2011. « Short rotation willow coppice biomass as an industrial and energy feedstock ». *Industrial Crops and Products* 33 (1): 217-23. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.10.013>.
- Su, Jian-Qiang, Long-Jun Ding, Kai Xue, Huai-Ying Yao, John Quensen, Shi-Jie Bai, Wen-Xue Wei, et al. 2015. « Long-Term Balanced Fertilization Increases the Soil Microbial Functional Diversity in a Phosphorus-Limited Paddy Soil ». *Molecular Ecology* 24 (1): 136-50. <https://doi.org/10.1111/mec.13010>.
- Su, Yu-Hong, Steve P. McGrath, et Fang-Jie Zhao. 2009. « Rice Is More Efficient in Arsenite Uptake and Translocation than Wheat and Barley ». *Plant and Soil* 328 (1-2): 27-34. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0074-2>.
- Sun, Qin, Zhi Hong Ye, Xiao Rong Wang, et Ming Hung Wong. 2007. « Cadmium hyperaccumulation leads to an increase of glutathione rather than phytochelatins in the cadmium hyperaccumulator *Sedum alfredii* ». *Journal of Plant Physiology* 164 (11): 1489-98. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.10.001>.
- Sundaram, Sabarinath, Bala Rathinasabapathi, Lena Q. Ma, et Barry P. Rosen. 2008. « An Arsenate-Activated Glutaredoxin from the Arsenic Hyperaccumulator Fern *Pteris Vittata* L. Regulates Intracellular Arsenite ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (10): 6095-6101. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704149200>.
- Sylvain, Bart, Motelica-Heino Mikael, Miard Florie, Joussein Emmanuel, Soubrand Marilyne, Bourgerie Sylvain, et Morabito Domenico. 2016. « Phytostabilization of As, Sb and Pb by two willow species (*S. viminalis* and *S. purpurea*) on former mine technosols ». *CATENA*, 136: 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2015.07.008>.
- Szczukowski, S., M. Stolarski, J. Tworkowski, J. Przyborowski, et A. Klasa. 2005. « Productivity of Willow Coppice Plants Grown in Short Rotations. » *Plant, Soil and Environment* 51 (9): 423-30. <https://doi.org/10.17221/3607-PSE>
- Tame, Nigel W., Bogdan Z. Dlugogorski, et Eric M. Kennedy. 2007. « Formation of dioxins and furans during combustion of treated wood ». *Progress in Energy and Combustion Science* 33 (4): 384-408. <https://doi.org/10.1016/j.peccs.2007.01.001>.
- Tangahu, Bieby Voijant, Siti Rozaimah Sheikh Abdullah, Hassan Basri, Mushrifah Idris, Nurina Anuar, et Muhammad Mukhlisin. 2011. « A Review on Heavy Metals (As, Pb, and Hg) Uptake by Plants through Phytoremediation ». Research article. *International Journal of Chemical Engineering*. <https://doi.org/10.1155/2011/939161>.
- Thomas, Paul D., Michael J. Campbell, Anish Kejariwal, Huaiyu Mi, Brian Karlak, Robin Daverman, Karen Diemer, Anushya Muruganujan, et Apurva Narechania. 2003. « PANTHER: A Library of Protein Families and Subfamilies Indexed by Function ». *Genome Research* 13 (9): 2129-41. <https://doi.org/10.1101/gr.772403>.
- Tiwari, Sarita, Bijaya Ketan Sarangi, et Sanjog T. Thul. 2016. « Identification of arsenic resistant endophytic bacteria from *Pteris vittata* roots and characterization for arsenic remediation application ». *Journal of Environmental Management* 180: 359-65. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.05.029>.
- Tlustoš, Pavel, Jiřina Száková, Markéta Vysloužilová, Daniela Pavlíková, Jan Weger, et Hana Javorská. 2007a. « Variation in the uptake of Arsenic, Cadmium, Lead, and Zinc by different species of willows *Salix* spp. grown in contaminated soils ». *Central European Journal of Biology* 2 (2): 254-75. <https://doi.org/10.2478/s11535-007-0012-3>.

- . 2007b. « Variation in the Uptake of Arsenic, Cadmium, Lead, and Zinc by Different Species of Willows *Salix* Spp. Grown in Contaminated Soils ». *Central European Journal of Biology* 2 (2): 254-75. <https://doi.org/10.2478/s11535-007-0012-3>.
- Trapnell, Cole, Adam Roberts, Loyal Goff, Geo Pertea, Daehwan Kim, David R. Kelley, Harold Pimentel, Steven L. Salzberg, John L. Rinn, et Lior Pachter. 2012. « Differential Gene and Transcript Expression Analysis of RNA-Seq Experiments with TopHat and Cufflinks ». *Nature Protocols* 7 (3): 562-78. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.016>.
- Tripathi, Rudra D., Sudhakar Srivastava, Seema Mishra, Nandita Singh, Rakesh Tuli, Dharmendra K. Gupta, et Frans J.M. Maathuis. 2007. « Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants ». *Trends in Biotechnology* 25 (4): 158-65. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.02.003>.
- Tsai, Perng-Jy, Tung-Sheng Shih, Hsiao-Lung Chen, Wen-Jhy Lee, Ching-Huang Lai, et Saou-Hsing Liou. 2004. « Assessing and predicting the exposures of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their carcinogenic potencies from vehicle engine exhausts to highway toll station workers ». *Atmospheric Environment* 38 (2): 333-43. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2003.08.038>.
- Unterbrunner, R., M. Puschenreiter, P. Sommer, G. Wieshammer, P. Tlustoš, M. Zupan, et W. W. Wenzel. 2007. « Heavy metal accumulation in trees growing on contaminated sites in Central Europe ». *Environmental Pollution* 148 (1): 107-14. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.10.035>.
- Uthus, Eric O. 1992. « Evidence for Arsenic Essentiality ». *Environmental Geochemistry and Health* 14 (2): 55-58. <https://doi.org/10.1007/BF01783629>.
- . 2003. « Arsenic Essentiality: A Role Affecting Methionine Metabolism ». *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* 16 (4): 345-55. <https://doi.org/10.1002/jtra.10044>.
- Vaissière, Thomas, Carla Sawan, et Zdenko Herceg. 2008. « Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing ». *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, Proceedings of the 5th International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations (ICEMHP), 659 (1): 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.02.004>.
- Vamerali, Teofilo, Marianna Bandiera, Lucia Coletto, Federica Zanetti, Nicholas M. Dickinson, et Giuliano Mosca. 2009. « Phytoremediation trials on metal- and arsenic-contaminated pyrite wastes (Torviscosa, Italy) ». *Environmental Pollution* 157 (3): 887-94. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.003>.
- Van Aken, Benoit. 2008. « Transgenic plants for phytoremediation: helping nature to clean up environmental pollution ». *Trends in Biotechnology* 26 (5): 225-27. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.02.001>.
- . 2009. « Transgenic plants for enhanced phytoremediation of toxic explosives ». *Current Opinion in Biotechnology*, Food biotechnology / Plant biotechnology, 20 (2): 231-36. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.01.011>.
- Van Den Berghe, Martin D., Heather E. Jamieson, et Michael J. Palmer. 2018. « Arsenic mobility and characterization in lakes impacted by gold ore roasting, Yellowknife, NWT, Canada ». *Environmental Pollution* 234: 630-41. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.062>.
- Venkatachalam, P., A. K. Srivastava, K. G. Raghothama, et S. V. Sahi. 2009. « Genes Induced in Response to Mercury-Ion-Exposure in Heavy Metal Hyperaccumulator *Sesbania*

- drummondii ». *Environmental Science & Technology* 43 (3): 843-50. <https://doi.org/10.1021/es801304n>.
- Verbruggen, Nathalie, Christian Hermans, et Henk Schat. 2009. « Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants ». *Current Opinion in Plant Biology*, 12 (3): 364-72. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.001>.
- Vetter, Walter, Sophia Laure, Christine Wendlinger, Axel Mattes, Andrew W. T. Smith, et David W. Knight. 2012. « Determination of Furan Fatty Acids in Food Samples ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 89 (8): 1501-8. <https://doi.org/10.1007/s11746-012-2038-6>.
- Vidali, M. 2001. « Bioremediation. An overview ». *Pure and Applied Chemistry* 73 (7): 1163–1172. <https://doi.org/10.1351/pac200173071163>.
- Visoottiviseth, P, K Francesconi, et W Sridokchan. 2002. « The potential of Thai indigenous plant species for the phytoremediation of arsenic contaminated land ». *Environmental Pollution* 118 (3): 453-61. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(01\)00293-7](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00293-7).
- Vollenweider, Pierre, Claudia Cosio, Madeleine S. Günthardt-Goerg, et Catherine Keller. 2006. « Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.): Part II Microlocalization and cellular effects of cadmium ». *Environmental and Experimental Botany* 58 (1–3): 25-40. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.06.012>.
- Walker, Stephen R., Michael B. Parsons, Heather E. Jamieson, et Antonio Lanzirrotti. 2009. « Arsenic mineralogy of near-surface tailings and soils: influences on arsenic mobility and bioaccessibility in the nova scotia gold mining districts ». *The Canadian Mineralogist* 47 (3): 533-56. <https://doi.org/10.3749/canmin.47.3.533>.
- Wan, Xiaoming, Mei Lei, et Tongbin Chen. 2015. « Cost-benefit calculation of phytoremediation technology for heavy-metal-contaminated soil ». *Science of The Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.080>.
- Wang, Junru, Fang-Jie Zhao, Andrew A. Meharg, Andrea Raab, Joerg Feldmann, et Steve P. McGrath. 2002. « Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*. uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation ». *Plant Physiology* 130 (3): 1552-61. <https://doi.org/10.1104/pp.008185>.
- Wang Li, Cui Na, Zhang KaiYue, Fan HaiYan, et Li TianLai. 2013. « Research advance of sucrose phosphate synthase (sps) in higher plant. » *International Journal of Agriculture and Biology* 15 (6): 1221-26. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=PK2014000606>
- Wang QingHai, et Que XiaoE. 2013. « Phytoremediation - a green approach to environmental clean-up. » *Zhongguo Shengtai Nongye Xuebao / Chinese Journal of Eco-Agriculture* 21 (2): 261-66. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20133121450>
- Wang, Suiling, et Catherine N. Mulligan. 2006. « Occurrence of arsenic contamination in Canada: Sources, behavior and distribution ». *Science of The Total Environment* 366 (2–3): 701-21. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.09.005>.
- Weider, B., et J. H. Fournier. 1999. « Activation Analyses of Authenticated Hairs of Napoleon Bonaparte Confirm Arsenic Poisoning ». *American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 20 (4): 378-82. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10624934>
- Williams, P. N., A. H. Price, A. Raab, S. A. Hossain, J. Feldmann, et A. A. Meharg. 2005. « Variation in Arsenic Speciation and Concentration in Paddy Rice Related to Dietary

- Exposure ». *Environmental Science & Technology* 39 (15): 5531-40. <https://doi.org/10.1021/es0502324>.
- Williamson, A., et M. S. Johnson. 1981. « Reclamation of Metalliferous Mine Wastes ». In *Effect of Heavy Metal Pollution on Plants: Metals in the Environment*. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-8099-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-94-009-8099-0_6).
- Winkel-Shirley, Brenda. 2002. « Biosynthesis of flavonoids and effects of stress ». *Current Opinion in Plant Biology* 5 (3): 218-23. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00256-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00256-X).
- Wolfe-Simon, Felisa, Jodi Switzer Blum, Thomas R. Kulp, Gwyneth W. Gordon, Shelley E. Hoeft, Jennifer Pett-Ridge, John F. Stolz, et al. 2011. « A Bacterium That Can Grow by Using Arsenic Instead of Phosphorus ». *Science* 332 (6034): 1163-66. <https://doi.org/10.1126/science.1197258>.
- Woolson, E. A. 1972. « Effects of Fertiliser Materials and Combinations on the Phytotoxicity, Availability and Content of Arsenic in Corn (Maize) ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 23 (12): 1477-81. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740231213>.
- . 1973. « Arsenic Phytotoxicity and Uptake in Six Vegetable Crops ». *Weed Science* 21 (6): 524-27. <https://doi.org/10.1017/S0043174500032409>
- Wrye, Lori Ann. 2008. « Distinguishing between Natural and Anthropogenic Sources of Arsenic in Soils from the Giant Mine, Northwest Territories and the North Brookfield Mine, Nova Scotia ». *Thesis*. <https://qspace.library.queensu.ca/handle/1974/1547>.
- Wu, JieHua, Ren Zhang, et Ross McC. Lilley. 2002. « Methylation of arsenic in vitro by cell extracts from bentgrass (*Agrostis tenuis*): effect of acute exposure of plants to arsenate ». *Functional Plant Biology* 29 (1): 73-80. <http://hdl.handle.net/10453/14986>
- Xu, Jinming, Yao Ye, Fang Huang, Hanwen Chen, Han Wu, Jian Huang, Jian Hu, Dajing Xia, et Yihua Wu. 2016. « Association between dioxin and cancer incidence and mortality: a meta-analysis ». *Scientific Reports* 6. <https://doi.org/10.1038/srep38012>.
- Xu, X. Y., S. P. McGrath, et F. J. Zhao. 2007. « Rapid Reduction of Arsenate in the Medium Mediated by Plant Roots ». *New Phytologist* 176 (3): 590-99. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02195.x>.
- Yadav, S. K. 2010. « Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants ». *South African Journal of Botany* 76 (2): 167-79. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.10.007>.
- Yan, Xiu-Ping, Robert Kerrich, et M. Jim Hendry. 2000. « Distribution of arsenic(III), arsenic(V) and total inorganic arsenic in porewaters from a thick till and clay-rich aquitard sequence, Saskatchewan, Canada ». *Geochimica et Cosmochimica Acta* 64 (15): 2637-48. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(00\)00380-X](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(00)00380-X).
- Yang, Sheng-Xiang, Bin Liao, Jin-tian Li, Tao Guo, et Wen-Sheng Shu. 2010. « Acidification, heavy metal mobility and nutrient accumulation in the soil–plant system of a revegetated acid mine wasteland ». *Chemosphere* 80 (8): 852-59. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.055>.
- Yanitch, Aymeric, Nicholas J. B. Brereton, Emmanuel Gonzalez, Michel Labrecque, Simon Joly, et Frederic E. Pitre. 2017. « Transcriptomic Response of Purple Willow (*Salix purpurea*) to Arsenic Stress ». *Frontiers in Plant Science* 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01115>.

- Zegers, I., J. C. Martins, R. Willem, L. Wyns, et J. Messens. 2001. « Arsenate Reductase from *S. Aureus* Plasmid PI258 Is a Phosphatase Drafted for Redox Duty ». *Nature Structural Biology* 8 (10): 843-47. <https://doi.org/10.1038/nsb1001-843>.
- Zhang, M., J. Zhang, L. L. Lu, Z. Q. Zhu, et X. E. Yang. 2016. « Functional Analysis of CAX2-like Transporters Isolated from Two Ecotypes of *Sedum Alfredii* ». *Biologia Plantarum* 60 (1): 37-47. <https://doi.org/10.1007/s10535-015-0557-3>.
- Zhang, Xin, Fang-Jie Zhao, Qing Huang, Paul N. Williams, Guo-Xin Sun, et Yong-Guan Zhu. 2009. « Arsenic Uptake and Speciation in the Rootless Duckweed *Wolffia Globosa* ». *New Phytologist* 182 (2): 421-28. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02758.x>.
- Zhao, F. J., S. J. Dunham, et S. P. McGrath. 2002. « Arsenic Hyperaccumulation by Different Fern Species ». *New Phytologist* 156 (1): 27-31. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00493.x>.
- Zhao, F. J., J. F. Ma, A. A. Meharg, et S. P. McGrath. 2009a. « Arsenic Uptake and Metabolism in Plants ». *New Phytologist* 181 (4): 777-794. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02716.x>.
- . 2009b. « Arsenic Uptake and Metabolism in Plants ». *New Phytologist* 181 (4): 777-94. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02716.x>.
- Zhao, Fang-Jie, Yukiko Ago, Namiki Mitani, Ren-Ying Li, Yu-Hong Su, Naoki Yamaji, Steve P. McGrath, et Jian Feng Ma. 2010. « The Role of the Rice Aquaporin Lsi1 in Arsenite Efflux from Roots ». *New Phytologist* 186 (2): 392-99. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03192.x>.
- Zhao, Shulan, Lina Jia, et Lian Duo. 2013. « The use of a biodegradable chelator for enhanced phytoextraction of heavy metals by *Festuca arundinacea* from municipal solid waste compost and associated heavy metal leaching ». *Bioresource Technology* 129: 249-55. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.075>.
- Zhu, Juanjuan, Nicolas Tremblay, et Yinli Liang. 2012. « Comparing SPAD and atLEAF values for chlorophyll assessment in crop species ». *Canadian Journal of Soil Science* 92 (4): 645-48. <https://doi.org/10.1139/CJSS2011-100>.
- Zhu, Yong-Guan, et Barry P Rosen. 2009. « Perspectives for genetic engineering for the phytoremediation of arsenic-contaminated environments: from imagination to reality? ». *Current Opinion in Biotechnology, Food biotechnology / Plant biotechnology*, 20 (2): 220-24. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.02.011>.