

Université de Montréal

Monoculture ou polyculture de *B. napus* et *S. nigra* 'S05' pour la phytoremédiation d'un sol
contaminé par du cuivre

Par

Aleena Massenet

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de M.Sc.
en Environnement et développement durable, option biogéochimie

Août 2020

© Aleena Massenet, 2020

Université de Montréal
Faculté des arts et des sciences

Ce mémoire intitulé

Monoculture ou polyculture de *B. napus* et *S. nigra* 'S05' pour la phytoremédiation d'un sol
contaminé par du cuivre

Présenté par

Aleena Massenet

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Pierre-Luc Chagnon
Président-rapporteur

Michel Labrecque
Directeur de recherche

Frédéric Pitre
Membre du jury

Résumé

La pollution de l'environnement est un problème croissant à l'échelle mondiale. La phytoremédiation est une technique *in situ* qui utilise les plantes et les micro-organismes qui leur sont associés pour extraire, dégrader ou immobiliser les contaminants environnementaux. Il s'agit d'une méthode moins coûteuse et moins nocive pour l'environnement que les autres techniques de restauration conventionnelles. Le cuivre est un élément trace (ET) souvent trouvé dans les friches industrielles ; il est peu mobile en raison de sa forte liaison avec la matière organique et les particules d'argile. Lorsqu'il est présent en excès, il est nocif pour la flore et la faune. Nous avons mené une expérience en conteneurs impliquant deux espèces distinctes, *Brassica napus* L., une plante agricole cultivée en grande quantité au Canada et *Salix nigra* 'S05', une espèce ligneuse à croissance rapide originaire du sud-est du Canada qui ont été cultivées ensemble ou séparément. Le but était de comparer leur potentiel de phytoremédiation de sol contaminé avec du cuivre suivant différentes concentrations. Pour les deux espèces, le cuivre était présent en plus grande quantité dans les racines. Nous avons constaté que la polyculture, en plus de produire le plus de biomasse en général, permettrait la stabilisation et l'extraction maximale de Cu et que l'arrachage de la plante entière serait le moyen le plus efficace d'assurer l'élimination maximale de Cu du sol. De nouvelles expériences devront être effectuées, car le déracinement des plantes présente de nouveaux défis et de nombreux autres facteurs doivent être étudiés et pris en considération.

Mots-clés : phytoremédiation, phytoextraction, cuivre, *Salix nigra*, *Brassica napus*, colza, saule, monoculture, polyculture, déracinage.

Abstract

Environmental pollution is a growing problem on a global scale. Phytoremediation, an approach that uses plants and their associated microorganisms to extract, degrade or immobilise environmental contaminants, is cheaper and less harmful to the environment compared to other conventional remediation techniques such as excavation. Furthermore, phytoremediation can help restore the ecological integrity of an ecosystem and allows for the revegetation of the sites. Copper is a trace element (TE) often found in brownfields which has a low mobility partly due to its strong bond with organic matter and clay particles. When present in excess, Cu is harmful to both flora and fauna. We experimented with two distinct species, *B. napus* L., an crop species which is grown in large quantities in Canada and *S. nigra* 'S05', a fast-growing woody species native to south eastern Canada in order to compare their phytoremediation potential in various levels of copper-contaminated soil when grown together or in monoculture. For both species, the copper was present in greater quantities in the roots as expected. We observed that the polyculture, in addition to producing the most overall biomass, would allow for the maximum stabilization and extraction of Cu of all treatments and that the removal of the entire plant would be the most efficient way of ensuring Cu removal from the soil. Further experiments will have to be done since the uprooting of plants would present new challenges and multiple other factors would have to be studied and taken into consideration.

Keywords : phytoremediation, phytoextraction, copper, *Salix nigra*, *Brassica napus*, willow, rapeseed, monocropping, polycropping, uprooting.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	ix
Liste des tables (dans l'article)	ix
Liste des figures	xi
Liste des figures (dans l'article)	xi
Liste des sigles et abréviations	xiii
Remerciements	xv
Chapitre 1 — Introduction	1
1.1. Mise en contexte et problématique.....	1
1.2. Objectifs et hypothèses.....	3
1.3. Pertinence et optimisation des expériences exploratoires	3
Chapitre 2 — Revue de littérature	5
2.1. Phytoremédiation.....	5
2.1.1. Type d'expérience de phytoremédiation	8
2.1.2. Gestion des résidus	9
2.1.3. Limitations	10
2.2. Le cuivre	11
2.2.1. Toxicologie.....	11
2.2.2. Propriétés chimiques.....	12

2.2.3. Normes environnementales.....	12
2.3. Adaptation des plantes au cuivre.....	13
2.3.1. Mécanismes d'absorption, de transport et d'accumulation du Cu dans les plantes ..	14
2.4. Espèces végétales les plus appropriées en phytoremédiation ..	17
2.4.1. Le saule.....	18
2.4.2. Le colza	18
2.4.3. Polyculture	19
Chapitre 3 — Méthodologie.....	21
3.1. Préparation de l'expérience.....	21
3.2. Protocole expérimental.....	22
3.3. Échantillonnages et analyses.....	23
3.3.1. Préparation, digestion et dosage des ET dans les échantillons végétaux.....	24
3.3.2. Préparation, digestion et dosage des ET dans les échantillons de sol.....	25
3.4. Statistique.....	25
Chapitre 4 – The impact of combining <i>Brassica napus</i> and <i>Salix nigra</i> 'S05' in copper contaminated soil	27
4.1. Abstract	27
4.2. Introduction.....	28
4.3. Material and methods.....	29
4.3.1. Growth conditions.....	29
4.3.2. Experimental design	30
4.3.3. Sampling and analysis	32
4.3.4. Statistical analysis.....	33
4.4. Results	33

4.4.1. Survival	33
4.4.2. Biomass	34
4.4.3. Copper concentration	36
4.4.4. Potential phytoextraction capacities	38
4.4.5. Soil structure	39
4.5. Discussion	39
4.5.1. Survival and biomass production	39
4.5.2. Phytoremediation potential	42
4.6. Conclusion	44
4.7. Interprétation et discussion des principaux résultats obtenus	45
Chapitre 5 — Conclusions et perspectives	47
Références bibliographiques	53
Annexe I – Plant establishment and health	63
Annexe II – Data tables	65
Annexe III – Normes environnementales québécoises appliquées au sol	67
Annexe IV – Photos supplémentaires	69

Liste des tableaux

Tableau 1. Analyse de sol à T0.....	22
--	----

Liste des tables (dans l'article)

Table 1. Soil analysis at T0.....	30
--	----

Table 2. Survival rate (%) of the <i>S. nigra</i> and of <i>B. napus</i> at the end of the growing season according to the various treatments.....	34
---	----

Liste des figures

Figure 1. Schéma de différents procédés de phytoremédiation.	6
Figure 2. Mécanismes impliqués dans la phytoremédiation ET du sol.....	14
Figure 3. Plan expérimental.	23

Liste des figures (dans l'article)

Figure 4. Experimental design.....	31
Figure 5. Comparison in the average above and below-ground biomass produced per m ² according to each treatment and each soil conditions.....	35
Figure 6. Comparison in the average aboveground biomass produced per m ² of each species according to each treatment condition (monoculture vs. polyculture) and each soil conditions.....	36
Figure 7. Differences in mean aboveground and root copper concentration per 63L container of the two monocultures vs the polyculture plant treatment for each soil conditions.	37
Figure 8. Comparison of mean copper accumulation (in grams) in aboveground and belowground biomass per hectare (10 000 m ²) for each soil condition taken at the end of one growing season.	38
Figure 9. Soil structure.	39
Figure 10. Root exploration in C1 soil.	42

Liste des sigles et abréviations

Abs ₆₆₅ :	Absorbance à 665 nm
Abs ₆₄₅ :	Absorbance à 645 nm
Abs ₄₈₀ :	Absorbance à 480 nm
ACIA :	Agence canadienne d'inspection des aliments
Ca :	calcium
Cu :	cuiivre
ECCC :	Environnement et Changements climatique Canada
ET :	éléments traces
DRO :	dérivés réactifs de l'oxygène
DW :	dry weight
Fe :	fer
MAAARO :	Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et des Affaires rurales de l'Ontario
MDDELCC :	Ministère du Développement durable de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques du Québec, aujourd'hui connu sous le nom de MELCC
MELCC :	Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques du Québec
Mg :	magnésium
Mn :	manganèse
M.O. :	Matière organique
MS :	matière sèche
RPRT :	Règlement sur la protection et la réhabilitation des terrains

SD : Standard deviation
SQP : Société québécoise de phytotechnologie
TE : trace elements
Zn : zinc

Remerciements

Merci à Michel Labrecque et à l'IRBV de m'avoir accueilli dans l'équipe pendant ces deux années et de m'avoir offert la chance d'effectuer ce projet avec vous. Merci, Michel, pour tes encouragements et ta confiance à travers les différentes étapes de ce projet.

Je tiens particulièrement à remercier Amandine Bonet qui a été un pilier à travers toute cette expérience et dont les conseils et la compagnie ont été d'une aide indispensable (tant qu'il n'était pas question de préparer du café !) Merci pour ton soutien, autant dans le domaine académique que mental. Merci également à Joan pour ton oreille attentive et ton aide constante à travers les échecs et les incertitudes. Vous m'avez permis d'apprendre de nombreuses choses et d'explorer des domaines scientifiques que je connaissais peu. Un gros merci à toute l'équipe qui m'a aidée dans les manipulations et les tâches difficiles et répétitives. Merci beaucoup, Estelle, Jinnie, Béatrice, Noémie, sans oublier Amandine, sans qui je n'y serais pas arrivée. Entre les jours passés pliée en deux par-dessus des bacs de terre et ceux passés enfermée au broyeur dans la salle des fours, vous étiez toujours prêtes à donner un coup de main. La bonne compagnie a rendu ces moments bien plus agréables. Merci, Béatrice et Amandine, pour les apports en collation et Jinnie pour les délicieux desserts et gâteries au chocolat ! Merci à tous ceux qui m'ont aidée dans la rédaction de ce mémoire, je vous en ai fait lire des versions et des copies.

Merci donc à toute l'équipe autour de moi à l'IRBV sans laquelle je ne m'en serais jamais sortie. Votre support, votre aide et vos encouragements ont été grandement appréciés tout au long de cette expérience et ont fait de ces deux années une expérience dont je garde de très beaux souvenirs.

Un dernier remerciement à ma famille et mes amis qui m'ont toujours encouragée dans mes études et qui commençaient bien à se demander si j'allais terminer un jour.

Chapitre 1 — Introduction

1.1. Mise en contexte et problématique

La contamination des sols est un enjeu grandissant à l'échelle mondiale. Le développement industriel du dernier siècle, avec les techniques de gestion des déchets souvent inadéquates, combinées à la croissance des populations et des centres urbains, a grandement contribué à l'accumulation de contaminants dans l'environnement créant des problèmes de pollution du sol, de l'air et de l'eau. Au Canada, il existe au-delà de 30 000 sites fédéraux contaminés officiellement identifiés (Sousa, 2001; Treasury Board Secretariat of Canada, 2019). Au Québec, d'après le ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques (MDDELCC), plus de 300 nouveaux sites sont annuellement inscrits au répertoire des terrains contaminés (MDDELCC, 2017).

En zone urbaine, un grand nombre de terrains vacants sont inutilisés en raison du taux élevé de contaminants et du coût associé à leur décontamination. Ils compliquent la revitalisation des quartiers, autant pour l'aspect visuel qu'économique, puisqu'ils ne peuvent pas être développés avant d'avoir été décontaminés et restent ainsi à l'abandon. Ils présentent donc une perte de revenus pour la municipalité (Beaulieu et al., 2016) et contribuent indirectement à l'étalement urbain (Lavallée, 2006). Le cuivre est l'un des contaminants souvent retrouvés dans des friches industrielles (Gallagher et al., 2008). C'est un élément trace (ET) nécessaire à de nombreux processus physiologiques (Feigl et al., 2013), mais son usage au sein des activités agricoles et industrielles a créé des excès dans l'environnement. C'est un contaminant inorganique qui détériore la vie du sol, affecte les écosystèmes qui y sont établis et pose un risque pour la faune et la flore qui y vivent ainsi qu'aux êtres humains lorsqu'il est présent en trop grande quantité (Chevrier, 2013; Mercier, 2016; Sarwar et al., 2017).

La méthode principalement utilisée au Québec est l'excavation et l'enfouissement (Hébert & Bernard, 2013), atteignant, en 2014, près de 500 000 tonnes métriques de sols enfouis MDDELCC, 2017). Des méthodes alternatives moins coûteuses et plus respectueuses de l'environnement et de l'écosystème en place existent pourtant (Bert et al., 2012). La phytoremédiation, une

technique *in situ* qui utilise les plantes et les micro-organismes qui leur sont associés pour extraire, dégrader ou immobiliser les contaminants environnementaux (Bert et al., 2012; Rafati et al., 2011) est une de ces technologies vertes qui peut remplacer les méthodes conventionnelles dans certaines circonstances.

Les plantes utilisées en phytoremédiation doivent produire une biomasse importante, avoir un système racinaire bien développé et être résistantes à des conditions de cultures difficiles (Pilon-Smits, 2005; Pulford & Watson, 2003). Les espèces à croissance rapide telles que le saule (*Salix spp*) sont bien connues pour leur tolérance à des conditions de cultures difficiles et ont fait l'objet de nombreuses études de phytoremédiation (Bissonnette et al., 2010; Grenier et al., 2015; Laidlaw et al., 2012). Les plantes de la famille des Brassicacées ont également été le sujet de nombreux projets de phytoremédiation pour leur capacité à accumuler des ET (Feigl et al., 2013; Gisbert et al., 2006; Kidd et al., 2009). Les expériences de phytoremédiation sont souvent faites en monocultures, toutefois il existe de nombreux avantages à la polyculture. Il a été démontré que les polycultures ont une résistance accrue au stress, une plus grande exploration du sol par les racines et dans plusieurs cas, une surproduction de biomasse (production de biomasse plus grande que leur monoculture respective) (Brooker et al., 2008; Loreau & Hector, 2001; Wang et al., 2014). Le cuivre est un élément plus difficile à extraire du sol par phytoremédiation puisqu'il est peu mobile (Kacalkova et al., 2015) dans le sol et lorsqu'il est absorbé par les plantes il se retrouve principalement dans les racines. Dans ce contexte, une technique de phytoremédiation qui impliquerait l'arrachage des plantes permettrait une meilleure extraction du Cu du sol.

1.2. Objectifs et hypothèses

Le Cu étant peu mobile et s'accumulant majoritairement au niveau du système racinaire des plantes, l'objectif principal de ce projet est d'évaluer l'efficacité de son extraction du sol *via* une technique d'arrachage des végétaux, entre deux espèces végétales en monoculture ou cultivées ensemble. Ainsi, deux espèces végétales possédant chacune un système racinaire explorant différents horizons de sol ont été sélectionnées pour cette étude : une espèce herbacée au système racinaire peu profond : le colza *Brassica napus* L, et une espèce ligneuse au système racinaire dense et profond : le saule *Salix nigra* 'S05'.

Nos hypothèses de travail ont été les suivantes :

- Les deux espèces accumulent plus de cuivre dans leur système racinaire et moins dans les parties aériennes.
- Les quantités de biomasses aériennes et racinaires produites en polyculture sont égales à celles produites par le traitement en monoculture le plus efficace.
- La complémentarité exploratoire de leur système racine dans le sol nous laisse supposer que l'alliance des deux espèces sera plus efficace pour traiter une contamination au cuivre dans le sol que leur monoculture.

1.3. Pertinence et optimisation des expériences exploratoires

Cette expérience a été menée en conditions semi-contrôlées en bacs, avec un sol contaminé artificiellement par un seul contaminant. Ainsi, il ne possède donc pas exactement les mêmes « réponses » qu'un sol d'une friche et ne reflète pas de manière absolue les conditions de terrain pour lesquelles il est plutôt question de contaminations multiples, et le cuivre présent sous différentes formes physicochimiques et donc sous différentes fractions phytodisponibles. Néanmoins, cela est un bon point de départ afin de déterminer les espèces les plus aptes et mieux adaptées à des contaminants particuliers. Ce type d'expérience permet de réduire le nombre de facteurs confondants et de sélectionner des espèces spécifiques afin, entre autres, de déterminer leur intérêt pour de futures études en condition terrain avec de nouvelles techniques.

Chapitre 2 — Revue de littérature

2.1. Phytoremédiation

La phytoremédiation est définie comme l'utilisation de plantes et des micro-organismes qui leur sont associés pour éliminer, contenir ou rendre moins toxiques les contaminants environnementaux (Ali et al., 2013). Dans le plan d'action 2017-2021 de la Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés du MDDELCC (2017), une des stratégies présentées afin de promouvoir la protection de l'environnement et la revitalisation durable du territoire est de favoriser le développement des technologies vertes. La phytoremédiation fait partie de ces technologies et répond aux objectifs de cette politique car c'est une technique *in-situ* qui permet de réduire les risques de dissémination des contaminants (dispersion de poussière/transport de sol et lessivage par exemple) et permet de conserver ou de restaurer l'intégrité de l'écosystème présent en minimisant les perturbations physiques et chimiques (Bert et al., 2012). De plus, elle améliore l'apparence visuelle du site en remplaçant des terrains vagues, qui ont une tendance à devenir le réceptacle de toute sorte de déchets, par des endroits verdoyants et agréables tout en procédant à leur réhabilitation (Pilon-Smits, 2005). Un aménagement judicieux du terrain, en y faisant un parc par exemple, permettrait l'utilisation du site durant le processus de décontamination, en plus d'augmenter la biodiversité et d'offrir un habitat pour la faune locale.

La phytoremédiation comprend plusieurs procédés différents qui peuvent être mis en œuvre selon la nature du contaminant, l'espèce végétale utilisée, le but recherché et le suivi désiré (Figure 1).

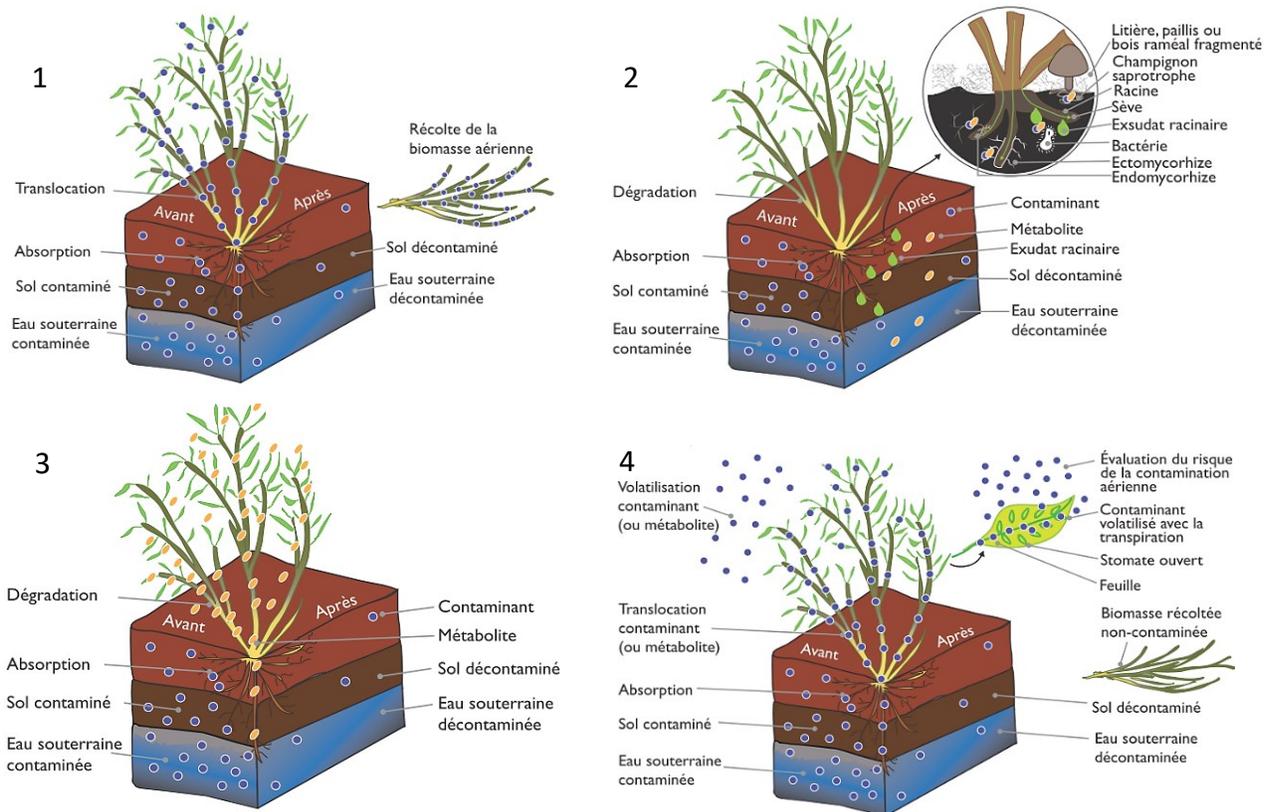


Figure 1. Schéma de la phytoextraction (1), de la rhizodégradation (2), de la phytodégradation (3) et de la phytovolatilisation (4), tiré de la fiche sur la phytoremédiation (Hénault-Ethier, 2016).

- La **phytostabilisation** permet de réduire la mobilité et la biodisponibilité des contaminants dans le sol autour de la rhizosphère par l'immobilisation chimique ou physique afin de réduire leur dissémination dans l'environnement (Bert et al., 2012).
- La **phytoextraction** ou **phytoaccumulation** est un processus qui extrait du milieu (sol ou eau) les contaminants par le système racinaire des plantes puis les acheminement vers les parties aériennes où ils seront stockés sans être transformés ou dégradés (Rafati et al., 2011). C'est la technique la plus utilisée puisqu'elle permet d'isoler le contaminant sans altérer la structure ou la vie biologique du sol (Sheoran et al., 2011). Les contaminants du sol, généralement des ET et métalloïdes biodisponibles sont transportés et concentrés dans les parties aériennes des plantes. Ces parties sont ensuite séchées, brûlées ou compostées selon le ou les contaminants accumulés.

- La **phytodégradation** et la **rhizodégradation** sont des procédés de dégradation des polluants organiques par les enzymes de la plante et/ou les micro-organismes de la rhizosphère en molécules moins toxiques et plus simples. On dit phytodégradation lorsque c'est la plante qui absorbe et dégrade le contaminant ou libère des enzymes dans le sol (Bert et al., 2012). Lors de la rhizodégradation, ce sont les micro-organismes habitant la rhizosphère qui en sont responsables. Ces micro-organismes, sont généralement stimulés par les exsudats racinaires de la plante. Cette méthode est souvent utilisée pour dégrader les contaminants organiques tels que les pesticides, herbicides et hydrocarbures.
- La **rhizofiltration** utilise le système racinaire des plantes aquatiques ou terrestres pour capter, concentrer et précipiter les polluants dissous dans l'eau de surface ou souterraine (ex. le lixiviat des mines et des sites d'enfouissement). Ce sont les micro-organismes vivant dans la rhizosphère qui sont responsables de la dégradation de la majorité des polluants. Une application commune de ce procédé est le marais filtrant. (Rafati et al., 2011).
- La **phytovolatilisation** comprend l'extraction des polluants du milieu (la phytoextraction) et la phytodégradation. Les polluants sont transportés par le système vasculaire des végétaux, transformés ou non pour ensuite être relâchés dans l'atmosphère par évapotranspiration. Puisque ces contaminants sont volatilisés, il n'est pas nécessaire de récolter ces plantes ; toutefois il faut faire bien attention que ce qui est volatilisé ne pose pas de danger pour la santé et ne risque pas de créer un problème de pollution atmosphérique.

2.1.1. Type d'expérience de phytoremédiation

Les recherches effectuées dans le domaine de la phytoremédiation peuvent être divisées en plusieurs catégories selon la façon dont elles ont été conduites. On distingue :

- **Les expériences en conditions contrôlées ou semi-contrôlées** conduites en laboratoire, en serre (ou sous tunnel), en hydroponie ou en pots/bacs. Ces dernières sont majoritairement effectuées à court terme et à petite échelle et cherchent à comprendre les mécanismes et les interactions impliqués dans l'accumulation du contaminant.

- Les *expériences en hydroponie* sont menées dans la matrice « eau » à l'aide de solutions nutritives contenant un ou plusieurs contaminants. Elles permettent de faire une sélection parmi plusieurs espèces (Hernández-Allica et al., 2008) mais nécessitent des expériences additionnelles avant de pouvoir conclure qu'une plante accumule un contaminant puisqu'elles ne reflètent pas la situation réelle. Il est difficile d'en déduire une réelle application puisque le contaminant est disponible pour les plantes d'une manière qui ne se retrouvera pas sur le terrain.
- Les *expériences en pots/bacs* permettent de contrôler plus de paramètres que les expériences en pleine terre et ainsi de limiter le nombre de facteurs confondants. La culture en pot facilite également l'échantillonnage puisqu'il est plus facile d'extraire les racines. Toutefois, comme dans le cas de l'hydroponie, ce type d'expériences peut avoir tendance à surestimer la quantité de contaminants extraits du sol, car la surface de contact entre les racines et le contaminant est supérieure en pot qu'en pleine terre (Labrecque et al., 2020). Les expériences en pot avec des terres contaminées peuvent utiliser de la terre provenant d'une zone contaminée ou de la terre délibérément contaminée dite « spikée ». Dans le premier cas, les interactions entre le sol et le contaminant sont bien établies mais il est difficile d'homogénéiser les pots, et la terre est souvent de mauvaise qualité, difficile à travailler et peut contenir plus d'un contaminant. Dans le deuxième cas, la biodisponibilité du contaminant est plus grande puisque la stabilisation et immobilisation des ET par le sol n'ont pas le temps de s'établir (Lock &

Janssen, 2001). Il est possible de réduire cet écart entre la réalité du terrain et celle du sol artificiellement contaminé en faisant vieillir la terre. Le sol « spiké » est soumis, entre autres, à des cycles de mouillage et séchage et doit reposer plusieurs mois (Northcott & Jones, 2000). Cette technique permet d'observer l'effet d'un seul contaminant et limite les facteurs confondants. Le « spiking » permet de tester la capacité d'absorption des plantes et de tirer des conclusions préliminaires.

- La recherche en condition terrain se divise en deux catégories : l'analyse de plantes poussant déjà dans un sol contaminé, et l'implantation de parcelles expérimentales dans ce dernier afin de tester des espèces prédéterminées. Ce type d'expérience tient compte de toutes les interactions présentes dans le sol et reflète la réalité du terrain tel qu'un milieu de croissance hostile, des contaminations multiples et l'hétérogénéité des sols. Ceci est essentiel afin de pouvoir tirer des conclusions réalistes et applicables. Ce même aspect est aussi un désavantage dû au nombre élevé de facteurs confondants.

2.1.2. Gestion des résidus

Un plan de phytoextraction doit comprendre la gestion des résidus. La biomasse générée doit être traitée et disposée de manière appropriée afin de réduire les risques environnementaux. Les résidus peuvent être traités de la même manière que tout déchet contenant des matériaux toxiques par incinération et enfouissement (Padmavathiamma & Li, 2007). Le compostage et la compaction sont des méthodes qui ont été suggérées afin de réduire le volume à gérer. Il existe également des technologies qui tentent de tirer avantage de la concentration d'ET dans la biomasse végétale et ainsi de rendre plus rentable leur extraction. Le phytomining est une phytotechnologie qui consiste à récupérer les métaux qui se retrouvent dans le matériel végétal (Robinson et al., 2015). La biomasse est brûlée (avec l'option de produire de l'énergie) et les cendres sont ensuite traitées pour récupérer les minerais (Sheoran et al., 2009).

Ainsi, au-delà de sélectionner des espèces végétales aux capacités phytoremédiatrices intéressantes, il est également capital de prendre en compte le devenir de celles-ci et leur valorisation future. Ceci sera davantage discuté plus tard.

2.1.3. Limitations

La capacité des plantes et organismes à décontaminer un terrain dépend de la biodisponibilité des polluants. S'ils ne sont pas sous une forme biodisponible, ils ne pourront pas être assimilés ou dégradés et il faudra donc avoir recours à des techniques pour les rendre plus biodisponibles (ex. ajout de chélateur, ajouts d'amendements) ce qui présente d'autres risques (lessivage, hausse de la toxicité pour les organismes présents, etc.) (Ghori et al., 2016), ou bien utiliser une méthode autre que la phytoremédiation.

Généralement, les techniques relatives à la phytoremédiation sont considérées comme des méthodes plus respectueuses de l'environnement que les techniques conventionnelles. Toutefois, il faut faire attention et bien connaître les processus impliqués. Il peut arriver que la dégradation d'un contaminant crée un produit intermédiaire plus toxique que le produit initial. Il faut également évaluer, lors de la phytovolatilisation, les risques associés à la dispersion de contaminants dans l'atmosphère.

La phytoremédiation est limitée par le fait que ces techniques ont recours à des organismes vivants. Il faut donc que le milieu à décontaminer puisse supporter la végétation que l'on désire y implanter. Les plantes choisies doivent pouvoir survivre et bien se développer dans les conditions de cultures du site (pH, sol compacté, disponibilité en eau, salinité, luminosité, etc.) en plus d'être tolérant au polluant. Cela implique que ces techniques sont seulement efficaces pour un taux de contamination considéré comme faible à moyen (Chevrier, 2013). Cela signifie également que l'emplacement de la contamination est important puisque la plante doit être capable d'atteindre le contaminant. Le choix de plante influencera donc la profondeur de sol qui pourra être nettoyé. De plus, cela ne marche pas tout le temps. Il arrive que la phytoremédiation réduise la concentration des contaminants sans les éliminer complètement du sol. Cette méthode est donc plus appropriée pour les sites à usage industriel puisque les normes sont plus élevées que celles pour les zones résidentielles.

La limitation qui pose le plus de problèmes est le temps. La phytoremédiation est un processus qui demande du temps, de quelques années à quelques décennies. La durée du projet dépendra de plusieurs facteurs dont le type de contaminant et sa concentration, l'espèce végétale utilisée, les conditions de croissance, la durée de la saison de croissance, etc. (Ghori et al., 2016).

2.2. Le cuivre

Le cuivre est un élément trace métallique retrouvé naturellement dans l'environnement sous plusieurs formes minérales. C'est un élément essentiel dans le processus biologique des plantes et animaux (oligoélément) mais lorsque présent en trop grande quantité, il est nocif pour l'environnement et la santé. Le cuivre est un métal stable et conducteur qui est depuis longtemps utilisé dans par l'homme. Il se retrouve dans les fils électriques, les tuyauteries, les herbicides, les fongicides, les pesticides, etc. (Campagna et al., 2013). Les activités industrielles et agricoles en sont les principales sources de pollution et puisqu'il s'agit d'un contaminant inorganique et donc non dégradable, il s'accumule dans l'environnement et est souvent retrouvé dans les fiches industrielles.

2.2.1. Toxicologie

Lorsque présent en concentration élevée, le cuivre peut causer des problèmes pour la santé humaine ainsi que pour la flore et la faune. Le cuivre est utilisé comme un fongicide en agriculture et peut donc nuire au développement de la microfaune et flore tel que les champignons. À haut niveau, le cuivre est toxique aux plantes, à la vie microbienne du sol, aux invertébrés et vertébrés et donc à tout un écosystème.

Selon la Commission des normes, de l'équité, de la santé et de la sécurité du travail (CNESST) (2019), le cuivre est principalement absorbé par les voies respiratoires et digestives. L'exposition aux poussières de cuivre peut causer l'inflammation des yeux et l'irritation des voies respiratoires supérieures ainsi que l'irritation des muqueuses des voies gastro-intestinales lorsqu'ingérée. L'ingestion de sels de cuivre peut causer de la salivation, des nausées, des vomissements, des douleurs épigastriques, une gastrite hémorragique et de la diarrhée. Une exposition à court terme

à des concentrations élevées peut causer des nausées, des douleurs abdominales, des vomissements et de la diarrhée. Une exposition à long terme peut avoir des effets sur le foie et les reins (Santé Canada, 2019).

2.2.2. Propriétés chimiques

Le cuivre est un élément peu mobile et souvent associé au soufre et au fer. Il peut être, par exemple, présent sous forme de chalcopryrite (CuFeS_2) et de chalcocite (Cu_2S). La mobilité et la biodisponibilité du cuivre (cuivre présent dans la solution du sol absorbable par les plantes) sont influencées par le pH, la capacité d'échange cationique (CEC), la teneur en matières organiques, la présence d'oxydes de fer, de manganèse et d'aluminium et le potentiel d'oxydoréduction (Conseil canadien des ministres de l'environnement, 1999; Reichman, 2002).

2.2.3. Normes environnementales

En 2003, le gouvernement du Québec a adopté le Règlement sur la protection et la réhabilitation des terrains (RPRT) qui indique les critères génériques pour les teneurs du sol des différents contaminants (Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques du Québec [MELCC], 2020). L'annexe 2 du Guide d'intervention de protection des sols et réhabilitation des terrains contaminés contient les critères génériques du sol pour une utilisation résidentielle (critère B) et industrielle d'un site (critère C). Pour le cuivre, ces limites sont respectivement de 100 et 500 mg/kg MS (Annexe III). Cela signifie que tout terrain dépassant ces normes doit être décontaminé avant de pouvoir être utilisé.

Les concentrations utilisées lors de l'expérience sont de 500 et 800 ppm de Cu car ce sont à ces concentrations qu'il y aurait besoin de faire de la remédiation.

2.3. Adaptation des plantes au cuivre

Le cuivre joue un rôle essentiel dans plusieurs procédés métaboliques des plantes tels que la photosynthèse et le métabolisme des parois cellulaires (Yruela, 2009). Une déficience ou un excès peuvent avoir de grave conséquence sur la santé et la survie de la plante. Un excès de cuivre peut causer de la chlorose, de la nécrose, une croissance réduite, une baisse du taux de germination des semences, une baisse du taux de photosynthèse ainsi que nuire au développement racinaire (Reichman, 2002; Yruela, 2009). Les métaux lourds peuvent entraîner des stress oxydatifs, dus à la production excessive de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO), qui peuvent causer des dommages cellulaires menant à la mort des cellules (Ali et al., 2013; Yruela, 2009).

Plusieurs plantes ont donc développé des mécanismes afin de pouvoir survivre dans des milieux contaminés en ET. Les plantes métalrophytes ont évolué pour être capables de restreindre, tolérer et même prospérer dans des milieux riches en ET. Elles peuvent être divisées en trois grandes catégories : les « excluders », les plantes indicatrices et les plantes hyperaccumulatrices de métaux (Sheoran et al., 2011).

Les plantes dites « excluders » empêche les métaux de se rendre dans le xylème et de les transloquer vers les parties aériennes. Elles peuvent tout de même accumuler beaucoup d'ET dans leur tissu racinaire (Ali et al., 2013) et peuvent servir pour la phytostabilisation.

Les plantes indicatrices et hyperaccumulatrices transloquent et séquestrent les ET dans les parties aériennes sans effet létal.

- **Les plantes hyperaccumulatrices** les séquestrent en quantité supérieure à ce qui est présent dans le sol ou dans les plantes environnantes
- **Les plantes indicatrices** ont généralement une concentration du contaminant métallique similaire à celle dans leur environnement.

2.3.1. Mécanismes d'absorption, de transport et d'accumulation du Cu dans les plantes

Les mécanismes impliqués dans le processus d'accumulation et d'hyperaccumulation des ET par les plantes ne sont pas encore tous bien compris. Ils peuvent néanmoins être séparés en cinq étapes (Figure 2) : 1) la mobilisation dans la rhizosphère, 2) l'absorption par les racines, 3) la translocation vers la partie aérienne, 4) la séquestration de l'ET et 5) la tolérance au métal (Ali et al., 2013; Sarwar et al., 2017).

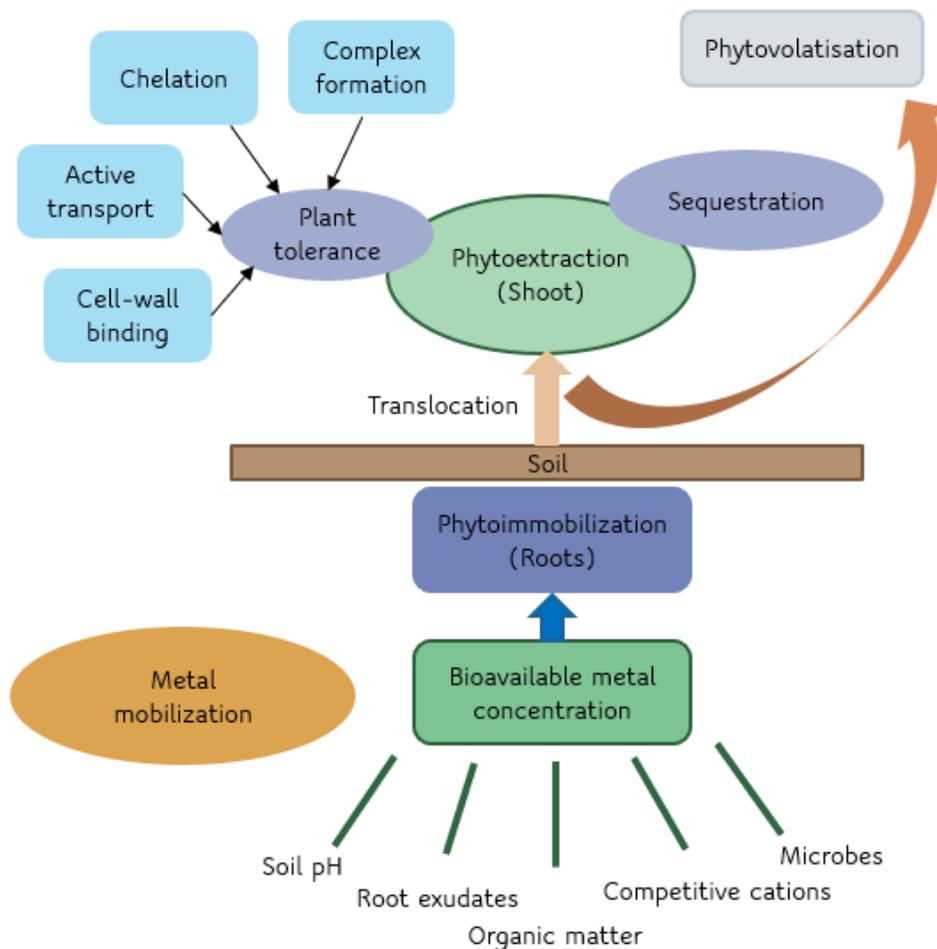


Figure 2. Mécanismes impliqués dans la phytoremédiation ET du sol (tiré de Sawar et al., 2017).

2.3.1.1. Absorption et transport du Cu

La biodisponibilité d'un ET dans le sol dépend non seulement des caractéristiques physico-chimiques du sol (pH, température et taux d'humidité, potentiel rédox, composition minérale et organique), mais également des molécules libérées par les racines (exsudats racinaires) et les microorganismes de la rhizosphère (Reichman, 2002; Sarwar et al., 2017).

La pénétration du Cu dans la plante s'effectue majoritairement au niveau des racines, sous forme libre ou complexée à un ligand. L'absorption du Cu à travers la membrane plasmique s'effectue de manière passive (par simple diffusion ou *via* certains canaux ioniques selon le gradient de concentration) et/ou de façon active (via un système de transport actif, lequel fait intervenir notamment des pompes dépendantes de l'adénosine triphosphate (ATP)) (Bonet et al., 2016). Plusieurs familles de transporteurs permettent la pénétration du Cu dans la plante comme par exemples :

- *Les protéines YSL (Yellow Stripe Like)* qui reconnaissent spécifiquement le **Cu**, Fe, Mn, Ni et le Zn sous forme complexée ET – ligand et permettent ainsi leur passage à travers la membrane plasmique (Curie et al., 2009). Le Ca, Cd, Cr, Fe, Mn, Mo, N, Ni, P, Se et Zn entrent souvent en compétition avec le Cu au niveau de ces différents transporteurs (Trakal et al., 2015).

- *Les transporteurs Nramp (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein)* impliqués dans le transport des ions métalliques divalents comme Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} et Co^{2+} (Manara, 2012; Nevo & Nelson, 2006).

- *Les protéines COPT (COpper Transporter)* sont des transporteurs spécifiques de l'absorption du Cu et ont majoritairement été identifiés au niveau de la membrane plasmique et du tonoplaste (Kampfenkel et al., 1995; Sancenón et al., 2003; Yruela, 2005). Il existe six membres de la famille COPT (COPT1 à COPT6) et une carence en Cu peut activer l'expression de certains d'entre-eux (Peñarrubia et al., 2010).

Les ET sont transportés dans la plante à travers deux voies :

- **la voie apoplastique** constituée par les parois cellulaires et les espaces intercellulaires. Le transport des ET à travers ce compartiment extracellulaire a lieu de façon passive et ils sont véhiculés à travers le déplacement de l'eau dans laquelle ils sont solubles. Cependant, une certaine fraction d'ions peut être retenue aux parois par adsorption aux charges négatives de surface de certaines molécules constitutives de la paroi cellulaire telles que l'acide polygalacturonique des pectines, lesquelles agissent comme des échangeurs d'ions (Briat & Lebrun, 1999).

- **la voie symplastique** formée par le biais des plasmodesmes assure le passage de l'eau et des solutés du sol vers le cylindre central constitué notamment de faisceaux conducteurs de sève. Selon l'ET, l'absorption peut y être passive ou active et ces derniers traversent donc la paroi puis la membrane plasmique pour migrer via les plasmodesmes de cellule en cellule à l'intérieur des racines jusqu'à atteindre le xylème. Le phénomène d'évapotranspiration va alors contribuer au transport ascendant des ET contenus dans la sève du xylème depuis les racines vers les parties aériennes. Une fois absorbés, les ET sont transportés sous forme libre ou complexée à différentes molécules organiques du cytoplasme vers les parties aériennes (Gangwar et al., 2014; Schuler & Bauer, 2011). Parmi ces ligands organiques, on distingue des acides organiques (malate, oxalate), des acides aminés libres et leurs dérivés (proline, histidine, nicotianamine), des oligopeptides riches en cystéine (glutathion, phytochélatines), des polyamines libres (spermidine, spermine et putrescine), ainsi que des molécules chaperonnes (métallothionéines). Selon l'espèce végétale, leurs concentrations sont variables et leur nature diffère selon les organes et l'âge de celle-ci (Salt et al., 1999). Ainsi, sous forme complexée, le cation métallique ne peut exercer son effet toxique, ce qui offre alors à la plante une protection contre divers ET en excès et/ou toxiques et participe donc à sa tolérance aux ions métalliques. Ces ligands organiques peuvent être impliqués dans le transport et/ou dans la séquestration des ET dans divers compartiments de la cellule afin d'empêcher tout dommage cellulaire (Haydon & Cobbett, 2007).

Il est important de noter que la vitesse de transport diffère d'un ET à l'autre de par leur différence de mobilité au sein de la plante. Par exemple, le Cd et le Zn sont plus mobiles que Cu et Pb (Tremel-Schaub & Feix, 2005).

2.3.1.2. Séquestration du Cu dans la plante

La compartimentation vacuolaire des ET est une des stratégies majeures de tolérance au stress métallique (Dietz et al., 2001) et s'opère grâce à des ligands et plusieurs familles de transporteurs situés au niveau du tonoplaste (Hall & Williams, 2003). En effet, la vacuole est à la fois un lieu de stockage des ET essentiels dans lequel la cellule peut puiser selon ses besoins, mais aussi un lieu de stockage de composés toxiques qui est moins sensible au stress oxydant par rapport aux autres organites de stockage tels que les mitochondries et le réticulum endoplasmique (Geisler et al., 2000).

Le cloisonnement extracellulaire (paroi et espaces intercellulaires) constitue également un autre réservoir à ET utilisé aussi comme une autre stratégie de défense des plantes afin de limiter les dommages causés par le stress métallique (Parrotta et al., 2015).

Ainsi, la combinaison de la compartimentation vacuolaire et pariétale constitue une stratégie de défense efficace permettant de réduire les impacts du stress métallique sur les différents processus essentiels à la survie de la plante (ex. photosynthèse) (Gupta et al., 2013).

2.4. Espèces végétales les plus appropriées en phytoremédiation

Outre leurs capacités à tolérer la contamination et décontaminer le site désiré, les plantes d'intérêt pour la phytoremédiation doivent s'établir facilement, avoir une croissance rapide et un système racinaire bien développé afin d'avoir une plus grande surface exploratoire et de contact avec les contaminants. Elles doivent également être résistantes à des conditions environnementales difficiles (sol perturbé et souvent compacté, fertilité variable, sécheresse, etc.). Les plantes recherchées pour la phytoextraction devraient avoir une biomasse aérienne élevée alors que celles d'intérêt pour la phytostabilisation nécessitent plutôt une biomasse racinaire extensive.

De plus, les plantes doivent être résistantes aux ravageurs et aux maladies ainsi qu'être peu attirantes pour les herbivores afin de diminuer les risques de contamination de la chaîne alimentaire (Padmavathiamma & Li, 2007). Ces dernières doivent préférablement être hyperaccumulatrices bien que cela présente un problème puisque ces plantes ont généralement une faible production de biomasse. Une plante est dite hyperaccumulatrice de cuivre lorsqu'elle accumule 1000 mg de Cu/kg MS et plus (Baker & Brooks, 1989; Ghori et al., 2016) et possède un facteur de bioaccumulation (FBC) supérieur à 1 (Cluis, 2004).

Un autre facteur à considérer est l'origine de la plante. Il est toujours préférable d'utiliser des plantes indigènes puisqu'elles devraient être plus résistantes au climat et cela permet d'éviter les risques associés avec l'introduction d'une plante exotique voire invasive (Gupta et al., 2013).

2.4.1. Le saule

Le saule est une espèce qui est souvent utilisé en phytoextraction. C'est une plante à croissance rapide, avec une biomasse élevée, une implantation simple et elle est résistante à de nombreux stress abiotique (Kuzovkina & Volk, 2009). Le saule est connu pour sa capacité à accumuler des ET dans ces parties aériennes et racinaires (Desjardins et al., 2016). Dans le cas du cuivre, la majorité du contaminant se retrouve dans les racines (Courchesne et al., 2017) ce qui permet de stabiliser le contaminant et éviter qu'il soit disséminé. La présence du Cu dans le tissu racinaire signifie qu'une technique d'arrachage permettrait d'enlever plus de Cu du sol rapidement. Plusieurs études ont montré des variations dans la réaction aux ET selon le cultivar de saule (Courchesne et al., 2017; Evlard et al., 2014). Le *Salix nigra* est une espèce indigène du sud-est du Canada qui produit une biomasse intéressante en milieu modérément contaminé (Beauchamp et al., 2018; Grenier et al., 2015; Mosseler et al., 2014).

2.4.2. Le colza

Les Brassicacées sont des herbacées dont plusieurs espèces ont la capacité d'accumuler des ET (Gisbert et al., 2006; Padmavathiamma & Li, 2007; Purakayastha et al., 2008). Ce sont des plantes à croissance rapide et au cycle de vie court dont certaines espèces sont utilisées en agriculture. Il est donc facile d'obtenir des semences qui ont un taux de germination élevé, un avantage lorsque vient le temps de semer sur des grandes superficies. Le Canada est l'un des principaux

producteurs de *B. napus* (Food and Agricultural Organization of the United Nations, 2019). *B. napus* L., communément connu sous le nom de colza ou « rapeseed » en anglais, possède plusieurs cultivars qui sont utilisés, entre autres, pour la production d'huile alimentaire, pour l'alimentation du bétail, comme agrocarburant et comme engrais vert. Le *B. napus* est capable de tolérer une contamination au cuivre mieux que d'autres espèces de Brassicacée (Feigl et al., 2013; Purakayastha et al., 2008).

2.4.3. Polyculture

Plusieurs études ont démontré les avantages d'avoir une diversité végétale plutôt qu'une monoculture, particulièrement en termes de résistance au stress et de production de biomasse (Loreau & Hector, 2001; Smith et al., 2008; Wang et al., 2014). Les plantes en polyculture peuvent être plus productives que leur monoculture respective. Ceci peut être expliqué par le mécanisme de sélection ou de complémentarité. L'effet de sélection indique que l'espèce la plus productive domine la culture alors que la complémentarité signifie que la productivité du système est améliorée par la facilitation entre les différentes espèces qui occupent des niches différentes (Loreau & Hector, 2001; Zhang et al., 2014). Combiner deux espèces de plantes et plus dans un contexte de phytoremédiation peut avoir d'autres avantages. Elles peuvent remplir des rôles écologiques et de phytoremédiations différentes. Par exemple, combiner des espèces fixatrices d'azote et des espèces qui traitent des contaminants différents (Desjardins et al., 2016; Desjardins et al., 2018). Une polyculture implique également une diversité dans le développement racinaire ce qui permet une exploration plus complète du sol (de Kroon et al., 2012; Mommer et al., 2010; Zhang et al., 2014) et donc, la possibilité d'augmenter la surface de contact avec le polluant et ainsi améliorer la décontamination. De plus, lorsqu'il y a plus d'une espèce, il peut y avoir des impacts positifs ou négatifs des plantes sur l'établissement ou la croissance des autres plantes (la complémentarité des espèces, la facilitation et partition de niche et la compétition) (Li et al., 2014; Loreau & Hector, 2001; Wang et al., 2014). Le « stress-gradient hypothesis » suggère que la facilitation entre en jeu lorsque l'écosystème fait face à des stress et la compétition est plus présente en période non stressante (Bertness & Callaway, 1994; Brooker et al., 2008; Callaway et al., 2002; Michalet et al., 2006). Il peut également y avoir de la compétition asymétrique, c'est-à-dire une répartition inégale des ressources parmi les individus ou espèces d'un même habitat. Par

exemple, la taille des individus, la vitesse de germination et/ou la vitesse de croissance peuvent rendre une espèce plus compétitive que les autres. Ainsi, l'espèce la plus compétitive consomme une quantité disproportionnée des ressources (Freckleton & Watkinson, 2001; Weiner, 1990).

Chapitre 3 — Méthodologie

3.1. Préparation de l'expérience

L'expérience s'est déroulée en bac, sous tunnel sur le site du Jardin botanique de Montréal au cours de la saison de croissance 2019. Le dispositif expérimental a été mis en place au printemps 2019 suivant un dispositif en blocs aléatoires complets (Figure 3). Les bacs ont une dimension de 64,77 x 41,27 x 34,3 cm et une capacité de 63 L. Ils contiennent un sol de jardin (Tableau 1a) ayant une teneur initiale en Cu faible de l'ordre de 36,2 ppm (Tableau 1b) avec une couche de gravier dans le fond et une couche de compost de 10 cm incorporée en surface. Chaque bac a été percé d'un trou à la base, afin de laisser échapper l'excédent d'eau qui est récupéré dans un contenant en plastique et retourné régulièrement au bac. Le sol (sauf le sol témoin) a ensuite été artificiellement contaminée le 1^{er} mars avec une solution de chlorure de cuivre (CuCl_2) afin d'obtenir une concentration finale de l'ordre de 500 ppm de Cu pour la condition d'exposition C1 et de l'ordre de 800 ppm pour la condition C2 (Tableau 1b). La terre de chaque bac a été humidifiée et mélangée régulièrement pour l'homogénéiser pendant environ trois mois (1^{er} mars jusqu'à la plantation fin mai) après l'ajout ou non du CuCl_2 selon les conditions d'exposition.

Tableau 1. a) Analyse agronomique moyenne du sol à T0 avant le vieillissement et l'ajout du contaminant (CuCl₂).

b) Teneurs finales moyennes en Cu dans le sol après trois mois de vieillissement du sol et l'ajout ou non du contaminant (CuCl₂) pour les conditions d'exposition T, C1 et C2.

a)

Paramètres analysés	Concentrations moyennes
Ca (kg/ha)	8845
P (kg/ha)	44
Al (ppm)	827
K (kg/ha)	264
Mg (kg/ha)	341
Na (kg/ha)	47
B (ppm)	1,1
Cu (ppm)	8,11
Fe (ppm)	249,8
Mn (ppm)	26,5
Zn (ppm)	6,9
C.E.C. (meq/100 g)	21,3
ISP (%)	2,4
pH-H ₂ O	7,1
Matière organique (%)	4,5

b)

Conditions de culture	Concentrations moyennes de Cu	
	mg/kg	écart-type
Témoin	36,25	2,63
C1	498,25	31,78
C2	837,75	123,48

Note : Analyse des métaux par digestion acide et analyse ICP-MS (concentration moyenne, n=4).

Note : Analyse des métaux selon la méthode Mehlich III (n=1).

3.2. Protocole expérimental

Deux espèces de végétaux ont été choisies pour conduire cette étude. Une espèce de saule, *Salix nigra* 'S05' et une variété de colza (*Brassica napus* L.). Le *S. nigra* a été planté le 25 mai, à raison de deux boutures par bac. Les boutures conservées au froid durant l'hiver et ont été trempées dans de l'eau pendant 48 heures avant leur mise en terre. Le colza fut semé le 25 juin à une densité de 15 kg/ha. La densité de plantation pour la culture du colza fourrager varie de 5 à 12 kg/ha (Ljubljana, 2019; Zoghalmi et al., 2013) selon l'usage. Nous avons augmenté la dose en cas d'impact négatif du Cu sur la germination du colza. La surface du bac a été séparée en 9 sections dans lesquelles ont été semés 50 mg de semences (environ 11 graines) pour un total d'environ 99 semences par bac (450 mg). Les graines ont été incorporées en surface.

Les bacs ont été irrigués régulièrement au besoin avec l'eau du robinet et de manière à conserver une bonne humidité. De l'engrais soluble Miracle-Gro 24-8-16 à 2,5 mL/L (2litre/bac) a été ajouté toutes les deux semaines à partir du 17 juillet 2019 et jusqu'à la fin de l'expérience (16 septembre 2019).

Le dispositif expérimental en bloc aléatoire complet comportait trois conditions de culture (sol témoin, concentration 1 et concentration 2) et quatre traitements espèces (sans plante, *S. nigra*, *B. napus* et mélange des deux espèces). Le tout étant répliqué dans quatre blocs comme le présente la Figure 3.

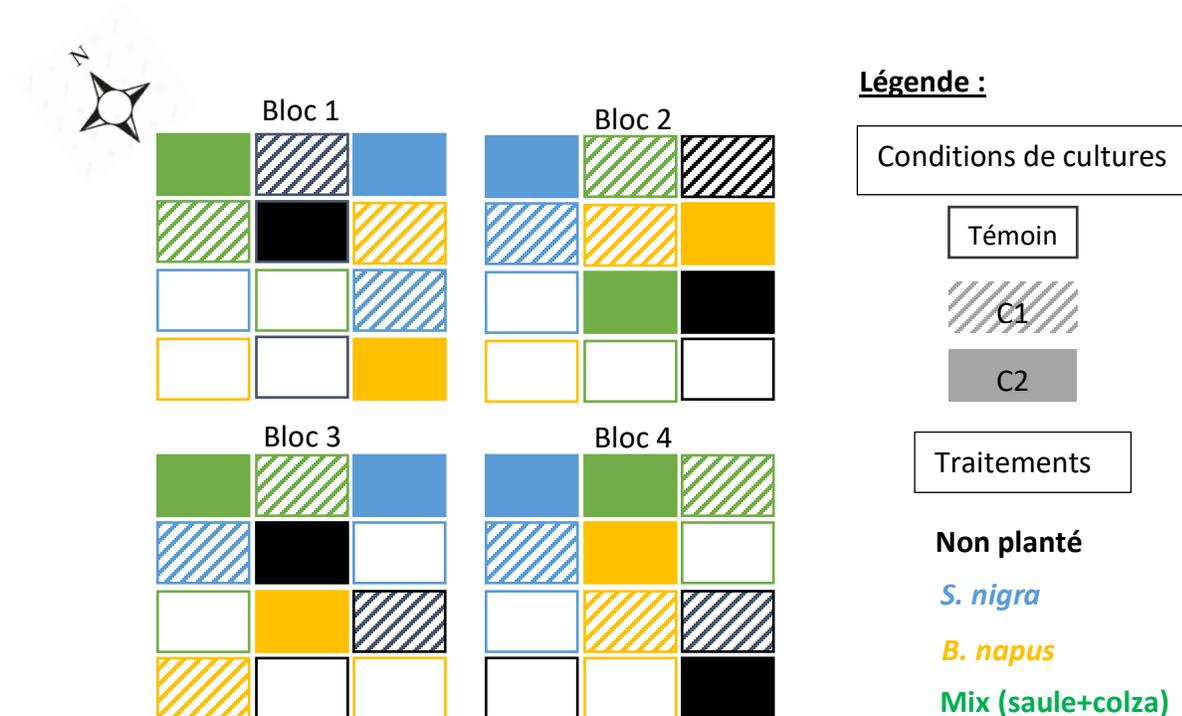


Figure 3. Plan expérimental.

3.3. Échantillonnages et analyses

Le sol a été caractérisé avant la plantation (Tableau 1). Les mesures de croissance (hauteur et nombre de rameaux développés) ont été prises chaque semaine à partir du 6 juin (2 semaines après la plantation) pour le saule et le 17 juillet (3 semaines après le semis) pour le colza (résultats intéressants mais non pertinents pour l'article, présentés en Annexe I). Les mesures

physiologiques telles que le taux de photosynthèse (mesures prises avec le Li-cor, Li-6400XT) et de chlorophylle ont été prises trois fois (25 juillet, 2 août et 29 août) et deux fois (29 août et 15 septembre) respectivement (résultats non présentés dans ce rapport puisque les résultats n'étaient pas concluants). À la fin de la saison, les biomasses aériennes et racinaires des saules et colzas ont été récoltées ainsi que des échantillons de sol (rhizosphère et périphérie). Les racines développées dans les bacs contenant les deux espèces de plantes étaient très difficiles à séparer et ont donc été traitées ensemble (Annexe IV, Figure IIb). Le taux de germination du colza a été calculé une semaine après le semis et le taux de survie fut calculé en utilisant la quantité de plant germé le 3 juillet comme quantité initiale.

3.3.1. Préparation, digestion et dosage des ET dans les échantillons végétaux

Les plantes récoltées à la fin de la saison de croissance ont été séparées en parties aériennes et racinaires puis lavées à l'eau distillée pour ensuite être séchées au four à 70 °C pendant 48 heures. La biomasse de chaque échantillon (parties aériennes et racines) a ensuite été pesée, broyée (broyeur Retsch, SM 300) et tamisée et la fraction < 850 µm a été utilisée pour déterminer les concentrations en éléments traces. Pour les saules, à la suite de la pesée, seul un des deux plants par bac a été broyé et analysé alors que les plants de colza ayant poussé dans le même bac ont été broyés ensemble.

L'extraction des éléments traces par digestion acide est une technique analytique de séparation préparatoire visant à extraire des ET à partir de leur matrice organique (biomasse végétale) en les solubilisant dans un acide fort. La mise en solution des ET a été réalisée au laboratoire de l'IRBV comme décrit par Wilson et al. (2005) afin d'obtenir la concentration totale de Cu contenue dans la biomasse.

La digestion a été réalisée à l'aide du digesteur à bloc chauffant GERHARDT (Kjeldatherm KB 40). Environ 200 mg de biomasse sèche tamisée ont été digérés dans 2 mL d'acide nitrique 70 % dans des tubes en verre borosilicatés pendant 6 h à 120 °C. Ensuite, le digestat contenu dans chacun des tubes borosilicatés est ajusté à 50 mL à l'aide de 48 mL d'eau ultra pure (MilliQ). Après leur homogénéisation, 5 mL sont filtrés à travers une membrane en nylon (0,45 µm) et compléter

jusqu'à 10 mL avec de l'eau MilliQ. Ainsi, les ET extraits sont stockés dans une solution finale à 2 % d'HNO₃.

Les concentrations de six ET (Cu, Ca, Fe, Mg, Mn, Zn) des différentes plantes ont été déterminées suite à la digestion acide par spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (ICP-MS) (Perkin Elmer NexION 300x). Nous allons seulement présenter les résultats obtenus pour les concentrations en Cu dans ce rapport. La concentration en ET dans la biomasse a été calculée à partir de la formule chimique suivante :

$$\text{mg d'éléments mesurés/kg de sol} = \frac{\text{conc. en solution } (\mu\text{g/L}) * \text{vol. solution (L)}}{\text{masse de sol (g)}}$$

Les saules morts n'ont pas été utilisés pour calculer la concentration moyenne de Cu dans la biomasse présentée dans les résultats. La concentration moyenne en Cu obtenue par le traitement en polyculture fut déterminée en additionnant la concentration moyenne en Cu des espèces prises individuellement proportionnellement à leur pourcentage respectif de biomasse. Ensuite, la quantité de cuivre extraite (en g/ha) par la biomasse aérienne et racinaire fut calculée en multipliant la concentration de cuivre par la biomasse du même bac et ramenée sur un hectare.

3.3.2. Préparation, digestion et dosage des ET dans les échantillons de sol

Le dosage des éléments traces dans le sol a été effectué de la même manière que la biomasse végétale à partir de 200 mg MS de sol séché, homogénéisé et tamisé (fraction <850 μm). Cependant, les ET extraits sont récupérés dans une solution finale à 0,4 % d'HNO₃.

3.4. Statistique

Les analyses statistiques furent effectuées à l'aide du logiciel R. Les données ont été transformées avec log₁₀ pour obtenir une distribution normale lorsque nécessaire. Des ANOVAs suivies de test de Tukey ont été utilisées pour pouvoir comparer les différents groupes et déterminer la présence de différence significative (p ≤ 0.05).

Les sections « Résultats » et « Discussion » de ce mémoire seront présentées sous forme d'article scientifique. Elles seront suivies d'une section « Interprétation et discussion » en français qui discutera des points importants à retenir de la discussion.

Chapitre 4 – The impact of combining *Brassica napus* and *Salix nigra* 'S05' in copper contaminated soil

Massenet, A., Bonet, A., Laur, J., Bergeron, B., Labrecque, M.

4.1. Abstract

Environmental pollution is a growing problem on a global scale. Diverse methods exist to remediate polluted soil but phytoremediation constitutes a green approach more respectful of sustainable development that uses plants and their associated microorganisms to extract, degrade or immobilise environmental contaminants. Copper is a trace element (TE) often found in brownfields which has a low mobility partly due to its strong bond with organic matter and clay particles. When present in excess, Cu is harmful to flora and fauna. We experimented with two distinct species, *Brassica napus* L., a crop species which is grown in large quantities in Canada and *Salix nigra* 'S05', a fast-growing woody species native to south eastern Canada to compare their phytoremediation potential in copper-spiked soil when grown together or in monoculture. We observed that most of the copper was found in the roots and that the polyculture treatment, in addition to producing the most overall biomass, would allow for the maximum stabilization and extraction of Cu of all three treatments and that the removal of the entire plant would be the most efficient way of ensuring Cu removal from the soil.

Keywords: phytoremediation, phytoextraction, copper, *Salix nigra*, *Brassica napus*, willow, rapeseed, monoculture, polyculture, uprooting.

4.2. Introduction

Environmental pollution is a growing problem on a global scale. The industrial development and increasing global population have contributed to the accumulation of pollution in the air, soil and water. In Canada, there are over 30,000 brownfields on the Federal Contaminated Sites Inventory (Sousa, 2001; Treasury Board Secretariat of Canada, 2019) with more being added each year. Typically, brownfields located in urban or peri urban areas have soils that can contain a wide range of both inorganic (trace elements) and organic contaminants. Among these, copper, which is commonly used in industrial activities is often detected in excess in the soil of these sites (Gallagher et al., 2008). Copper is a trace element (TE) essential to several physiological processes but, when present in excess, it causes toxicity to flora and fauna. In plants, it can lead to tissue chlorosis and necrosis, decreased growth, decrease seed germination and provokes oxidative stress leading to cell death (Ali et al., 2013; Yruela, 2009).

There are several techniques used to decontaminate polluted soil, but they could be cost prohibitive and harsh on the environment. The most common method used in the Province of Québec is the excavation and off-site disposal (Hébert & Bernard, 2013) reaching, in 2014, 500 000 metric tons of buried soil (MDDELCC, 2017). *A contrario*, phytoremediation, an approach that uses plants and their associated microorganisms to extract, degrade or immobilise environmental contaminants (Bert et al., 2012; Rafati et al., 2011) , is a method which has been studied for the last few decades as a cheaper and more environmentally friendly alternative. It also allows the restoration of the ecological integrity of an ecosystem by reducing the chemical and physical disturbances compared to the conventional methods (Bert et al., 2012). Fast growing plant species such as willows (*Salix spp*) are suited for phytoremediation of poorly fertile and drained brownfield soils because of their high biomass production and well developed root system (Pilon-Smits, 2005; Pulford & Watson, 2003). They can accumulate TE (Courchesne et al., 2017; Desjardins et al., 2016) and have been much studied for the rehabilitation of contaminated soils (Bissonnette et al., 2010; Grenier et al., 2015; Laidlaw et al., 2012). In several studies *Salix nigra*, a native willow species to south eastern Canada was mentioned for its good tolerance and growth on contaminated soil (Beauchamp et al., 2018; Grenier et al., 2015; Mosseler et al., 2014). Plant members of the Brassicaceae family have also been used in many phytoremediation

projects for their ability to accumulate TE (Feigl et al., 2013; Gisbert et al., 2006; Kidd et al., 2009). Among them, *Brassica napus* L., a crop species which grows well in Canada, is known for its good tolerance to copper (Feigl et al., 2013). These species have mostly been tested in monoculture but given that polycultures have several known advantages such as greater biomass production, better stress resistance and complementary root foraging (Loreau & Hector, 2001; Mommer et al., 2010; Wang et al., 2014), the coproduction of these two species might result in a better phytoremediation outcome. Furthermore, there is the possibility to use these plants post culture in order to valorise them and reduce the cost of phytoremediation. They could, for example, be used as animal fodder or for the many molecules that they produce. Willows produce many secondary metabolites in response to stress which are of interest for the biofuel, the pharmaceutical and the nutraceutical industries amongst others (Agence canadienne d'inspection des aliments [ACIA], 1983; Brereton et al., 2017; Muklada et al., 2017).

However, copper is a more difficult element to extract from the soil by phytoremediation since it is strongly bound by organic matter and clay particles which limits its mobility (Kacalkova et al., 2015). When it is absorbed by plants, it is mainly found in the roots. In this context, a phytoremediation technique which involves uprooting plants would allow better extraction of Cu from the soil.

This study was carried out in order to verify the copper phytoextraction potential of *S. nigra* and *B. napus*, assuming that all parts of the plant including the roots would be harvested, and to evaluate if the approach would be more effective when the plants are grown separately or together.

4.3. Material and methods

4.3.1. Growth conditions

The experiment was conducted at the Montreal Botanical Garden (45°33'43.3"N, 73°34'18.0"W) in polyethylene grow tunnel where plants were cultivated in 63L containers for 12 to 17 weeks. The containers had a bottom layer of gravel, soil (Table 1a) and a top 10 cm of compost which

was lightly incorporated in the top 10 cm. The containers also had a hole at the bottom which allowed the excess water to be recovered and returned to the container. The soil was spiked on March 1st with a $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ solution to obtain around 500ppm Cu for concentration 1 (C1) and around 800ppm Cu for concentration 2 (C2) (Table 1b). The soil was humidified and mixed regularly before and after the spiking to homogenise the soil. The soil has an adequate pH for the culture of these two species. It was however prone to compaction, to the formation of solid blocks and was low in phosphorus.

Table 1. a) Soil properties before spiking with CuCl_2 solution

b) Average copper soil content after 3 months with or without spiking for soil treatment Control, C1 and C2

a)

Parameters	Mean concentrations
Ca (kg/ha)	8845
P (kg/ha)	44
Al (ppm)	827
K (kg/ha)	264
Mg (kg/ha)	341
Na (kg/ha)	47
B (ppm)	1,1
Cu (ppm)	8,11
Fe (ppm)	249,8
Mn (ppm)	26,5
Zn (ppm)	6,9
C.E.C. (meq/100 g)	21.3
ISP (%)	2.4
pH-H ₂ O	7,1
Org. mat. (%)	4.5

b)

Soil condition	Mean Cu concentrations	
	mg/kg	SD
Control	36.25	2.63
C1	498.25	31.78
C2	837.75	123.48

Note : Metal analysis by acid digestion and ICP-MS. (mean concentration, n= 4).
SD: standard deviation

Note : Metal analysis was done using the Mehlich III method (n=1).

4.3.2. Experimental design

A complete randomized bloc design was set up in spring 2019 to conduct this experiment. It comprises three soils conditions and four plant treatments repeated in four blocks, as presented in Figure 4. Two species of plants, *Salix nigra* 'S05' and *Brassica napus* L., were used in the experiment. The willow was planted on May 25th with two cuttings per container. The cuttings were kept in a fridge during winter and were dipped in water for 48hrs before planting. The rapeseed was sowed June 25th, at a density of 15 kg/ha. This density is a little higher than those

found in agricultural settings (Ljubljana, 2019; Zoghlami et al., 2013) to negate the impact of the Cu on the germination. The surface of the container was divided in nine sections in which 50 mg of seeds (about 11 seeds) were planted for a total of about 99 seeds (450 mg). The seeds were lightly covered with the soil.

The containers were watered regularly with tap water (city water) in order to maintain a good soil humidity. Soluble fertilizer (Miracle-Gro 24-8-16) at 2.5 mL/L (2 L/container) was added every two weeks from July 17 to the end of the experiment (September 16th).

The experimental design contained randomized blocs of three soil conditions (Control, C1 and C2) and four plant treatments (not planted, *S. nigra*, *B. napus* and a mix of both species). This was replicated four time as shown in Figure 4.

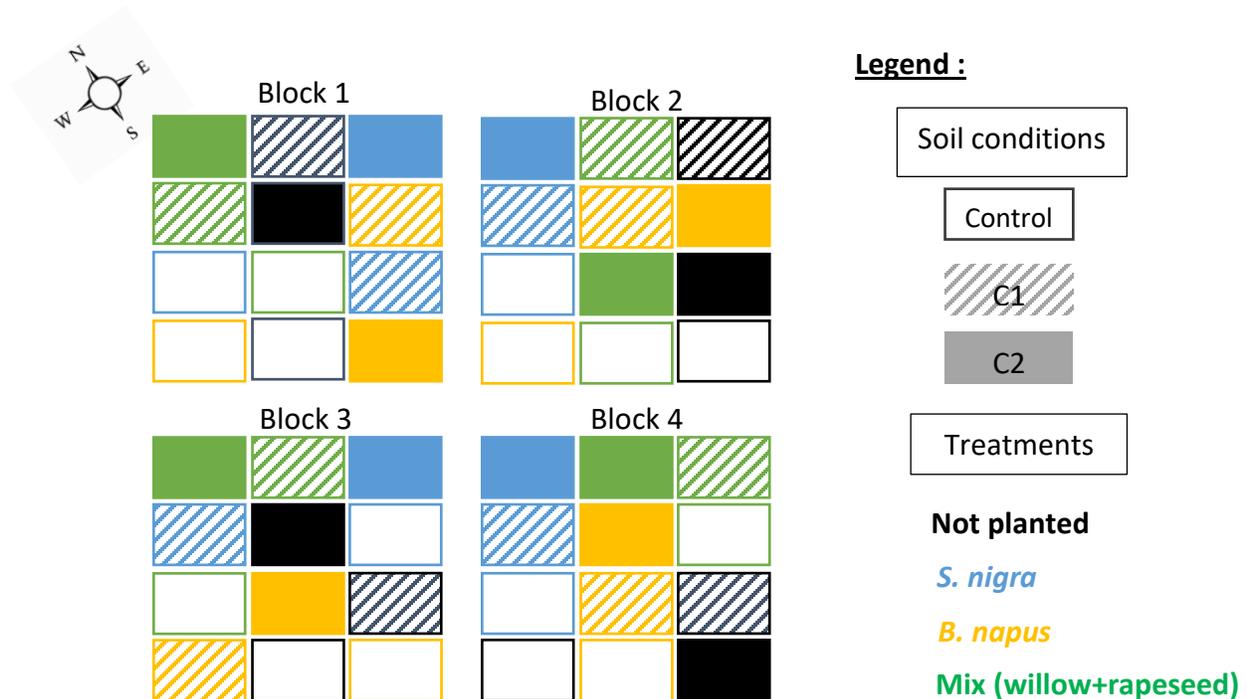


Figure 4. Experimental design

Note : Randomized block design where each block has, for each soil concentration (control, C1, C2) :

- 1 not planted
- 1 willow monoculture (*S. nigra* 'S05')
- 1 rapeseed monoculture (*B. napus* L.)
- 1 rapeseed and willow polyculture

4.3.3. Sampling and analysis

The soil was characterised before planting (Table 1) and the measurements of growth (height and shoot numbers) were taken weekly starting June 6th for the willows and July 17th for the rapeseed. Physiological measures such as photosynthesis (using a Li-cor, LI-6400XT) were taken three times during the growing season (July 2nd, August 2nd and 29th). At the end of the season, soil samples were taken from the rhizosphere and the center and periphery of the container and the aerial and root biomass were harvested for measurements. The biomass of the combined plantation system was separated by species for the aerial biomass. However, the roots of the two species were very difficult to separate and as such were treated as one entity.

The germination rate of *B. napus* was calculated one week after planting and was used as the initial count i.e. 100% survival.

4.3.3.1. Preparation, digestion and measurement of TE in plant samples

The plants collected at the end of the season were separated into aboveground and underground biomass. The tissues were cleaned of soil and debris and dried in the oven at 70°C for 48 hours. The tissues were then weighed, grinded and the fraction <850 µm was used to determine the metal content. For the willows, only one of the two plants per container were grinded and analysed while all the rapeseed grown in a contained was grinded together.

The acid digestions were done as described by Wilson et al. (2005) using a Gerhard bloc digester (Kjeldatherm KB40). About 200 mg of the dried powdered plant samples were put in borosilicate glass tubes with 2 mL of 70% nitric acid and digested for 6hrs at 120°C after which the digested solutions were adjusted to 50mL with 48 mL of MilliQ water. 5 mL of the solutions were then filtered using a 0.45 µm nylon mesh and topped off to 10 mL with MilliQ water to bring the final TE extract solutions to 2% HNO₃.

The digested tissue samples were then analysed using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Perkin Elmer NexION 300x).

The following formula was used to calculate metal concentrations in the analysed tissues.

$$\text{mg TE/kg of sample} = \frac{\text{conc. in solution } (\mu\text{g/L}) * \text{vol. solution (L)}}{\text{mass of digested sample (g)}}$$

The mean copper concentration presented in the results was calculated using only the live plant specimens. The Mix (S+B) data was obtained by adding the data from the mix species that made the plot (weighted by the percent of total biomass). Then, the quantity of copper extracted (in g/ha) by the above-ground and root biomass was calculated by multiplying the concentration of copper by the biomass of the same container and transposed to one hectare.

4.3.3.2. Preparation, digestion and measurement of TE in soil samples

The soil samples were treated similarly as the plant samples where about 200 mg of dried homogeneous and sieved (<850 μm) soil was digested. The final TE extracts were in a 0.4% HNO_3 solution. The digested soil samples were then analysed using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The same formula than digested tissue samples was used to calculate metal concentrations in the analysed soils.

4.3.4. Statistical analysis

The statistical analysis of the data was done using R. A \log_{10} transformation was applied on the data when needed. The data was then analysed using ANOVA's followed by Tukey test. Groups were defined as significantly different when $p \leq 0.05$.

4.4. Results

4.4.1. Survival

Table 2 shows that the survival of the willow cuttings was greatly influenced by the various treatments. *S. nigra*, for instance, had a 100% survival rate in the control condition but this percentage significantly dropped to 25% in C2 conditions (800 ppm) while those growing with rapeseed had a 62.5% survival rate. The high death rate meant that in some cases only one willow

plant survived and grew in the container. When comparing the two planting treatments for each soil condition, there were no significant difference between monoculture and polyculture. Whether grown alone or in the presence of willows, survival rate of *B. napus* was much less affected by the different soil conditions over the growing season.

Table 2. Survival rate (%) of the *S. nigra* and of *B. napus* at the end of the growing season according to the various treatments. There was no significant difference in germination and survival of *B. napus* between the different soil conditions per treatment and between the monoculture and polyculture for each soil condition.

Treatment	Soil condition	Survival rate		
		%	SD	
<i>S. nigra</i> alone	Control	100 %	0.0	a
	C1	100 %	0.0	a
	C2	25 %	28.9	b
<i>S. nigra</i> grown with <i>B. napus</i>	Control	100 %	0.0	a
	C1	100 %	0.0	a
	C2	62.5 %	47.9	b
<i>B. napus</i> alone	Control	86.2 %	10.5	
	C1	86.5 %	4.4	ns
	C2	79.2 %	7.9	
<i>B. napus</i> grown with <i>S. nigra</i>	Control	77.3 %	12.2	
	C1	82.3 %	5.5	ns
	C2	78.2 %	8.3	

Note : Different letters indicate a significant difference between the soil conditions for the same treatment as analysed by two-way ANOVA and Tukey's HSD test ($p \leq 0.05$). C1: 500mg/kg C2 : 800 mg/kg. SD : standard deviation. n=4.

4.4.2. Biomass

A) Impact of soil condition on biomass production

The different soil conditions had little effect on plant growth. Only *S. nigra* in monoculture showed a significant decrease in biomass in C2 treatment because of low survival rate, with an aboveground biomass loss of 66 % and a root biomass loss of 77 % compared to control. Monoculture of rapeseed and the polyculture (Mix (S+B), Mix S. and Mix B.) biomass production remained constant regardless soil treatments ($p \leq 0.05$) (Annex II, table I).

B) Impact of plant treatment on biomass production

S. nigra in monoculture produced significantly less aerial biomass in C2 condition. On the other hand, willow produced the greatest root biomass in C0, and C1 where it equaled polyculture production (Figure 5). In C2, the production of root biomass was very low as it was for the aerial parts.

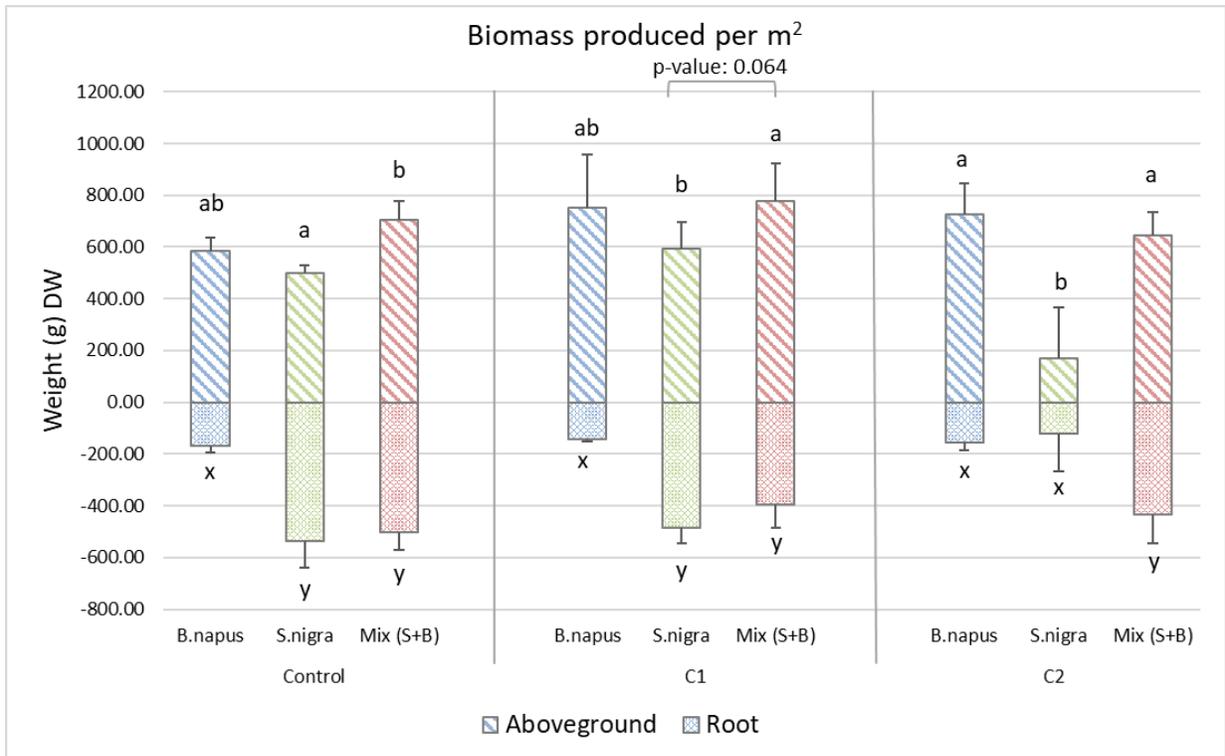


Figure 5. Comparison in the average above and below-ground biomass produced per m² according to each treatment and each soil conditions (n=4). The Mix (S+B) indicates the sum of both the *S. nigra* and the *B. napus* grown in the same container. Error-bars are SD. The different letters over and below the columns indicate a difference between the plant treatments for the same soil condition as analysed by linear mixed-model ANOVA and Tukey HSD test ($p \leq 0.05$ if not stated otherwise).

C) Impact of polyculture on individual plant species

When polyculture assemblage was compared with its respective monoculture, rapeseeds in polyculture were significantly smaller in biomass than monoculture for all three soil conditions (Figure 6). There was a 53%, 38% and 57% decrease for the control, C1 and C2 respectively indicating a negative competition of *S. nigra* on *B. napus* in our treatments. Comparatively, willow was much less affected by the planting regime, with the exception of C1 soil condition where plants in polyculture were 48 % smaller than when planted alone.

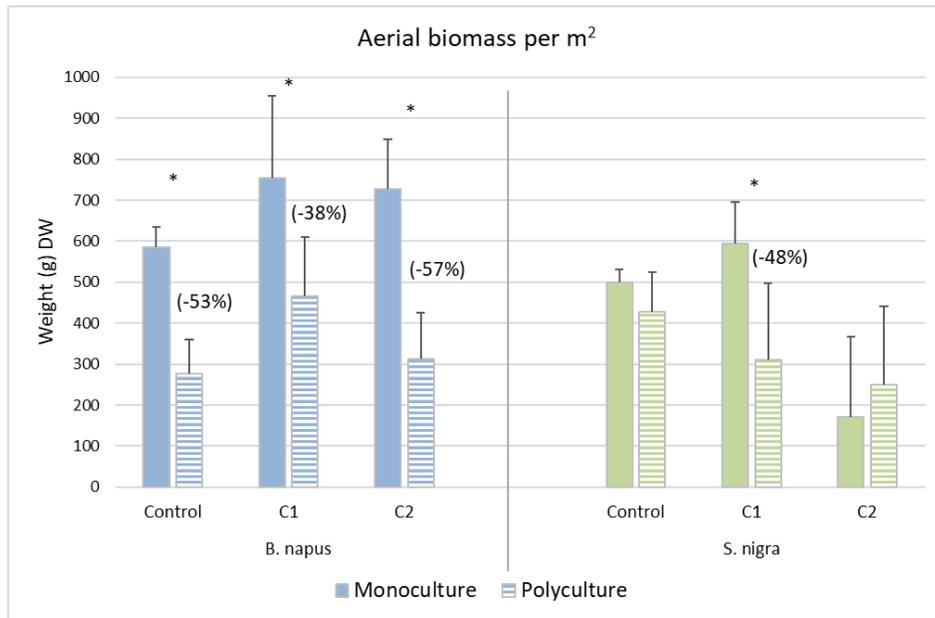


Figure 6. Comparison in the average aboveground biomass produced per m² of each species according to each treatment condition (monoculture vs. polyculture) and each soil conditions. Error-bars are SD (n=4). The asterisk (*) over the columns indicate a difference between the monoculture and polyculture treatment for each species for the same soil condition as analysed by two-way ANOVA and Tukey's HSD test (p≤0.05). The numbers in parentheses are the percentage of biomass loss compared to monoculture.

4.4.3. Copper concentration

A) Impact of soil condition on copper accumulation in plant tissues

As expected, the copper concentration found in the aerial biomass (in mg/kg) was significantly greater in plants grown in the Cu-spiked soil in comparison to control (Annex II, table II). In C2, monocultures tended to have a higher Cu concentration in their tissues in comparison to C1 soil (p-value of 0.036 and 0.057 for the difference between C1 and C2 for *B. napus* and *S. nigra*

monoculture respectively). There was no significant difference between the C2 and C1 soil for the polyculture treatment. The copper concentration found in the root biomass (in mg/kg DW) was greater in plants grown in contaminated soil but mean values were not significantly different between C1 and C2 soil.

B) Comparison of copper concentration in the plant species

Figure 7 allows comparisons between the species in monoculture and the polyculture. In C1, *S. nigra* in monoculture showed significant lower Cu concentration in its aerial parts. Both plant species tended to accumulate a higher concentration of Cu in their roots. *B. napus* roots had values superior by more than 40 to 50% to those determined for willows or in the root of the polyculture (Figure 7).

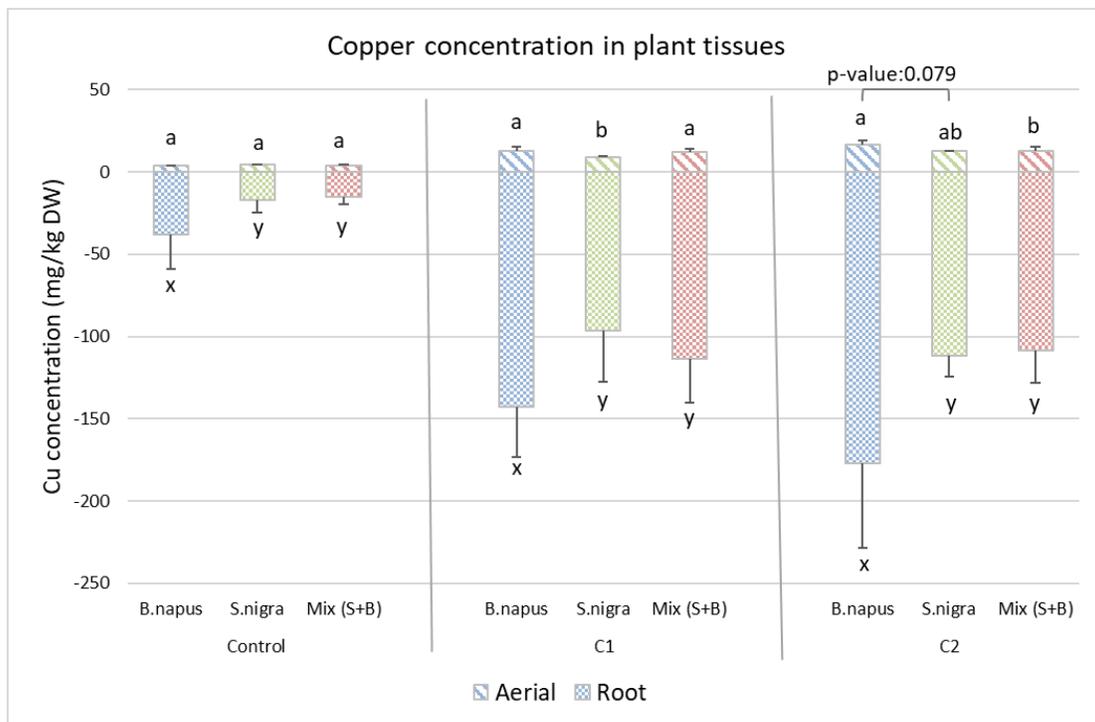


Figure 7. Comparison of aboveground and root copper concentrations for the two species grown in monoculture vs the polyculture plant treatment for each soil conditions. The Mix (S+B) indicates the sum of both the *S. nigra* and the *B. napus* grown in the same container. Error-bars are SD. Different letters in a row indicate a significant difference in the [Cu] between the plant treatment for the same soil condition as analysed by linear mixed-model ANOVA and Tukey's HSD test ($p \leq 0.05$).

4.4.4. Potential phytoextraction capacities

Considering the Cu concentrations in above and belowground plant parts and the surface of the containers, we estimated the potential quantities of Cu that could be phytoextracted per hectare (Annex II, table III for exact values). The rapeseed monoculture and the polyculture grown in C1 and C2 soil could extract the highest quantities of Cu. For the willow in monoculture the extractables quantity of Cu would be relatively weak if we consider the aerial parts but the estimated quantities of Cu in roots are more important, especially in C1 treatment which is statistically comparable to those calculated for the polyculture (Figure 8). The estimated calculations for roots of polyculture showed high constant values for both C1 and C2 conditions (Annex II, table III).

Overall, the majority of the copper was found in the roots for both species. The polyculture treatments had a similar copper uptake to the most productive monoculture which was *S. nigra* in C1 soil and *B. napus* in C2 soil (Figure 8).

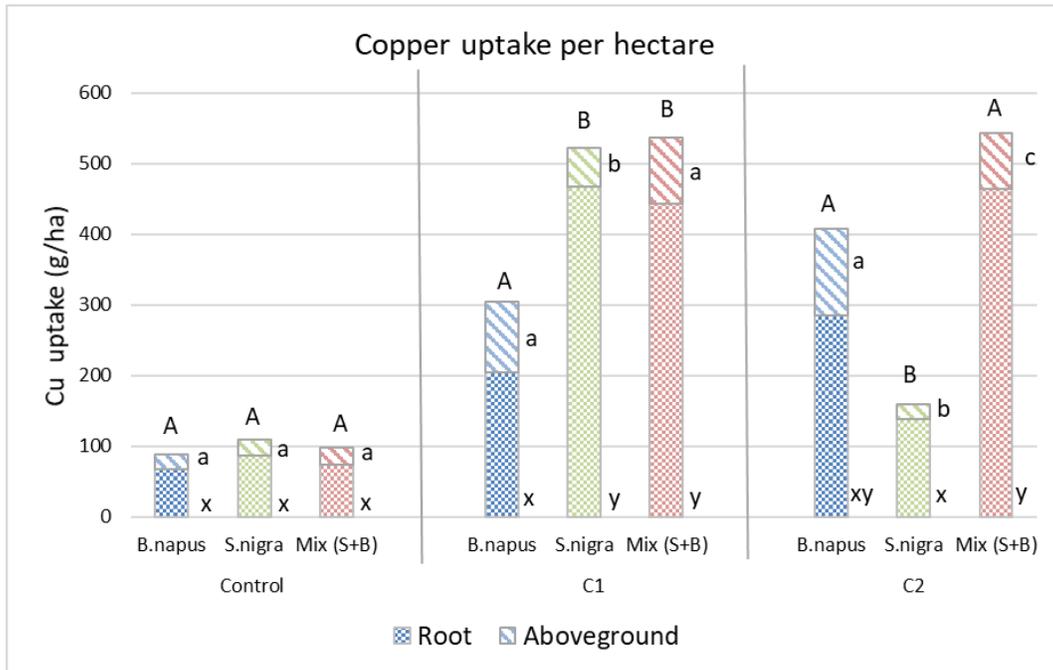


Figure 8. Comparison of mean copper accumulation (in grams) in aboveground and belowground biomass per hectare (10 000 m²) for each soil condition taken at the end of one growing season. Different letters in a row within the same soil category indicate a difference as analysed by linear-mixed model ANOVA and Tukey's HSD test ($p \leq 0.05$). The capital letters indicate difference in the total Cu uptake by the plants per hectare while the bottom lowercase letter (x-y) are for the roots and the top (a-b-c), for the aerial parts.

4.4.5. Soil structure

The soil of containers in which plant grew had a better structure than the non planted (Figure 9). The soil was more aerated, more granular and easier to work in.



Figure 9. Soil structure. A) Container with plants, soil structure more granular. B) Container without plants, soil more compact with fissures. Pictures taken Sept. 16th, 2019.

4.5. Discussion

We experimented with two distinct species, *B. napus* L., an herbaceous known for its phytoremediation capabilities and *S. nigra* 'S05', a fast-growing woody species recognised for its tolerance to contaminated soil to compare their phytoremediation potential in copper contaminated soil when grown together or in monoculture.

4.5.1. Survival and biomass production

In previous studies, *S. nigra* 'S05' has been shown to tolerate moderate level of contamination (Beauchamp et al., 2018; Grenier et al., 2015) which is consistent with our results where the willow survived very well in C1 soil but had a high mortality rate at the higher contamination level (C2). In these conditions, plant death occurred within the first month after planting. Copper can inhibit root formation and cause root deformation (Yruela, 2009) and this probably interfered with the development of root from the cuttings causing the mortality once the internal reserves were used. On the other hand, the survival of rapeseed was not significantly impacted by soil Cu concentration. *B. napus* is known for its tolerance of copper (Feigl et al., 2013; Purakayastha et al., 2008) and we hypothesized that the copper concentration might be lower in the surface layer

of the container since compost was incorporated in the first few centimeters of the soil. In addition, compost is high in organic matter which adsorbs copper and could reduce its mobility and bioavailability within that layer (Yrueala, 2009). It is also possible that since the soil was spiked, the copper was less adsorbed to the soil and was therefore more mobile and migrated lower within the container (creating a Cu concentration gradient or Cu rich pockets/zones). The *B. napus* was seeded within the first centimeters of soil and had most of its roots in the top half of the soil while the willow cuttings were planted vertically and started developing roots lower within the container. This could partly explain the lack of significant difference in germination and survival of rapeseed between the control and the copper spiked soil.

Biomass production is an important aspect considered in the choice of plant species used in phytoremediation (Pilon-Smits, 2005; Pulford & Watson, 2003). High level of copper has been shown to lead to decreased aerial and root biomass in willows (Beauchamp et al., 2018; Desjardins et al., 2016; Grenier et al., 2015; Reichman, 2002) which was reflected in our results for *S. nigra* where biomass (above and belowground) were greatly reduced at high Cu concentration (C2). Nevertheless, the willows did produce a good aerial biomass under control or C1 soil condition. In monoculture, 'S05' produced a smaller but not statistically different aerial biomass than the *B. napus* monoculture but had a much bigger root biomass (over three times the root biomass of rapeseed). However, when grown in polyculture in copper-spiked soil, the willow was less productive than the rapeseed. Under polyculture control conditions, the willow produced about 50% more aerial biomass than the rapeseed, while in C1 and C2 soil, the rapeseed produced more aerial biomass than the willow (about 50% and 25% more in C1 and C2 soil respectively). Furthermore, the biomass production of rapeseed was not significantly impacted by soil Cu concentration and *B. napus* also had a significantly smaller aerial biomass when grown in polyculture compared to the monoculture. *S. nigra*, on the other hand, produced a similar biomass in monoculture and polyculture for two of the three soil conditions (Control and C2). These results could suggest that the willows were more affected by copper soil concentration, and *B. napus* by the inter-species competition. A study on polycultures of herbaceous species and willows (*S. myebean* in this case) also showed that willow biomass production was similar whether grown in polyculture or monoculture (Desjardins et al., 2018). This could suggest the

presence of asymmetric competition (Freckleton & Watkinson, 2001; Weiner, 1990) where the willow is more competitive due, for example, to its greater initial reserves and bigger size and as such was not significantly influenced by the presence of an herbaceous species. This could be interesting for future experiments if other plant species could be used alongside willows without decreasing the effectiveness of the soil treatment by the willow. Furthermore, while *B. napus* has mostly been studied in agricultural setting (in terms of competitiveness, yield and weed suppression) most studies seem to indicate that rapeseed is sensitive to competition and has a decreased aboveground biomass when in presence of another species (Beckie et al., 2008; Daugovish et al., 2002; Naderi & Ghadiri, 2011). We expected both species to have a lower biomass and higher mortality rate in the more heavily contaminated soil as reported in other studies (Ebbs & Kochian, 1997; Marchiol et al., 2004; Mourato et al., 2015). The results we got could be due to differences in cultivar as well as cultural conditions (e.g. bioavailability of Cu decreases at neutral and alkaline pH) (Mourato et al., 2015). For example, it has been shown that antioxidant enzymic activity (e.g. superoxide dismutase (SOD) activity) in response to copper induced oxidative stress varies between cultivars of *B. juncea* (Singh, 2010). Moreover, in this study we did not evaluate the mobile fraction of Cu in the soil. We assumed that since the soil was similar for all treatments, the bioavailability of copper would be the same. However, it is possible that the species or the mix of those two species has differently influenced this bioavailability. Nguyen et al. (2017) has shown in this regards that the bioavailability of certain trace elements, including copper, could be affected depending on the plant species that was cultivated. It could have been relevant to verify if indeed the bioavailability of Cu had been affected. When grown together, the total root and aerial biomass was not significantly affected by the soil conditions and produced a similar biomass as the highest performing monoculture i.e. *B. napus* for aerial biomass and *S. nigra* for root biomass with the exception of root biomass in C2 soil. In C2 soil, the polyculture produced a higher root biomass than either of the monocultures. This could suggest that there is a protection offered by the rapeseed to the willow when they are grown together, i.e. there is more facilitation than competition between the two species (Desjardins et al., 2018; Wang et al., 2014). This is congruent with other studies which have shown that polyculture led to higher biomass production and better stress resistance (Smith et al., 2008; Wang et al., 2014). Since the most

productive monoculture for root and aerial biomass varied depending on soil concentration, the polyculture offered the best and most consistent outcome in total biomass production.

The polyculture also had the advantage of offering a better soil exploration since *B. napus* had many very fine roots which were mostly in the first half of the container while *S. nigra* had much larger roots which explored the entirety of the container but tended to develop in the bottom and the sides of the containers (Figure 10). The mix would theoretically allow for more root surface area potentially leading to greater phytoremediation. However, it is also possible that the plants would avoid the most stress inducing areas i.e. root foraging behavior which would avoid the highly contaminated areas in favor of those contributing to plant growth and development (Haines, 2002; Hodge, 2004; Tognacchini et al., 2020).

4.5.2. Phytoremediation potential

The copper concentration in the plant tissues was much greater in the roots than the aerial biomass for all three plant treatments as reported in several studies (Courchesne et al., 2017; Feigl et al., 2013; Herrero et al., 2003; Purakayastha et al., 2008) indicating poor translocation of the trace elements. Nevertheless, between the two species, rapeseed would be a better Cu accumulator than *S. nigra* since it had a higher Cu concentration in aboveground tissues which also increased with increasing Cu soil concentration. *B. napus* also had the highest root copper concentration of the three treatments. However, its low root biomass made it less efficient at overall Cu uptake than the polyculture and *S. nigra* monoculture treatment. But, as mentioned above, *S. nigra* in monoculture performs poorly in C2 soil, having a similar total Cu uptake as the control due to its high mortality rate. Therefore, even if the Cu concentration in tissues of the

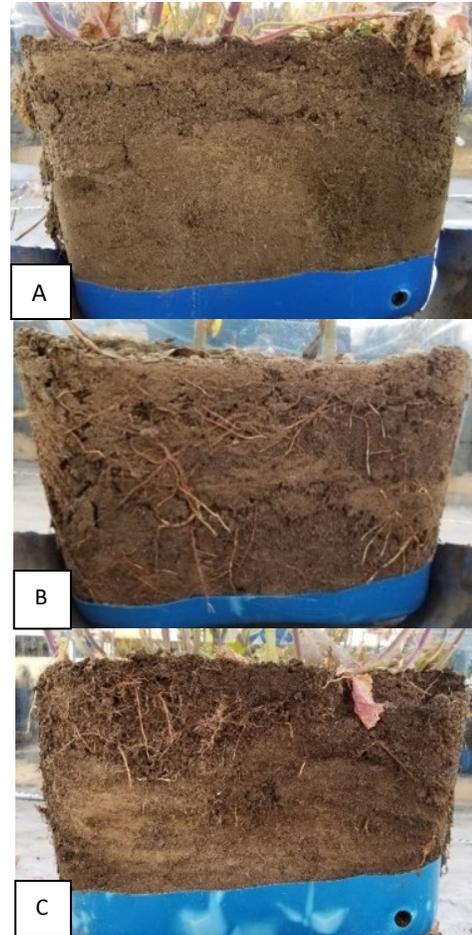


Figure 10. Root exploration in C1 soil of *B. napus* monoculture (A), *S. nigra* monoculture (B) and Mix (S+B) polyculture (C). Photos taken September 16th, 2019.

polyculture was not the biggest, the mix had the best total Cu uptake potential across all soil conditions. The aerial Cu uptake (g/ha) by *S. nigra*, in monoculture and polyculture was similar between the control and both contaminated soils meaning that while there was a difference in the aerial Cu concentration between the contaminated and non-contaminated soils there was no difference in copper uptake.

This could suggest that *S. nigra*, while able to accumulate Cu in its aboveground tissues, would be more useful for its phytostabilisation capacities particularly when grown in monoculture and in presence of a high Cu contamination. Other studies have also reached similar conclusions where willows accumulate a bigger amount of TE in belowground biomass (Courchesne et al., 2017; Desjardins et al., 2016; Desjardins et al., 2018). Therefore, combining willows with species with a higher TE uptake in their aerial biomass such as rapeseed would be beneficial. As such, the polyculture, in addition to producing the most overall biomass would provide the best of both phytoremediation aspect of each species. It would allow for the maximum stabilization and extraction of Cu of all three treatments. Furthermore, since most of the copper was found in the roots, a phytoremediation technique involving the uprooting of plants, would be the most efficient way of ensuring Cu removal from the soil.

The polyculture had a total copper uptake similar to the most efficient monoculture (*S. nigra* in C1 soil and *B. napus* in C2 soil) and is the most promising option between the three plant treatments for various levels of soil Cu contamination, a situation which is often found in brownfields. Of course, the uprooting of plants would present new challenges and multiple other factors would have to be studied and taken into consideration. For example, which technique to use to uproot plants most efficiently, what would be the additional cost associated with the extra work and replanting, how to dispose of the contaminated residues, etc. The design and timing of the plantations would also have to be further studied. Should the different species be planted in alternating rows? Should all species be planted at the same time or spaced out? What is the optimal polyculture plantation density which would lead to a greater biomass potential? The valorisation of the extracted plants would also have to be considered. The uprooted plants could, for example, be turned to ash and disposed of in a specialized site, greatly reducing the volume of hazardous material to be buried in comparison to the initial biomass (Chaney et al., 2005).

A phytoremediation approach also has the benefit of maintaining and ameliorating the physical and chemical properties of the soil. In our case, containers with plants had much better soil structure. The soil was less dense and more granular than the non planted making it easier to work with. This would make future planting and the subsequent extraction easier. It would also mean that the soil is more permeable, allowing better water absorption and therefore limiting runoff.

4.6. Conclusion

In this experiment, we were interested in testing various approaches to remediate copper contaminated soil commonly found in brownfield. We looked at two species, *B. napus* L., an herbaceous agricultural plant, and *S. nigra* 'S05', a fast-growing woody species, in monoculture and polyculture in two different levels of Cu-spiked soil. Copper is known for its low mobility and is generally found in higher concentration in the roots of plants than their aerial biomass which was congruent with our results for both species. Therefore, the removal of the entire plant would allow for the biggest Cu removal from the soil. The polyculture treatment had the highest Cu uptake capability in varied level of Cu contaminated soil. This approach will have to be tested in the field to determine the best planting design and root removal technique and which species or combination of species is better suited to the technical aspect of this method with all that it entails (e.g. different planting and soil management, possible cost increase, etc.)

N.B. : Les références bibliographiques de cette publication ont été reportées à la fin du manuscrit (avec l'ensemble des autres références bibliographiques) afin d'éviter les redondances et ainsi faciliter la lecture de cette partie.

4.7. Interprétation et discussion des principaux résultats obtenus

Nous avons constaté que l'utilisation de *B. napus* et *S. nigra* en polyculture était plus avantageuse que leur monoculture et que leur combinaison avait permis de produire une plus grande biomasse pour tous les traitements (Témoin, C1 et C2). En effet, la polyculture produit une biomasse semblable à la monoculture la plus productive (le colza pour la biomasse aérienne et le saule pour la biomasse racinaire). De plus, elle produit une biomasse racinaire plus grande que les deux monocultures au plus haut niveau de contamination (C2). Cela suggère une plus grande résistance au stress de contamination qui pourrait être due au phénomène de facilitation (Desjardins et al., 2018; Li et al., 2014). D'ailleurs, d'autres études ont montré que la polyculture permettait d'augmenter la biomasse produite et offrait une plus grande résistance au stress (Smith et al., 2008; Wang et al., 2014). De plus, nous avons observé qu'une concentration élevée en cuivre (800 ppm) avait eu un impact négatif sur la survie et la biomasse de *S. nigra* alors qu'elle n'avait eu aucun impact significatif sur *B. napus*. Ce dernier ayant davantage été affecté lorsqu'il a été cultivé en polyculture. **Cela suggère que le colza est plus affecté par la compétition avec le saule tandis que le saule est plus sensible au niveau élevé de contamination du sol en Cu.** Nous nous serions attendus à ce que les deux espèces aient une biomasse réduite et un taux de mortalité plus élevé dans le sol contaminé tel que le suggérait la littérature (Ebbs & Kochian, 1997; Marchiol et al., 2004; Mourato et al., 2015). Il est possible que cela soit dû au cultivar de colza et aux conditions de sol (par exemple, la distribution du cuivre dans le sol et sa biodisponibilité). Le colza a été semé en surface, une zone plus riche en compost alors que les boutures de saule ont été plantées verticalement à une profondeur d'environ dix centimètres. L'incorporation de compost en surface combinée au fait que le sol soit « spiké » et donc que le cuivre soit plus mobile pourrait avoir fait en sorte que la concentration de cuivre en surface était plus faible. Il serait donc intéressant de poursuivre cette étude en ayant une idée plus précise du comportement du Cu dans le sol et donc de l'impact des caractéristiques physicochimiques du sol sur sa biodisponibilité.

Pour les trois différents traitements de plante, la plus grande concentration et quantité de cuivre se trouve dans les tissus racinaires. Le colza possède la plus grande capacité de concentration du cuivre dans ces tissus aériens et racinaires. Toutefois, puisqu'il produit une faible biomasse, il

absorbe par hectare une plus faible quantité que le saule et la polyculture en C1. En concentration plus élevée de Cu (C2), le haut taux de mortalité du saule diminue sa capacité à accumuler du cuivre et devient le traitement le moins efficace. Lorsque l'on regarde les deux conditions de sol contaminé, **la polyculture est le traitement qui performe le mieux en général.**

La manière la plus efficace d'extraire le cuivre du sol serait d'arracher les plants afin de récupérer la biomasse racinaire en plus de la biomasse aérienne ce qui présente de nombreux nouveaux défis.

Chapitre 5 — Conclusions et perspectives

Cette étude nous a permis d'étudier la capacité de phytoremédiation de deux espèces végétales, le *B. napus* L., une plante agricole de la famille des Brassicacées et le *S. nigra*, une espèce ligneuse indigène du sud-est du Canada, plantées en monoculture ou en combinaison dans un sol contaminé artificiellement en cuivre à des concentrations couramment rencontrées dans les terrains de friches industrielles (500 et 800 ppm). **La polyculture de ces deux espèces s'est avérée être le traitement qui performait le mieux en général.** Nous avons pu valider certaines de nos hypothèses de départ, à savoir que :

- Les deux espèces accumulent plus de cuivre dans leur système racinaire que les parties aériennes.
- La complémentarité exploratoire de leur système racine permettrait une meilleure efficacité pour traiter une contamination au cuivre dans le sol que leur monoculture.

De plus, le colza s'étant avéré comme le plus propice à la phytoextraction et le saule à la phytostabilisation du Cu, leur combinaison permet d'allier efficacement ces deux aspects phytoremédiateurs. Comme la majorité du Cu accumulé par ces plantes se trouve dans leur système racinaire, la manière d'extraire le plus de cuivre du sol serait alors d'arracher l'intégralité des plants afin de récupérer la biomasse racinaire en plus de la biomasse aérienne. De plus, leur arrachage pourrait être une manière de raccourcir le temps nécessaire pour décontaminer un site à l'aide de la phytoremédiation. En effet, l'arrachage n'est pas une technique très utilisée en phytoremédiation et présente de nouveaux défis. Par exemple, quelle serait la meilleure technique pour déraciner les plantes le plus efficacement possible et à moindre coût ? Quels seraient les coûts associés à cette technique (arrachage, replantation, main-d'œuvre, coût du matériel végétal, machinerie, entretien...) et comment éliminer et/ou valoriser les résidus végétaux contaminés ? Quelle devrait être la fréquence d'arrachage ? À la fin de chaque saison de croissance ? Cela impliquerait de nombreuses manœuvres à réaliser chaque année (plantation

et arrachage) et des coûts plus élevés. Toutefois, le sol devrait être plus facile à travailler les années suivantes (comparer au sol initial) tant que les bonnes techniques de travail du sol sont utilisées pour réduire les problèmes liés au travail répété tels que la compaction et la perte de structure (Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et des Affaires rurales de l'Ontario [MAAARO], 2017; Munger, 2014). Le type de machinerie serait également à considérer. De la machinerie lourde peut causer de la compaction et peut être dispendieuse. D'un autre côté, si on attend trois saisons de croissance et plus, les plantes seront-elles trop difficiles à déraciner ?

Il est donc nécessaire d'approfondir notre étude et d'étudier les paramètres qui permettraient d'optimiser notre approche par plantation en polyculture et arrachage. La conception et le calendrier des plantations et récoltes devraient être étudiés afin de sélectionner les meilleures combinaisons et techniques culturales (culture en rangées alternées ou en mélange) d'espèces, la densité et la durée de plantation la plus adéquate pour une production optimale de biomasse. D'autres espèces ou combinaisons d'espèces pourraient également être ajoutées et/ou testées, en plus du colza et du saule. Toutefois, il faudra considérer la valorisation des résidus des différentes espèces. De plus, il serait intéressant de tester une fertilisation NPK (azote, phosphore, potassium) plus adéquate ainsi que d'autres amendements qui pourraient augmenter la qualité du sol ainsi que le rendement d'extraction du Cu par les plantes (Giagnoni et al., 2020). Dans certains cas, il faudra également considérer le travail préparatoire du sol. Par exemple, les friches industrielles ont généralement un sol compacté, minéralisé, mal drainé et pauvre. Un travail mécanique initial avec l'ajout d'amendement offrirait une meilleure chance de survie et d'implantations des cultures désirées. Dans notre expérience, en plus du compost initial, de l'engrais liquide a été ajouté à intervalle régulier tout au long de la saison de croissance. L'utilisation d'engrais chimique liquide n'est pas une solution pratique pour des grandes surfaces en plus de ne pas être la solution la plus écologique. Il faudrait donc considérer d'autre source d'amendement afin d'apporter les nutriments nécessaires pour une bonne croissance à un sol souvent pauvre. L'utilisation d'amendement tel que le compost et le fumier (si l'emplacement du site le permet) ainsi que de la chaux (pour corriger le pH au besoin) serait une meilleure solution pour améliorer la fertilité du sol. De plus, avec l'aménagement d'un système de compostage dans

de nombreuses villes, il serait plus facile d'en obtenir localement et ainsi participer à l'économie circulaire.

Un autre défi non négligeable concerne la diminution des coûts de mises en œuvre d'une telle technologie. C'est pourquoi il serait important de compléter nos travaux par une étude plus poussée de la valorisation des résidus végétaux issus de cette polyculture et ainsi déterminer celle qui sera la plus appropriée dans notre cas. Les résidus de culture pourraient être valorisés de plusieurs manières. Ils peuvent être traités après leur récolte par combustion par exemple, pour être éliminés comme des déchets dangereux et disposés dans un site d'enfouissement sécurisé ; de cette manière, le volume de cendres contaminées à mettre en décharges spécialisées est nettement diminué par rapport au volume de biomasse initiale (Chaney et al., 2005). Les résidus pourraient également être utilisés pour produire de l'énergie et pour du « phytomining », une option qui permettrait de récupérer le cuivre stocké dans la biomasse végétale (Ghori et al., 2016; Robinson et al., 2015). Une autre possibilité serait d'incorporer les parties aériennes dans l'alimentation de certains animaux et possiblement dans la production d'huile pour du biocarburant dans le cas du colza (Park et al., 2012). Selon le tableau 4 de l'annexe 1 (art. 5) des règlements sur l'alimentation du bétail du Canada (ACIA, 1983), les aliments destinés aux animaux d'élevage de volailles, aux élevages porcins, et aux lapins ont une limite maximum de 125 ppm de Cu. Les élevages bovins quant à eux, ont une limite de 50 à 100 ppm de Cu selon le type d'élevage. Les aliments comprennent généralement un mélange de différents ingrédients et puisque les parties aériennes du colza récupéré à la suite de cette expérience comprennent des concentrations plus petites (moins de 17 ppm en C2), il pourrait être inclus dans leur alimentation. De plus, les graines de canola pourraient être utilisées pour produire du tourteau d'oléagineux, un important ingrédient protéique dans l'alimentation animale (MAAARO, 2016). Les parties aériennes du saule pourraient également être utilisées pour nourrir certains ruminants, puisqu'elles contiennent une concentration de cuivre plus faible que le colza. De plus, le saule produit divers composés (acide salicylique entre autres) ayant des impacts positifs sur la santé des animaux tels que les chèvres (Muklada et al., 2017). Plusieurs autres molécules produites par le saule auraient de nombreuses applications intéressantes. Le saule produit des métabolites secondaires qui, lorsqu'extrait, pourrait être utilisé dans de nombreux contextes tels

que du biocarburant, des biofloculants, des biocoagulants, des composés pharmaceutiques (acides salicyliques, acides benzoïques, etc.), des bioadditifs pour les aliments fonctionnels et l'industrie nutraceutique, etc. (Brereton et al., 2017; Tebbens & Statistics Canada, 2005). Ces différentes avenues de valorisation des résidus permettraient de réduire les coûts associés à la décontamination par la phytoremédiation en plus de favoriser l'aspect agriculture urbaine de ce type de projet.

La courte saison de croissance rend la phytoremédiation plus difficile au Québec, mais elle amène d'autres bénéfices que les méthodes conventionnelles ne peuvent offrir. La phytoremédiation permet, entre autres, de :

- valoriser les friches industrielles laissées à l'abandon;
- d'offrir des services écosystémiques : augmentation de la biodiversité, gestion de l'eau pluviale, verdissement des quartiers, lutte contre les îlots de chaleurs, diminution du lessivage, purification de l'air...
- d'améliorer la qualité des sols : diminuer la compaction, augmenter la fertilité, etc.,
- de participer au développement de l'agriculture urbaine des villes,
- de participer à une économie circulaire (lorsque les résidus sont valorisés),
- etc.

Nous avons rencontré plusieurs difficultés lors de cette expérience. Par exemple, les bacs n'avaient pas tous la même structure de sol. Certains avaient une structure plus granuleuse alors que d'autres avaient beaucoup plus de mottes de terre. Nous avons tenté d'homogénéiser le plus possible les sols afin qu'ils aient une structure similaire et une répartition du contaminant uniforme (selon chaque condition de sol). Le sol initial provenait du même endroit et a été réparti aléatoirement dans les bacs et chaque bac a été humidifié et mélangé manuellement à de nombreuses reprises pendant trois mois. Toutefois, l'hétérogénéité du sol est une caractéristique représentative des conditions sur le terrain. Nous avons choisi de « spiker » le sol plutôt que d'utiliser un sol contaminé de longue date puisque cela nous permettait de limiter le nombre de facteurs confondant et d'étudier la réponse des plantes au cuivre spécifiquement. Nous sommes

conscients que l'utilisation d'un tel sol ne reflète pas la réalité du terrain où, entre autres, la biodisponibilité des contaminants est généralement moindre.

Il sera donc important de confirmer dans des expériences futures si les résultats obtenus dans cette étude en conditions semi-contrôlées s'avèrent les mêmes qu'en condition terrain pour lesquelles s'ajoutent de nombreux facteurs confondants, et notamment ceux des contaminations multiples, des conditions physico-chimiques du sol, des conditions météorologiques. Néanmoins, ces travaux constituent un point de départ intéressant mettant en évidence l'intérêt de la polyculture pour de futures études en condition terrain.

Références bibliographiques

- Agence canadienne d'inspection des aliments. (1983, juillet 15). *Règlement de 1983 sur les aliments du bétail (DORS/83-593)* [Gouvernemental]. Site Web de la législation. <https://laws-lois.justice.gc.ca/fra/reglements/DORS-83-593/TexteComplet.html>
- Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere*, *91*(7), 869–881. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2013.01.075>
- Baker, A. J., & Brooks, R. (1989). Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*, *1*(2), 81–126.
- Beauchamp, S., Jerbi, A., Frenette-Dussault, C., Pitre, F. E., & Labrecque, M. (2018). Does the origin of cuttings influence yield and phytoextraction potential of willow in a contaminated soil? *Ecological Engineering*, *111*, 125-133.
- Beaulieu, M., Martel, R., & Fortin, C. (2016). *Guide d'intervention—Protection des sols et réhabilitation des terrains contaminés*. Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques.
- Beckie, H. J., Johnson, E. N., Blackshaw, R. E., & Gan, Y. (2008). Productivity and quality of canola and mustard cultivars under weed competition. *Canadian Journal of Plant Science*, *88*(2), 367-372.
- Bert, V., Hadj-Sahraoui, A., Leyval, C., Fontaine, J., & Ouvrard, S. (2012). *Les phytotechnologies appliquées aux sites et sols pollués : État de l'art et guide de mise en oeuvre* (Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie, Éd.). EDP sciences.
- Bertness, M., & Callaway, R. (1994). Positive Interactions in Communities. *Trends in Ecology & Evolution*, *9*(5), 191-193. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(94\)90088-4](https://doi.org/10.1016/0169-5347(94)90088-4)
- Bissonnette, L., St-Arnaud, M., & Labrecque, M. (2010). Phytoextraction of heavy metals by two Salicaceae clones in symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi during the second year of a field trial. *Plant and Soil*, *332*(1-2), 55-67. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0273-x>
- Bonet, A., Pascaud, G., Faugeron, C., Soubrand, M., Joussein, E., Gloaguen, V., & Saladin, G. (2016). Douglas fir (*pseudotsuga menziesii*) plantlets responses to as, PB, and sb-contaminated soils from former mines. *International Journal of Phytoremediation*, *18*(6), 559-566. <https://doi.org/10.1080/15226514.2015.1086297>
- Brereton, N. J. B., Berthod, N., Lafleur, B., Pedneault, K., Pitre, F. E., & Labrecque, M. (2017). Extractable phenolic yield variation in five cultivars of mature short rotation coppice willow from four plantations in Quebec. *Industrial Crops and Products*, *97*, 525-535. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.049>

- Brooker, R. W., Maestre, F. T., Callaway, R. M., Lortie, C. L., Cavieres, L. A., Kunstler, G., Liancourt, P., Tielboerger, K., Travis, J. M. J., Anthelme, F., Armas, C., Coll, L., Corcket, E., Delzon, S., Forey, E., Kikvidze, Z., Olofsson, J., Pugnaire, F. I., Quiroz, C. L., ... Michalet, R. (2008). Facilitation in plant communities: The past, the present, and the future. *Journal of Ecology*, *96*(1), 18-34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2007.01295.x>
- Callaway, R. M., Brooker, R. W., Choler, P., Kikvidze, Z., Lortie, C. J., Michalet, R., Paolini, L., Pugnaire, F. I., Newingham, B., Aschehoug, E. T., Armas, C., Kikodze, D., & Cook, B. J. (2002). Positive interactions among alpine plants increase with stress. *Nature*, *417*(6891), 844-848. <https://doi.org/10.1038/nature00812>
- Campagna, C., Normandin, L., Gauvin, D., Levallois, P., & INSPQ. (2013). *Cuivre* [Gouvernemental]. Institut national de santé publique du Québec. <https://inspq.qc.ca/eau-potable/cuivre>
- Chaney, R. L., Angle, J. S., McIntosh, M. S., Reeves, R. D., Li, Y.-M., Brewer, E. P., Chen, K.-Y., Roseberg, R. J., Perner, H., Synkowski, E. C., Broadhurst, C. L., Wang, S., & Baker, A. J. M. (2005). Using hyperaccumulator plants to phytoextract soil Ni and Cd. *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, *60*(3-4), 190-198.
- Chevrier, É. (2013). *La phytoremédiation, une solution d'avenir pour le Québec* [Memoire]. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Cluis, C. (2004). Junk-greedy Greens : Phytoremediation as a new option for soil decontamination. *BioTeach Journal*, *2*, 61-67.
- Commission des normes, de l'équité, de la santé et de la sécurité du travail. (2019). *Repertoire toxicologique—Cuivre*. https://www.csst.qc.ca/prevention/reptox/Pages/fiche-complete.aspx?no_produit=3558
- Conseil canadien des ministres de l'environnement. (1999). *Recommandations canadiennes pour la qualité des sols : Environnement et santé humaine- Cuivre*. <http://ceqg-rcqe.ccme.ca/download/fr/175>
- Courchesne, F., Turmel, M.-C., Cloutier-Hurteau, B., Constantineau, S., Munro, L., & Labrecque, M. (2017). Phytoextraction of soil trace elements by willow during a phytoremediation trial in Southern Québec, Canada. *International Journal of Phytoremediation*, *19*(6), 545-554. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1267700>
- Curie, C., Cassin, G., Couch, D., Divol, F., Higuchi, K., Le Jean, M., Misson, J., Schikora, A., Czernic, P., & Mari, S. (2009). Metal movement within the plant : Contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of Botany*, *103*(1), 1-11. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn207>
- Daugovish, O., Thill, D. C., & Shafii, B. (2002). Competition between wild oat (*Avena fatua*) and yellow mustard (*Sinapis alba*) or canola (*Brassica napus*). *Weed Science*, *50*(5), 587-594. [https://doi.org/10.1614/0043-1745\(2002\)050\[0587:CBWOAF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1614/0043-1745(2002)050[0587:CBWOAF]2.0.CO;2)

- de Kroon, H., Hendriks, M., van Ruijven, J., Ravenek, J., Padilla, F. M., Jongejans, E., Visser, E. J. W., & Mommer, L. (2012). Root responses to nutrients and soil biota : Drivers of species coexistence and ecosystem productivity. *Journal of Ecology*, *100*(1), 6-15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2011.01906.x>
- Desjardins, D., Brereton, N. J. B., Marchand, L., Brisson, J., Pitre, F. E., & Labrecque, M. (2018). Complementarity of three distinctive phytoremediation crops for multiple-trace element contaminated soil. *Science of the Total Environment*, *610*, 1428-1438. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.196>
- Desjardins, D., Pitre, F. E., Guidi Nissim, W., & Labrecque, M. (2016). Differential uptake of silver, copper and zinc suggests complementary species-specific phytoextraction potential. *International Journal of Phytoremediation*, *18*(6), 598-604. <https://doi.org/10.1080/15226514.2015.1086296>
- Dietz, K. J., Tavakoli, N., Kluge, C., Mimura, T., Sharma, S. S., Harris, G. C., Chardonens, A. N., & Gollmack, D. (2001). Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *Journal of Experimental Botany*, *52*(363), 1969-1980. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.363.1969>
- Ebbs, S., & Kochian, L. (1997). Toxicity of zinc and copper to Brassica species : Implications for phytoremediation. *Journal of Environmental Quality*, *26*(3), 776-781. <https://doi.org/10.2134/jeq1997.00472425002600030026x>
- Evlard, A., Sergeant, K., Printz, B., Guignard, C., Renaut, J., Campanella, B., Paul, R., & Hausman, J.-F. (2014). A multiple-level study of metal tolerance in *Salix fragilis* and *Salix aurita* clones. *Journal of Proteomics*, *101*, 113-129. <https://doi.org/10.1016/j.jprote.2014.02.007>
- Feigl, G., Kumar, D., Lehotai, N., Tugyi, N., Molnár, Á., Ördög, A., Szepesi, Á., Gémes, K., Laskay, G., Erdei, L., & Kolbert, Z. (2013). Physiological and morphological responses of the root system of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.) and rapeseed (*Brassica napus* L.) to copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *94*, 179-189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.04.029>
- Food and Agricultural Organization of the United Nations. (2019). *FAOSTAT- Crops*. FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- Freckleton, R. P., & Watkinson, A. R. (2001). Asymmetric competition between plant species. *Functional Ecology*, *15*, 615-623.
- Gallagher, F. J., Pechmann, I., Bogden, J. D., Grabosky, J., & Weis, P. (2008). Soil metal concentrations and vegetative assemblage structure in an urban brownfield. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, *153*(2), 351-361. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.08.011>
- Gangwar, S., Singh, Dr. V., Tripathi, D., Chauhan, D., Prasad, S., & Maurya, J. (2014). Plant Responses to Metal Stress : Emerging Role of Plant Growth Hormones (Auxins, Gibberellins and Cytokinins) in toxicity alleviation. Dans P. Ahmad & S. Rasool (Éds.), *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance- A sustainable approach* (Vol. 2, p. 215-248). Elsevier Inc.

- Geisler, M., Axelsen, K. B., Harper, J. F., & Palmgren, M. G. (2000). Molecular aspects of higher plant P-type Ca(2+)-ATPases. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1465(1-2), 52-78. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(00\)00131-0](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(00)00131-0)
- Ghori, Z., Iftikhar, H., Bhatti, M. F., Nasar-um-Minullah, Sharma, I., Kazi, A. G., & Ahmad, P. (2016). Chapter 15—Phytoextraction : The Use of Plants to Remove Heavy Metals from Soil. Dans P. B. T.-P. M. I. Ahmad (Éd.), *Plant Metal Interaction* (p. 385–409). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803158-2.00015-1>
- Giagnoni, L., dos Anjos Borges, L. G., Giongo, A., Silveira, A. de O., Ardisson, A. N., Triplett, E. W., Mench, M., & Renella, G. (2020). Dolomite and Compost Amendments Enhance Cu Phytostabilization and Increase Microbiota of the Leachates from a Cu-Contaminated Soil. *Agronomy-Basel*, 10(5), 719. <https://doi.org/10.3390/agronomy10050719>
- Gisbert, C., Clemente, R., Navarro-Aviñó, J., Baixauli, C., Ginér, A., Serrano, R., Walker, D. J., & Bernal, M. P. (2006). Tolerance and accumulation of heavy metals by Brassicaceae species grown in contaminated soils from Mediterranean regions of Spain. *Environmental and Experimental Botany*, 56(1), 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.12.002>
- Grenier, V., Pitre, F. E., Nissim, W. G., & Labrecque, M. (2015). Genotypic differences explain most of the response of willow cultivars to petroleum-contaminated soil. *Trees*, 29(3), 871-881. <https://doi.org/10.1007/s00468-015-1168-5>
- Gupta, D. K., Huang, H. G., & Corpas, F. J. (2013). Lead tolerance in plants : Strategies for phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(4), 2150–2161. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1485-4>
- Haines, B. J. (2002). Zincophilic root foraging in *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, 155(3), 363-372.
- Hall, J. L., & Williams, L. E. (2003). Transition metal transporters in plants. *Journal of Experimental Botany*, 54(393), 2601-2613. JSTOR.
- Haydon, M. J., & Cobbett, C. S. (2007). Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *The New Phytologist*, 174(3), 499-506. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02051.x>
- Hébert, J., & Bernard, J. (2013). *Bilan sur la gestion des terrains contaminés au 31 décembre 2010*.
- Hernández-Allica, J., Becerril, J. M., & Garbisu, C. (2008). Assessment of the phytoextraction potential of high biomass crop plants. *Environmental Pollution*, 152(1), 32–40. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2007.06.002>
- Herrero, E. M., López-González, A., Ruiz, M. A., Lucas-García, J. A., & Barbas, C. (2003). Uptake and distribution of zinc, cadmium, lead and copper in *Brassica napus* var. *Oleifera* and *Helianthus annuus* grown in contaminated soils. *International Journal of Phytoremediation*, 5(2), 153-167. <https://doi.org/10.1080/713610177>
- Hodge, A. (2004). The plastic plant : Root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist*, 162(1), 9-24. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01015.x>

- Kacalkova, L., Tlustos, P., & Szakova, J. (2015). Phytoextraction of Risk Elements by Willow and Poplar Trees. *International Journal of Phytoremediation*, 17(5), 414-421. <https://doi.org/10.1080/15226514.2014.910171>
- Kampfenkel, K., Kushnir, S., Babiyshuk, E., Inzé, D., & Van Montagu, M. (1995). Molecular characterization of a putative Arabidopsis thaliana copper transporter and its yeast homologue. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(47), 28479-28486. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.47.28479>
- Kidd, P., Barceló, J., Bernal, M. P., Navari-Izzo, F., Poschenrieder, C., Shilev, S., Clemente, R., & Monterroso, C. (2009). Trace element behaviour at the root–soil interface : Implications in phytoremediation. *Environmental and Experimental Botany*, 67(1), 243-259. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.06.013>
- Kuzovkina, Y. A., & Volk, T. A. (2009). The characterization of willow (Salix L.) varieties for use in ecological engineering applications : Co-ordination of structure, function and autecology. *Ecological Engineering*, 35(8), 1178-1189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2009.03.010>
- Labrecque, M., Hu, Y., Vincent, G., & Shang, K. (2020). The use of willow microcuttings for phytoremediation in a copper, zinc and lead contaminated field trial in Shanghai, China. *International Journal of Phytoremediation*, 1-7. <https://doi.org/10.1080/15226514.2020.1773758>
- Laidlaw, W. S., Arndt, S. K., Huynh, T. T., Gregory, D., & Baker, A. J. M. (2012). Phytoextraction of heavy metals by willows growing in biosolids under field conditions. *Journal of Environmental Quality*, 41(1), 134–143.
- Lavallée, S. (2006). *Les terrains contaminés au Québec : Quels sont les risques pour les prêteurs?* Centre interuniversitaire de recherche en analyse des organisations.
- Li, L., Tilman, D., Lambers, H., & Zhang, F.-S. (2014). Plant diversity and overyielding : Insights from belowground facilitation of intercropping in agriculture. *New Phytologist*, 203(1), 63-69. <https://doi.org/10.1111/nph.12778>
- Ljubljana, S. (2019). *Grand catalogue agricole*. https://www.semenarna.com/f/docs/Catalogues_1_1/Katalog-Semenarna-Ljubljana-FRA.pdf
- Lock, K., & Janssen, C. R. (2001). Ecotoxicity of Zinc in Spiked Artificial Soils versus Contaminated Field Soils. *Environmental Science & Technology*, 35(21), 4295–4300. <https://doi.org/10.1021/es0100219>
- Loreau, M., & Hector, A. (2001). Partitioning selection and complementarity in biodiversity experiments. *Nature*, 412(6842), 72-76. <https://doi.org/10.1038/35083573>
- Manara, A. (2012). Plant Responses to Heavy Metal Toxicity. Dans A. Furini (Éd.), *Plants and Heavy Metals* (p. 27-53). Springer Briefs in Biometals. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-4441-7>
- Marchiol, L., Assolari, S., Sacco, P., & Zerbi, G. (2004). Phytoextraction of heavy metals by canola (Brassica napus) and radish (Raphanus sativus) grown on multicontaminated soil. *Environmental Pollution*, 132(1), 21-27. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.04.001>

- Mercier, C. (2016). *Phytoextraction d'éléments traces à l'aide du saule et de mycorhizes*. Université de Montréal.
- Michalet, R., Brooker, R. W., Cavieres, L. A., Kikvidze, Z., Lortie, C. J., Pugnaire, F. I., Valiente-Banuet, A., & Callaway, R. M. (2006). Do biotic interactions shape both sides of the humped-back model of species richness in plant communities? *Ecology Letters*, *9*(7), 767-773. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00935.x>
- Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et des Affaires rurales de l'Ontario. (2016). *Comparaison des valeurs nutritives d'aliments pour ruminants* [Gouvernemental]. <http://www.omafra.gov.on.ca/french/livestock/dairy/facts/03-006.htm#1>
- Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et des Affaires rurales de l'Ontario. (2017). *Guide agronomique des grandes cultures—Publication 811F*. Imprimeur de la Reine pour l'Ontario. <http://www.omafra.gov.on.ca/french/crops/pub811/pub811.pdf>
- Ministère de l'environnement et de la lutte contre les changements climatiques du Québec. (2020). *Protection des sols et réhabilitation des terrains contaminés—Loi et règlements* [Gouvernemental]. <http://www.environnement.gouv.qc.ca/sol/terrains/loi-reg.htm>
- Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques. (2017). *Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés—Plan d'action 2017-2021*. <http://www.environnement.gouv.qc.ca/sol/terrains/politique/politique.pdf>
- Mommer, L., Ruijven, J. V., Caluwe, H. D., Smit-Tiekstra, A. E., Wagemaker, C. A. M., Ouborg, N. J., Bögemann, G. M., Weerden, G. M. V. D., Berendse, F., & Kroon, H. D. (2010). Unveiling below-ground species abundance in a biodiversity experiment : A test of vertical niche differentiation among grassland species. *Journal of Ecology*, *98*(5), 1117-1127. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2010.01702.x>
- Mosseler, A., Major, J. E., & Labrecque, M. (2014). Growth and survival of seven native willow species on highly disturbed coal mine sites in eastern Canada. *Canadian Journal of Forest Research*, *44*(4), 340-349. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2013-0447>
- Mourato, M. P., Moreira, I. N., Leitão, I., Pinto, F. R., Sales, J. R., & Martins, L. L. (2015). Effect of Heavy Metals in Plants of the Genus Brassica. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(8), 17975–17998. <https://doi.org/10.3390/ijms160817975>
- Muklada, H., Klein, J., Glasser, T., Dvash, L., Azaizeh, H., Halabi, N., Davidovich-Rikanati, R., Lewinsohn, E., & Serge Yan, L. (2017). Initial evaluation of willow (*Salix acmophylla*) irrigated with treated wastewater as a fodder crop for dairy goats. *Small Ruminant Research*. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.10.013>
- Munger, H. (2014). *Travail réduit du sol et système sans intrants chimiques : Impact sur le rendement, la fusariose de l'épi et la cécidomyie orangée chez le blé panifiable* [Mémoire]. Université de Laval.

- Naderi, R., & Ghadiri, H. (2011). Competition of Wild Mustard (*Sinapis arvensis* L.) Densities with Rapeseed (*Brassica napus* L.) under Different Levels of Nitrogen Fertilizer. *Journal of Agricultural Science and Technology*, *13*(1), 45-51.
- Nevo, Y., & Nelson, N. (2006). The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochimica and Biophysica Acta*, *1763*(7), 609-620. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.05.007>
- Nguyen, T. X. T., Amyot, M., & Labrecque, M. (2017). Differential effects of plant root systems on nickel, copper and silver bioavailability in contaminated soil. *Chemosphere*, *168*, 131-138. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.047>
- Northcott, G. L., & Jones, K. C. (2000). Spiking hydrophobic organic compounds into soil and sediment : A review and critique of adopted procedures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *19*(10), 2418–2430. <https://doi.org/10.1002/etc.5620191005>
- Padmavathiamma, P. K., & Li, L. Y. (2007). Phytoremediation Technology : Hyper-accumulation Metals in Plants. *Water, Air, and Soil Pollution*, *184*(1), 105–126. <https://doi.org/10.1007/s11270-007-9401-5>
- Park, J., Kim, J.-Y., & Kim, K.-W. (2012). Phytoremediation of soil contaminated with heavy metals using *Brassica napus*. *Geosystem Engineering*, *15*(1), 10-18. <https://doi.org/10.1080/12269328.2012.674428>
- Parrotta, L., Guerriero, G., Sergeant, K., Cai, G., & Hausman, J.-F. (2015). Target or barrier? The cell wall of early- and later-diverging plants vs cadmium toxicity: differences in the response mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, *6*(133), 1-16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00133>
- Peñarrubia, L., Andrés-Colás, N., Moreno, J., & Puig, S. (2010). Regulation of copper transport in *Arabidopsis thaliana* : A biochemical oscillator? *Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: A Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, *15*(1), 29-36. <https://doi.org/10.1007/s00775-009-0591-8>
- Pilon-Smits, E. (2005). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, *56*(1), 15-39. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214>
- Pulford, I. D., & Watson, C. (2003). Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees—A review. *Environment International*, *29*(4), 529-540. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00152-6](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00152-6)
- Purakayastha, T. J., Viswanath, T., Bhadraray, S., Chhonkar, P. K., Adhikari, P. P., & Suribabu, K. (2008). Phytoextraction of Zinc, Copper, Nickel and Lead from a Contaminated Soil by Different Species of *Brassica*. *International Journal of Phytoremediation*, *10*(1), 61-72. <https://doi.org/10.1080/15226510701827077>
- Rafati, M., Khorasani, N., Moattar, F., Shirvany, A., Moraghebi, F., & Hosseinzadeh, S. (2011). Phytoremediation potential of *Populus alba* and *Morus alba* for cadmium, chromium and nickel absorption from polluted soil. *International Journal of Environmental Research*, *5*(4), 961–970.

- Reichman, S. (2002). The Responses of Plants to Metal Toxicity : A review focusing on Copper, Manganese and Zinc. Dans *Australian Minerals & Energy Environment foundation* (Vol. 7).
- Robinson, B. H., Anderson, C. W. N., & Dickinson, N. M. (2015). Phytoextraction : Where's the action? *Journal of Geochemical Exploration*, 151, 34–40. <https://doi.org/10.1016/J.GEXPLO.2015.01.001>
- Salt, D. E., Prince, R. C., Baker, A. J. M., Raskin, I., & Pickering, I. J. (1999). Zinc Ligands in the Metal Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* As Determined Using X-ray Absorption Spectroscopy. *Environmental Science & Technology*, 33(5), 713-717. <https://doi.org/10.1021/es980825x>
- Sancenón, V., Puig, S., Mira, H., Thiele, D. J., & Peñarrubia, L. (2003). Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 51(4), 577-587. <https://doi.org/10.1023/A:1022345507112>
- Santé Canada. (2019, juillet 19). *Parlons d'eau—Le cuivre dans l'eau potable* [Lignes directrices]. aem. <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/publications/vie-saine/cuivre-parlons-eau.html>
- Sarwar, N., Imran, M., Shaheen, M. R., Ishaque, W., Kamran, M. A., Matloob, A., Rehman, A., & Hussain, S. (2017). Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals : Modifications and future perspectives. *Chemosphere*, 171, 710–721. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2016.12.116>
- Schuler, M., & Bauer, P. (2011). Heavy Metals Need Assistance : The Contribution of Nicotianamine to Metal Circulation Throughout the Plant and the Arabidopsis NAS Gene Family. *Frontiers in plant science*, 2(69), 1-5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00069>
- Sheoran, V., Sheoran, A. S., & Poonia, P. (2009). Phytomining : A review. *Minerals Engineering*, 22(12), 1007-1019. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2009.04.001>
- Sheoran, V., Sheoran, A. S., & Poonia, P. (2011). Role of Hyperaccumulators in Phytoextraction of Metals From Contaminated Mining Sites : A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 41(2), 168-214. <https://doi.org/10.1080/10643380902718418>
- Singh, S. (2010). Copper tolerance and response of antioxidative enzymes in axenically grown Brassica juncea (L.) plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 7.
- Smith, R. G., Gross, K. L., & Robertson, G. P. (2008). Effects of Crop Diversity on Agroecosystem Function : Crop Yield Response. *Ecosystems*, 11(3), 355-366. <https://doi.org/10.1007/s10021-008-9124-5>
- Sousa, C. D. (2001). Contaminated sites : The Canadian situation in an international context. *Journal of Environmental Management*, 62(2), 131–154. <https://doi.org/10.1006/jema.2001.0431>
- Tebbens, J., & Statistics Canada. (2005). *Aliments fonctionnels et nutraceutiques : Création d'aliments à valeur ajoutée par les entreprises canadiennes*. Division des Sciences, de l'innovation et de l'information électronique, Statistique Canada. <http://site.ebrary.com/id/10089276>

- Tognacchini, A., Salinitro, M., Puschenreiter, M., & van der Ent, A. (2020). Root foraging and avoidance in hyperaccumulator and excluder plants : A rhizotron experiment. *Plant and Soil*, *450*(1-2), 287-302. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04488-2>
- Trakal, L., Martínez-Fernández, D., Vítková, M., & Komárek, M. (2015). Phytoextraction of metals : Modeling root metal uptake and associated processes. Dans A. A. Ansari, S. S. Gill, G. R. Lanza, & L. Newman (Éds.), *Phytoremediation* (p. 69-83). Springer International Publishing.
- Treasury Board Secretariat of Canada. (2019). *Inventaire des sites contaminés fédéraux*. <https://www.tbs-sct.gc.ca/fcsi-rscf/home-accueil-fra.aspx>
- Tremel-Schaub, A., & Feix, I. (2005). *Contamination des sols : Transferts des sols vers les plantes*. EDP Sciences.
- Wang, J., Ge, Y., Chen, T., Bai, Y., Qian, B. Y., & Zhang, C. B. (2014). Facilitation Drives the Positive Effects of Plant Richness on Trace Metal Removal in a Biodiversity Experiment. *PLOS ONE*, *9*(4), e93733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093733>
- Weiner, J. (1990). Asymmetric Competition in Plant-Populations. *Trends in Ecology & Evolution*, *5*(11), 360-364. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(90\)90095-U](https://doi.org/10.1016/0169-5347(90)90095-U)
- Wilson, B., Braithwaite, A., & Brian Pyatt, F. (2005). An evaluation of procedures for the digestion of soils and vegetation from areas with metalliferous pollution. *Toxicological & Environmental Chemistry*, *87*(3), 335–344.
- Yruela, I. (2005). Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *17*(1), 145-156. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100012>
- Yruela, I. (2009). Copper in plants : Acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology*, *36*(5), 409-430. <https://doi.org/10.1071/FP08288>
- Zhang, C., Postma, J. A., York, L. M., & Lynch, J. P. (2014). Root foraging elicits niche complementarity-dependent yield advantage in the ancient « three sisters » (maize/bean/squash) polyculture. *Annals of Botany*, *114*(8), 1719-1733. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu191>
- Zoghalmi, S., Bergeron, M., Moore, H., Labrie, G., Pageau, D., Robert, L., Tardif, É., & Tremblay, G. (2013). *Guide de production du Canola*. <https://www.agrireseau.net/grandescultures/documents/Guide%20de%20production%20du%20Canola-FPCCQ-2013.pdf>

Annexe I – Plant establishment and health

There were no significant differences in willow height and growing pattern between monoculture and polyculture. In both cases, the growth was initially slower in contaminated soils versus control (Figure IIa and IIb) but there were no more significant differences between the three soil conditions starting mid-July. Furthermore, the contamination of the soil and the culture regime had no impact on the photosynthesis rate, conductance and transpiration rate of the willows.

B. napus growth was significantly affected by both “contamination” and “culture regime”. Plants growing in C2 were significantly taller than C0 (p-value <0.5; Fig. IIc-d; Fig. I) and rapeseed growing alone was also significantly taller than in polyculture (p-value <0.05; Fig IIc-d). The contamination of the soil and the culture regime had no impact on the conductance and transpiration rate of the rapeseed. However, the polyculture rapeseed had a tendency to have a lower photosynthetic rate than the monoculture (p-value<0.05 for C0 and C1, p-value=0.67 for C2).



Figure I. Picture of *B. napus* taken on August 28th. The plants in C2 are significantly taller than those growing in control conditions ($p \leq 0.05$).

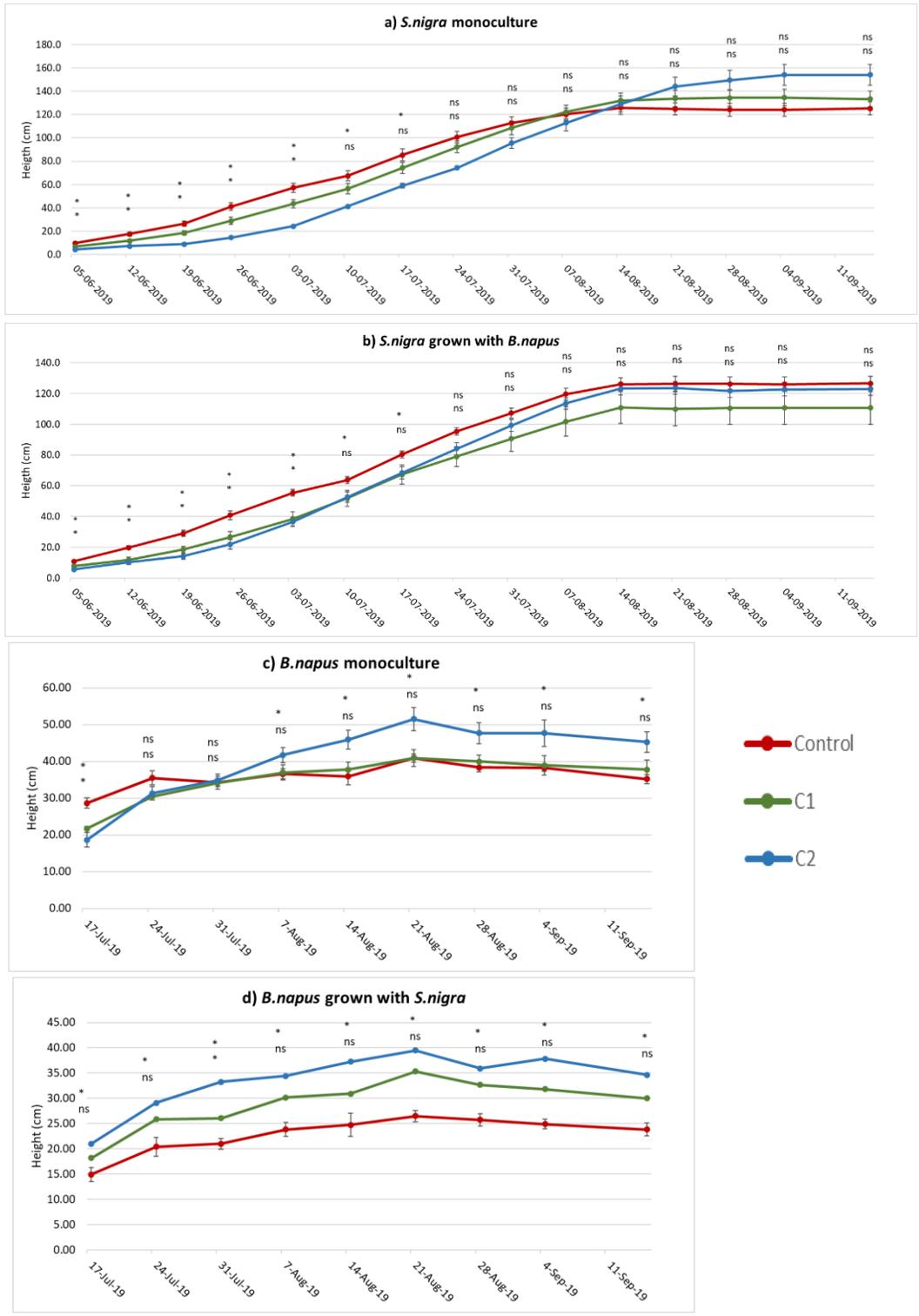


Figure II. Weekly plant growth curves. The curves indicate the average height of the plants per soil condition \pm standard error (SE). The asterisk * indicates a significant difference between the contaminated soil and the control ($p \leq 0.05$) for every week using a two way ANOVA and a Tukey test where the top row indicates C2 vs C0 and bottom row, C1 to C0.

Annexe II – Data tables

Table I. Average biomass produced per m² following the different plant treatments for the three soil conditions (Control, C1 and C2) 12 and 17 weeks after planting the rapeseed and willow, respectively. This considers the pots in which there were no growth to have a biomass of 0g.

Plant treatment	Soil condition	Aerial biomass			Root biomass		
		DW (g)	SD		DW (g)	SD	
<i>B. napus</i>	Control	584.13	50.71		167.84	25.80	
	C1	735.27	202.36	ns	143.37	5.82	ns
	C2	727.02	120.85		155.96	27.78	
<i>S. nigra</i>	Control	500.67	29.47	a	535.58	105.67	a
	C1	593.58	102.05	a	483.89	59.70	a
	C2	170.07	196.94	b	123.46	142.67	b
Mix (S+B)	Control	704.52	71.29		501.73	69.70	
	C1	776.88	145.65	ns	395.00	90.02	ns
	C2	645.56	90.26		435.51	109.00	
Mix B.	Control	277.31	81.68				
	C1	466.92	142.57	ns		NA	
	C2	311.92	114.01				
Mix S.	Control	427.21	96.48				
	C1	309.96	186.78	ns		NA	
	C2	250.23	190.85				

Note : The different letters indicate differences between the soil conditions for each plant treatment ($p \leq 0.05$) as analysed by linear mixed-model ANOVA and Tukey HSD test ($p \leq 0.05$). C1: 500mg/kg C2 : 800 mg/kg. SD : standard deviation. n=4

Table II. Mean copper concentration in plant biomass for the three soil conditions (Control, C1 and C2) at the end of the experiment.

Plant treatment	Soil condition	Aerial [Cu]			Root [Cu]		
		mg/kg DW	SD		mg/kg DW	SD	
<i>B. napus</i>	Control	3.63	0.10	a	38.3	20.97	a
	C1	12.97	2.14	b	142.92	30.54	b
	C2	16.79	2.33	c	177.39	51.21	b
<i>S. nigra</i>	Control	4.43	0.18	a	17.03	7.87	a
	C1	9.16	0.46	b	96.62	31.15	b
	C2	12.48	0.30	b	111.4	12.78	b
Mix (S+B)	Control	3.59	0.60	a	14.92	4.91	a
	C1	12.04	2.25	b	113.68	26.80	b
	C2	12.62	2.81	b	108.48	19.47	b
Mix B.	Control	3.61	0.71	a	NA		
	C1	14.6	1.45	b			
	C2	17.58	4.20	b			
Mix S.	Control	3.56	0.58	a	NA		
	C1	7.92	0.81	b			
	C2	8.00	0.26	b			

Note : The different letters indicate differences between the soil conditions for each plant treatment as analysed by linear mixed-model ANOVA, with 2 fixed factors (contamination levels, species) and random blocks and Tukey HSD test ($p \leq 0.05$). C1: 500mg/kg C2 : 800 mg/kg. SD : standard deviation.

Table III. Mean copper content in plant biomass following the different plant treatments for the three soil conditions (Control, C1 and C2) at the end of the experiment.

Plant treatment	Soil condition	Aerial Cu uptake			Root Cu uptake			Total Cu uptake		
		g/ha	SD		g/ha	SD		g/ha	SD	
<i>B. napus</i>	Control	21.22	2.33	a	66.78	41.71	a	88	42.70	a
	C1	100.86	44.34	b	204.47	41.32	ab	305.33	21.82	b
	C2	122.48	30.55	b	285.97	125.34	b	408,46	100.16	b
<i>S. nigra</i>	Control	22.16	1.21	a	87.18	32.19	a	109.34	31.97	a
	C1	54.1	7.44	a	467.56	169.84	b	521.66	172.63	b
	C2	21.21	24.52	a	137.84	161.04	a	159.05	185.45	a
Mix (S+B)	Control	25.08	2.89	a	73.17	17.00	a	98.25	16.28	a
	C1	93.08	21.29	b	443.41	123.95	b	536.49	140.31	b
	C2	80	8.92	b	463.63	81.34	b	543.63	75.70	b
Mix B.	Control	9.88	3.14	a	NA		NA	NA		
	C1	69.19	26.29	b						
	C2	53.49	17.10	b						
Mix S.	Control	15.2	4.51	a	NA		NA	NA		
	C1	23.89	13.78	a						
	C2	19.89	14.86	a						

Note : The Cu uptake per hectare was calculated by considering the biomass produced according to the surface of the containers ($0,26 \text{ m}^2$) transposed to the hectare. The different letters indicate differences between the soil conditions for each plant treatment as analysed by linear-mixed model ANOVA and Tukey HSD test ($p \leq 0.05$). C1: 500mg/kg C2 : 800 mg/kg. SD : standard deviation. n=4

Annexe III – Normes environnementales québécoises appliquées au sol

Tableau I. Critères génériques des sols. Guide d'intervention de protection des sols et réhabilitation des terrains contaminés, annexe 2 : Grille des critères génériques pour les sols (Beaulieu et al., 2016).

ET	Critères de sols (mg/kg matière sèche, ppm)		
	A	B	C
Cuivre	50	100	500

Tableau II. Description des critères du guide d'intervention

<p>Critère A Teneur de fond pour les métaux et métalloïdes retrouvé naturellement dans les sols non contaminés pour la province géologique des basses-terres du Saint-Laurent. Représente la limite de détection recommandées pour l'analyse des substances organiques en laboratoire la limite de du fait qu'on ne retrouve pas naturellement de composés organiques dans les sols.</p>
<p>Critère B (valeurs limites de l'annexe I du RPRT) Limite maximale acceptable pour des terrains résidentiels ou des terrains où se déroulent certains usages récréatifs et institutionnels.</p>
<p>Critère C (valeurs limites de l'annexe II du RPRT) Limite maximale acceptable pour des terrains à vocation industrielle, commerciale, institutionnelle non sensible et récréative (aménagement de parc mais pas d'aires de jeu).</p>

Note : La grille de gestion des sols excavés ne s'applique, pour les critères supérieurs à A, que pour une contamination de nature anthropique. Si la concentration naturelle dans le sol est supérieure à A, la gestion des sols contenant cette concentration naturelle est considérée comme équivalente à celle attribuable au critère A

Annexe IV – Photos supplémentaires



Figure I. Développement racinaire des saules en monoculture en (A) C1 et (B) C2. Plus de racine fine en C1. Il faut prendre en compte que le saule en C2 était seul dans son bac due au faible taux de survie. Mesure en cm Photo prise le 17 sept. 2019.



Figure II. Développement racinaire des saules. A) Effet tapisage dans le fond des bacs des saules témoins. B) Bac polyculture témoin, entremelange des systèmes racinaires. Photo prises le 16 sept. 2019