

# Phytoextraction du cadmium et du zinc de sols urbains : optimisation de la culture de *Noccaea caerulescens*



Thèse de doctorat présentée en vue de l'obtention du grade  
de Docteur en Sciences agronomiques et Ingénierie biologique

Arnaud Jacobs

Promoteurs : Prof. Nausicaa Noret et Prof. Thomas Drouet

Laboratoire d'Ecologie végétale et Biogéochimie





FACULTÉ  
DES SCIENCES



UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES

# Phytoextraction du cadmium et du zinc de sols urbains : optimisation de la culture de *Noccaea caerulescens*

**Thèse présentée par Arnaud JACOBS**

en vue de l'obtention du grade académique de Docteur en Sciences  
agronomiques et Ingénierie biologique

Année académique 2018-2019

**Soutenue publiquement le 8 novembre 2018**

Sous la direction de la Professeure Nausicaa NORET,

et du Professeur Thomas DROUET,

Laboratoire d'Ecologie végétale et Biogéochimie

## **Jury de thèse :**

Pierre MEERTS (Université libre de Bruxelles, Président)

Marjolein VISSER (Université libre de Bruxelles, Secrétaire)

Valérie BERT (Institut national de l'environnement industriel  
et des risques, INERIS)

Catherine SIRGUEY (Université de Lorraine, ENSAIA)

Thibault STERCKEMAN (INRA, Université de Lorraine)





Cette thèse a été soutenue financièrement par le Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (FRIA, F.R.S.-FNRS, Belgique).

Certaines expériences de ce travail ont bénéficié d'une collaboration avec le Centre d'écologie urbaine (Urban Ecology) et ont reçu le soutien financier du Ministère bruxellois de l'Environnement et de son administration Bruxelles Environnement.

La participation à la conférence internationale ICOBTE 2017 a été permise grâce au soutien financier du réseau international GDRI CNRS, LOCOMET (Transport, localization and complexation of metals in hyperaccumulating plants).





---

# Remerciements

---

Au moment de mettre un point final à cette riche expérience de thèse, j'aimerais faire honneur à toutes les personnes qui m'ont accompagné de près ou de loin dans cette aventure.

Le portrait de famille commence bien sûr par mes deux co-promoteurs. Ensemble, vous avez apporté l'équilibre de ce travail, mais surtout une présence et une écoute inestimables. Nausicaa, ta grande disponibilité, ton soutien et ta passion sans limites et sans frontières pour notre chère *Thlaspi* ont été extrêmement précieux...sans parler des nombreux suppléments gâteaux, couques et vitamines. Les sessions d'ICP du mercredi avec Amandine, nos excursions potagères mémorables près du canal et nos discussions familiales ont été tant de moments qui ont forgé des liens qui dureront au-delà de la thèse. Thomas, tu as apporté l'expertise analytique, statistique et pédologique à ma formation et à ce travail, ainsi qu'une bonne dose de sacrifice physique pelle ou tarière à la main. Ta sérénité et ton optimisme à toutes épreuves ont été des moteurs importants dans les moments plus difficiles. Et on aura bien ri autour de multiples théories du complot et collages douteux. Je m'estime réellement chanceux d'avoir pu établir une telle relation de confiance avec vous.

Pierre, avant d'être un directeur de labo prévenant, un lecteur curieux et enthousiaste de ce travail et un amateur contagieux de desserts, tu as d'abord été un professeur très marquant, ce qui a été décisif dans mes choix. Je voudrais sincèrement te remercier pour tout cela.

Je voudrais ensuite te remercier Thibault, pour avoir accepté d'être dans mon jury, mais surtout pour les discussions très enrichissantes lors de tes venues à Bruxelles. Ta gentillesse, ta rigueur scientifique et ton intérêt pour mon travail m'ont beaucoup apporté.

Marjolein, Catherine et Valérie, un grand merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et pour l'intérêt que vous avez porté pour ce travail.

David, fidèle compagnon depuis mes premiers balbutiements de chercheur au Congo, tu as été le moteur de tant de nouvelles idées, aventures et projets. Ton esprit d'analyse et ton sens critique ont apporté énormément à ma vision des statistiques et de la recherche. Et puis surtout, un plaisir renouvelé chaque jour d'aller au labo. Ah, la thèse de doctorat, en tout cas, ce ne fut pas de la tarte mais ce fut certainement de la rigolade en ta présence.

Guillaume, ingénieur, vraiment, tout s'opposait à ce que l'on soit voisins de bureaux et pourtant on s'en est sortis quasiment indemnes voire même grandis. J'aurai même appris à tes côtés, bon c'était plus sur les hépatiques à feuilles, les rôniers, les arbres à saucisses et la techno minimaliste, mais ça reste plus sympa que les analyses phylogénétiques de traits. Je ne rivaliserai jamais avec ta maîtrise du selfie vaseux (ou non), mais je compte bien continuer à t'emmerder avec amour.

Je remercie aussi de tout cœur mes comparses de bureau avec qui j'ai partagé un bout de chemin, Monique pour ton rire et tes bières qui donnent le sourire, Bastien pour les trop rares Chouffes et tes messages à chaque article publié, Roxane pour les choucroutes vegan et autres décalages délicieux et cocasses, Sophie pour ton enthousiasme à (quasiment) toutes épreuves et le soin que tu as pris à faire de nous une petite famille.

Alex, un tout grand merci pour ton aide tout au long de mon passage au labo. Je pense t'avoir bien gâté en échantillons divers et ce travail serait bien peu de choses sans toi. Heureusement, ensemble, les tâches fastidieuses étaient bien plus joyeuses. Kristel, grâce à moi tu as pu t'occuper de tant de petits *Thlaspi* que tu aimes tant et, grâce à toi, j'ai pu accomplir de nombreux essais de terrain et surtout passer des moments de lavage délicieux.

Barbara et Sarah, tour à tour, vous avez été un soutien administratif précieux, en plus d'être pourvoyeuses de Trouffettes et douceurs, importantes pour le moral du doctorant.

J'ai eu la chance aussi de recevoir l'aide de nombreux·ses étudiant·e·s et d'en encadrer certain·e·s pour leur stage et leur mémoire. Léonard, Alvaro, Léna, Mathilde R. et Mathilde C. les rennaises, Dirfy l'hellène, merci pour votre aide et les bons moments passés. Loïc, ton passage au labo a été riche scientifiquement, mais a surtout été le début d'une belle amitié et un tremplin vers le sol et sa matière organique.

Vous avez été nombreux·ses parmi mes ami·e·s et ma famille pendant ces quatre années à prendre des nouvelles des petites salades bruxelloises, des potagers, du tabouret calaminaire, des plantes grasses, voire même des *Noccaea* pour les plus latinistes d'entre vous et même si je ne savais pas toujours quoi vous répondre, ces attentions m'ont très certainement aidé à arriver au bout de l'épreuve. Merci! Wacky et Lisou, compagnons du midi PhD, merci pour ces moments riches en frites et en décompression. On est arrivé au bout ! Harold, je te remercie aussi spécialement pour ton amitié, ton empathie et tes nombreux encouragements. Jean et Berthe la plante verte, le duo de choc, merci du fond du cœur pour votre soutien et votre présence ces derniers mois. C'est plus facile de terminer une thèse avec le soleil !

Enfin, au bout d'une thèse, c'est un peu la tradition de remercier ses parents. Et c'est vrai qu'en vous voyant « accoucher » d'un troisième docteur, je suis assez fier de vous et surtout reconnaissant que vous nous ayiez transmis cette envie de bien faire et cette curiosité. Vous avez sans doute parfois eu un peu du mal à comprendre les lubies végétales du fiston mais vous m'avez toujours accompagné avec bienveillance. Merci mes chers petits parents !



---

# Résumé

---

La problématique de la contamination des sols urbains et agricoles par les éléments traces métalliques (ETM) est un enjeu majeur en termes de santé publique et de protection de l'environnement. Dans le contexte de l'expansion de l'agriculture urbaine et des jardins communautaires souvent localisés sur des sites contaminés, il existe un intérêt fort pour le développement de méthodes de décontamination moins coûteuses que les méthodes de remédiation conventionnelles et qui préservent l'intégrité et la fertilité du sol. La phytoextraction est une technique écologique de remédiation des sols contaminés en ETM qui repose sur l'utilisation de plantes accumulatrices de métaux pour diminuer les concentrations en ETM dans le sol. La crucifère européenne *Noccaea caerulescens* (tabouret calaminaire), hyperaccumulatrice de zinc (Zn), cadmium (Cd) et nickel (Ni), s'est imposée comme plante phytoextractrice modèle vu ses étonnantes capacités d'accumulation *in natura*. Cependant, les conditions de culture optimales de *N. caerulescens* sont largement méconnues.

L'optimisation de la phytoextraction du Cd et du Zn avec *N. caerulescens* a donc constitué l'objectif principal de ce travail. Nous avons mené des essais de terrain à Bruxelles sur des sites dont les sols sont modérément contaminés en ETM. Le premier objectif était de comparer l'efficacité d'extraction des populations calaminaires du Sud de la France (CAL-SF) et des populations non-métallicoles luxembourgeoises (NMET) de *N. caerulescens*. En parallèle, un deuxième objectif était de tester l'effet de plusieurs pratiques de culture sur la croissance et l'accumulation afin de développer un itinéraire technique performant. Un dernier objectif était d'étudier l'influence des paramètres édaphiques sur l'efficacité de la phytoextraction.

Nous avons mis en évidence pour la première fois sur le terrain que les populations NMET sont nettement plus efficaces pour l'extraction du Zn que les populations CAL-SF et qu'elles combinent à la fois une meilleure production de biomasse et une plus grande résistance aux herbivores et aux pathogènes. Ce travail de thèse souligne que le cycle de vie – annuel ou bisannuel – est un déterminant important de la vitesse de croissance, du rendement d'extraction et du cycle de culture à privilégier. Nos résultats montrent que l'itinéraire technique le plus performant est celui d'un repiquage à l'automne de plantules à cycle bisannuel à densité élevée (100-120 plantes m<sup>-2</sup>), suivi d'une longue saison de culture (12 mois), tandis que pour des plantes annuelles il faut favoriser une installation au printemps. Enfin, la croissance de *N. caerulescens* est essentiellement stimulée par des hautes teneurs en matière organique, une faible densité apparente, une texture limoneuse et un bon apport en azote. Ce dernier élément entraîne cependant une baisse des concentrations en ETM dans les

plantes quand sa teneur augmente dans le sol. La fertilisation azotée ne devrait donc être utilisée qu'en cas de forte carence azotée.

Ce travail a permis de démontrer qu'une culture de *N. caerulescens* pouvait extraire jusqu'à 18 % du Cd total (CAL-SF) et 10 % du Zn total (NMET) dans les 20 premiers cm de sols modérément contaminés (jusqu'à 10 mg Cd kg<sup>-1</sup> et 1000 mg Zn kg<sup>-1</sup>). À condition d'augmenter et de stabiliser les rendements de biomasse aérienne, la phytoextraction du Cd avec *N. caerulescens* pourrait donc être une technique pour décontaminer des sols modérément contaminés en Cd tels que les sols agricoles ou les sols urbains.

---

# Summary

---

Urban and agricultural soils contamination with trace metals is a major sanitary and environmental issue. In the context of urban agriculture development and community gardens expansion, there is a strong interest in the development of ecological remediation methods which would preserve the soil quality and fertility. Phytoextraction is an ecological remediation technique which relies on the use of metal accumulator plants to reduce soil trace metals concentrations. The European crucifer *Noccaea caerulescens* (Alpine pennycress) – a zinc-cadmium-nickel hyperaccumulator – is considered the model species for phytoextraction due to its extremely high levels of metal accumulation in natura. The optimal cultural conditions of *N. caerulescens* are, however, still largely unknown.

The main objective of this work was therefore to optimize Cd and Zn phytoextraction with *N. caerulescens*. We conducted field trials in Brussels on sites moderately contaminated with trace metals. We first aimed to compare the extraction efficiency of calamine populations from South of France (CAL-SF) and non-metallicolous populations of *N. caerulescens* (NMET) from Luxemburg. In parallel, the second objective was to test the effect of several cultural practices on growth and metal accumulation to develop adequate crop management. The last objective was to study the influence of edaphic variables on phytoextraction efficiency.

In the field, we have demonstrated for the first time that NMET populations are significantly more efficient for Zn phytoextraction than CAL-SF populations. NMET populations combine both higher biomass production and greater resistance to herbivores and pathogens. This work highlights that the life cycle – annual or biennial – is an important determinant of growth rate, extraction yield and crop cycle. Our results show that the most efficient cultural practice consists in transplanting biennial seedlings at a high density (100-120 plants m<sup>-2</sup>) in autumn, followed by a long growing season (12 months). For annual plants, an installation in the spring is more favorable. Finally, the growth of *N. caerulescens* is mainly stimulated by high levels of soil organic matter, a low bulk density, a silty texture, and a sufficient nitrogen supply. Increasing soil nitrogen concentration, however, leads to a decrease in plant metal concentrations. Nitrogen fertilization should therefore only be used in cases of soil nitrogen deficiency.

This work demonstrates that a culture of *N. caerulescens* could extract up to 18% of total soil Cd (CAL-SF) and 10% of total soil Zn (NMET) in the first 20 cm of moderately contaminated soils (up to 10 mg Cd kg<sup>-1</sup> and 1000 mg Zn kg<sup>-1</sup>). Cd phytoextraction with *N. caerulescens* could therefore be an adequate technique for the remediation of soil moderately contaminated with Cd if we manage to stabilize biomass yields with cultivar selection.

---

# Table des matières

---

<b>Contexte</b> .....	1
<b>Introduction générale</b> .....	3
1. Contamination des sols en Eléments Traces Métalliques .....	3
1.1. Sources de contamination .....	3
1.2. Etat des lieux de la contamination des sols .....	4
1.3. Biodisponibilité des ETM dans le continuum sol-plante .....	8
1.4. Risques pour l'environnement et la santé publique .....	9
1.5. Assainissement et gestion des risques .....	13
2. Phytoremédiation .....	14
2.1. La phytoremédiation comme méthode écologique de dépollution .....	14
2.2. Efficacité d'extraction et amélioration .....	15
2.3. Filières hyperaccumulatrices et à haute biomasse .....	17
2.4. Valorisation de la biomasse, recyclage des ETM et agromine .....	19
3. <i>Noccaea caerulescens</i> - De l'hyperaccumulation à la phytoextraction .....	20
3.1. Cycle de vie, écologie et distribution .....	20
3.2. Tolérance et hyperaccumulation des ETM .....	23
3.3. Variations génétiques et phénotypiques entre populations .....	26
3.4. Phytoextraction avec <i>N. caerulescens</i> .....	29
<b>Objectifs de la thèse</b> .....	32
<b>Chapitre 1</b> .....	33
Phytoremédiation des sols urbains contaminés en ETM avec <i>Noccaea caerulescens</i> : comparaison de populations non-métallicoles avec la population métallicole 'Ganges' ....	33
<b>Chapitre 2</b> .....	55
Phytoextraction du Cd et du Zn avec <i>Noccaea caerulescens</i> pour la remédiation des sols urbains : influence de la fertilisation azotée et de la densité de repiquage .....	55
<b>Chapitre 3</b> .....	77
Evaluation en champ de cycles de culture de <i>Noccaea caerulescens</i> pour l'amélioration de la phytoextraction du cadmium et du zinc .....	77

<b>Chapitre 4</b> .....	101
Influence des conditions édaphiques et de la fertilisation azotée sur l'efficacité de phytoextraction du cadmium et du zinc par <i>Noccaea caerulescens</i> .....	101
<b>Chapitre 5</b> .....	123
Sélection massale de cultivars de <i>Noccaea caerulescens</i> à haut rendement .....	123
<b>Discussion générale</b> .....	137
1. Quelle influence de la variabilité inter- et intra-populationnelle ? .....	137
1.1. Différences entre écotypes Ganges et NMET-Lux .....	137
1.2. Sélection .....	139
2. Comment mettre en place la phytoextraction ? .....	143
2.1. Influence des pratiques de cultures .....	143
2.2. Conditions édaphiques .....	146
3. La phytoextraction avec <i>N. caerulescens</i> comme option de remédiation écologique ? .....	147
3.1. Impact sur les concentrations du sol en Cd et Zn .....	147
3.2. Quelles applications pour la phytoextraction ? .....	149
3.3. Enjeux et limites .....	151
4. Perspectives de recherche .....	153
<b>Conclusion</b> .....	155
Bibliographie .....	156
Annexes .....	175
Publications et communications .....	199



---

# Contexte

---

Cette thèse a débuté suite à un projet de recherche-action lancé conjointement en 2013 par notre service de recherche et le Centre d'Ecologie Urbaine (CEU), une association bruxelloise qui traite de questions d'écologie en ville et fait le pont entre les citoyens, les chercheurs et le monde politique. Tout a commencé autour d'un atelier workshop organisé par le CEU sur le thème de la phytoremédiation comme solution potentielle face aux problèmes de pollution des sols rencontrés par les jardiniers et potagistes bruxellois. Suite à cette première rencontre, le Laboratoire d'Ecologie végétale et Biogéochimie s'associe avec le CEU pour lancer un projet de recherche-action intitulé **Opération Tournesol** qui visait à tester sur le terrain la **phytoremédiation** comme méthode de dépollution écologique des sols de potagers et friches contaminés en éléments traces métalliques (métaux lourds). Après un an et demi, avec presque deux saisons de culture, beaucoup d'enseignements pouvaient être tirés : la méthode est prometteuse mais son succès semble être extrêmement variable entre les sites, il y a un enthousiasme et un intérêt grandissant de la part des utilisateurs pour le projet et la problématique des sols contaminés en ville, plusieurs saisons de culture devraient être réalisées pour pouvoir tirer des conclusions fiables sur l'efficacité de la méthode.

Il est alors décidé de lancer une thèse sur la phytoremédiation, ou plus précisément la phytoextraction, avec une plante hyperaccumulatrice de la famille des Brassicaceae (Crucifères) : ***Noccaea caerulescens***, le **tabouret calaminaire**. Pourquoi le choix de cette plante ? Ceci s'explique d'abord simplement parce que le laboratoire travaille depuis plus de 20 ans sur cette espèce, via de nombreux travaux relatifs à l'accumulation et la tolérance aux hautes concentrations en métaux, l'écologie de la plante en milieu naturel et ses interactions avec les herbivores. Ensuite, parmi les plantes hyperaccumulatrices connues en Europe, elle est considérée comme une des plus prometteuses pour la phytoextraction, de par les très hautes teneurs en Cd, Zn et Ni qu'elle peut accumuler dans ses organes aériens et du fait de la relative facilité de sa mise en culture. Plusieurs essais de terrain avec *N. caerulescens* ont ainsi été réalisés pendant une quinzaine d'année à partir du début des années 90. Les conclusions de ces études apparaissent relativement mitigées pour plusieurs raisons qui seront exposées dans l'introduction. Au moment de commencer cette thèse, la dernière étude sur des essais de terrain remontait déjà à 2007. Les perspectives et questions soulevées par plusieurs publications de ces années-là sont restées en suspens et un projet de recherche s'attaquant notamment aux dimensions agronomiques de la méthode semblait être tout à fait opportun.

En résumé, cette thèse s'inscrit dans un double contexte. Premièrement, d'un point de vue sociétal, l'agriculture urbaine connaît un véritable essor et les menaces qui pèsent sur les terres nourricières en ville (sols agricoles, friches et potagers urbains) constituent un véritable enjeu. La contamination des sols constitue l'une de ces menaces, pour laquelle il existe une demande forte de solutions durables. Deuxièmement, d'un point de vue scientifique, plusieurs incertitudes subsistent quant à l'efficacité et la mise en place concrète de la phytoextraction avec des plantes hyperaccumulatrices, présentée en théorie comme une méthode écologique prometteuse de remédiation des sols contaminés en éléments traces métalliques.

Cette thèse est divisée en plusieurs chapitres. Tout d'abord, l'**introduction générale** dresse l'état de l'art des grands concepts nécessaires à la mise en contexte de ce travail, en partant du cadre général de la contamination des sols, en présentant ensuite la phytoremédiation et enfin en abordant la biologie de l'espèce étudiée. Le **premier chapitre** aborde la comparaison de plusieurs populations et écotypes de *N. caerulescens* via un essai de terrain sur deux friches où l'impact de l'utilisation de compost a également été testé. Ensuite, dans le **deuxième chapitre**, nous discutons des effets de la fertilisation azotée et de la densité de plantation sur l'efficacité de l'extraction des ETM via un deuxième essai de terrain sur un potager collectif et une friche. La troisième expérience de terrain –présentée dans le **troisième chapitre**– étudie une autre dimension des pratiques culturales, celle des cycles de culture, en comparant plusieurs saisons et méthodes d'installation ainsi que différentes durées de croissance. La variabilité de cycles de vie entre écotypes y est également discutée. Dans le **quatrième chapitre**, nous étudions l'influence du sol sur l'efficacité de la phytoextraction, cette fois via une expérience en conditions contrôlées sur 24 sols contaminés collectés à Bruxelles et en région Wallonne. Enfin, le **cinquième chapitre** traite, via un essai préliminaire, de la faisabilité de la sélection massale de cultivars à plus haut rendement. Finalement, dans la **discussion générale**, nous synthétisons les résultats obtenus dans les chapitres précédents pour discuter des enseignements fondamentaux et appliqués apportés par ce travail et aborder les perspectives de recherche qu'il soulève. Nous y évaluons aussi l'efficacité de la phytoextraction comme méthode de dépollution durable des sols urbains et agricoles sur base des essais qui ont été menés dans le cadre de cette thèse.



---

# Introduction générale

---

## 1. Contamination des sols en Eléments Traces Métalliques

Les contaminants du sol sont nombreux et de natures chimiques diverses : métaux, huiles minérales, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), hydrocarbures aromatiques (BTEX - Benzène, Toluène, Éthylbenzène et Xylènes), solvants, résidus de produits phytosanitaires, polychlorobiphényles (PCB), radionucléides voire même des éléments comme l'azote ou le phosphore qui, à fortes concentrations, peuvent avoir des conséquences néfastes pour l'environnement. Nous traiterons dans cette thèse spécifiquement des polluants dits inorganiques et plus précisément des Eléments Traces Métalliques (ETM). Les ETM sont les métaux présents à l'état de trace dans la croûte terrestre (<0.1 %) (Hooda 2010). L'appellation « métaux lourds » est utilisée dans le langage courant pour désigner ceux-ci, mais le terme manque cependant de cohérence (leur masse atomique n'est pas toujours élevée et certains sont des métalloïdes) et est donc évité. Les ETM les plus couramment retrouvés dans les sols sont le cadmium (Cd), le plomb (Pb), le zinc (Zn), le cuivre (Cu), le nickel (Ni), le cobalt (Co) ou encore le chrome (Cr) (Alloway 2013). Les concentrations de ces éléments dans la croûte terrestre constituent ce qu'on appelle le fond géochimique naturel, sur base duquel on peut parler de contamination d'origine naturelle ou anthropique en cas de concentrations significativement supérieures à cette valeur de référence dans le sol. A titre d'exemple, le Cd est présent naturellement dans les roches de la croûte continentale, mais à des teneurs moyennes très faibles (0,1 mg kg<sup>-1</sup>) (Wedepohl 1995), tandis que les concentrations moyennes dans les sols agricoles français ou européens s'élèvent par exemple à environ 0,3 mg kg<sup>-1</sup> (Smolders et Mertens 2013).

### 1.1. Sources de contamination

La contamination des sols en ETM est aussi vieille que la capacité de l'homme à exploiter et transformer des minerais, ce qui remonte à l'âge du Bronze (2500 BC) (Kabata-Pendias et Mukherjee 2007). La contamination d'un sol peut donc être historique si elle est liée à d'anciennes activités qui ont été arrêtées, ou actuelle si les émissions de contaminants sont toujours en cours. Les ETM peuvent s'accumuler dans un sol par l'apport direct de produits solides ou liquides à haute teneur en ETM et aussi par dépôt de contaminants émis dans l'atmosphère. Les sources principales d'ETM dans l'environnement sont 1) **l'activité industrielle** qui comprend l'activité minière et l'industrie métallurgique, mais aussi les industries liées au traitement de surface et de peinture ou encore à la fabrication de batteries, piles et accumulateurs, 2) **la production d'énergie**, via les centrales au charbon, au pétrole, le traitement et l'incinération des déchets et 3) **les transports** via la combustion

d'hydrocarbures (Alloway 2013, Azimi *et al.* 2003, Schaidler *et al.* 2007, Sterckeman *et al.* 2000). Dans le cas des sols agricoles, les ETM sont principalement apportés directement par des produits et déchets tels que les boues d'épuration, le compost et les engrais phosphatés (Six and Smolders 2014). Le cadmium (Cd) est en effet présent à relativement haute concentration dans les roches phosphatées (entre 20 et 30 mg Cd kg<sup>-1</sup> en moyenne, jusqu'à 60 mg Cd kg<sup>-1</sup> dans certaines roches sédimentaires Nord-africaines) – par substitution au Ca dans le réseau cristallin – à partir desquelles sont produites les fertilisants (Kratz *et al.* 2016, Mortvedt 1996, Nziguheba et Smolders 2008).

Le plomb (Pb) représente un des contaminants métalliques les plus emblématiques. Probablement le premier élément dont le minerai a été extrait par l'Homme, le Pb a été abondamment utilisé dès l'Antiquité, notamment dans l'Empire romain (Nriagu 1983). Depuis l'ère industrielle, les sources de Pb dans l'environnement se sont multipliées, avec notamment l'introduction à partir de 1920 de tétraéthyl (ou tétraméthyl) de Pb dans l'essence comme agent antidétonateur, avant l'abandon progressif de son utilisation dans les pays développés à la fin du 20<sup>ème</sup> siècle (Steinnes 2013). Les sols urbains sont particulièrement exposés à la contamination en Pb, essentiellement dû à l'essence plombée – considérée aujourd'hui comme une pollution historique – et aux pigments utilisés dans les peintures (céruse), mais aussi à la production de plastique et aux décharges de divers matériaux comme les pneus ou les batteries automobiles (Steinnes 2013). Avec le Pb, le Cd et le Zn forment un trio d'ETM souvent rencontrés ensemble dans les sols contaminés. Ainsi ils sont souvent associés dans les roches, mais aussi dans les rejets de l'industrie métallurgique (Alloway 2013, Sterckeman *et al.* 2000).

**À Bruxelles**, l'identification des sites potentiellement contaminés se fait sur base des activités à risque actuelles ou passées référencées pour chaque parcelle cadastrale et constitue « l'inventaire de l'état du sol ». Les activités qui mènent le plus fréquemment à une inscription à l'inventaire de l'état du sol en région bruxelloise sont les dépôts de liquides inflammables, les ateliers d'entretien de véhicules, les cabines de peinture, les imprimeries, les dépôts de produits dangereux et les ateliers de travail des métaux (Bruxelles Environnement 2018).

## 1.2. Etat des lieux de la contamination des sols

Dans leur rapport de 2014, la Commission Européenne et l'Agence Européenne de l'Environnement (AEE) estiment à environ 2,5 millions le nombre de sites potentiellement contaminés en Europe (39 pays membres ou partenaires de l'AEE), dont 45 % ont été réellement identifiés et dont 340 000 sont très probablement contaminés (Van Liedekerke *et*

al. 2014). De ce total, seulement 58 000 sites avaient déjà été décontaminés lors de l'inventaire fait en 2011-2012 (Van Liedekerke *et al.* 2014). En 2002, l'AEE estimait à entre 59 et 109 milliards d'euros le coût potentiel de dépollution des sites contaminés en Europe. Ces chiffres démontrent l'enjeu économique incontournable que représente la contamination des sols.

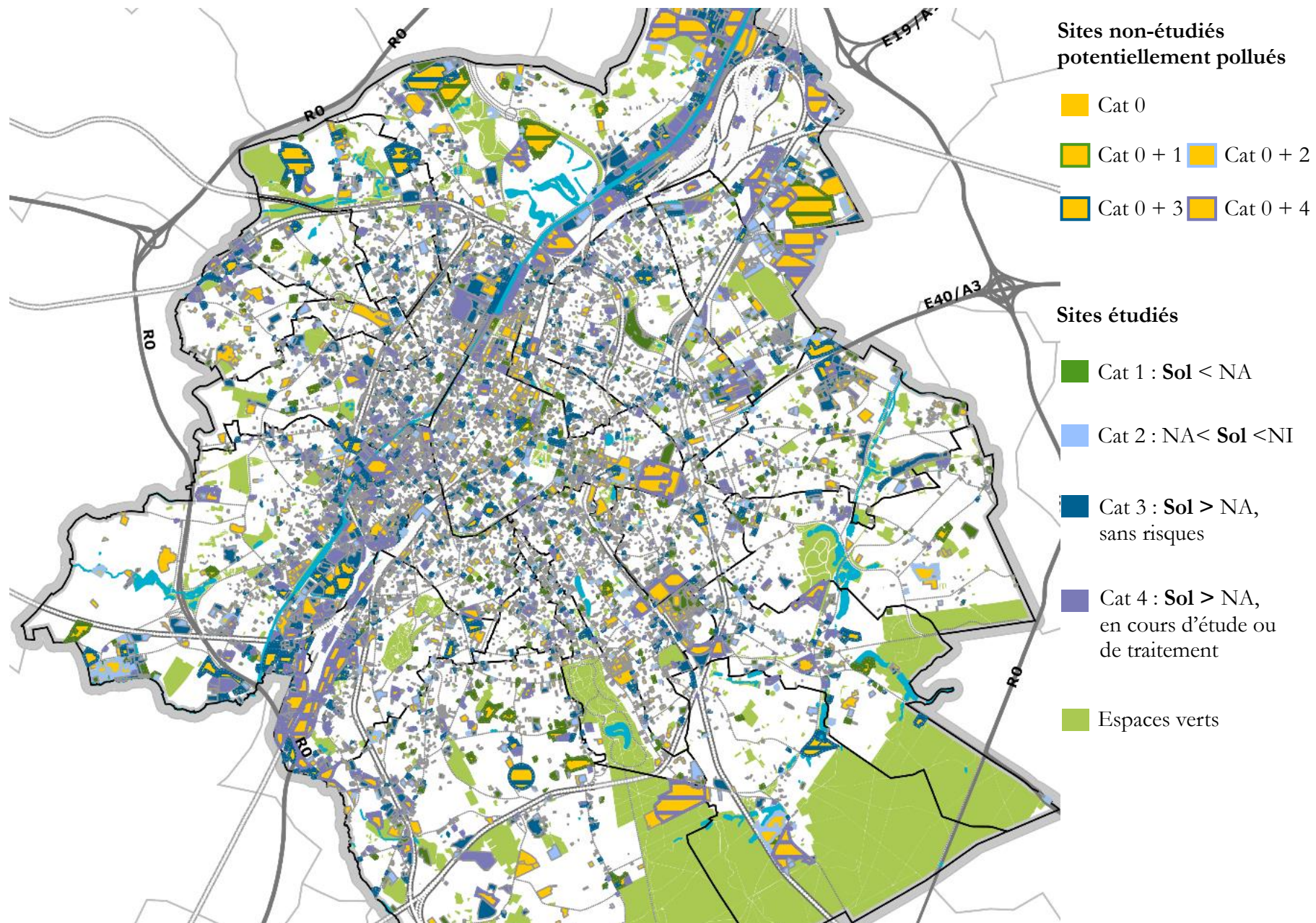
En Europe, les contaminants les plus fréquemment retrouvés dans les sols de sites contaminés sont les ETM (35 %), huiles minérales (24 %) et hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (11 %) et les hydrocarbures aromatiques (10 %) (Van Liedekerke *et al.* 2014). Ces valeurs moyennes cachent bien entendu des disparités importantes entre pays, qui témoignent de l'histoire industrielle de chacun d'entre eux et de leurs secteurs d'activité dominants. Les huiles minérales sont par exemples les contaminants majeurs en Flandre (50 %), Hongrie (64 %), Lituanie (60 %) ou en Finlande (39 %), tandis que les ETM sont les contaminants les plus souvent rencontrés dans les sols contaminés en Autriche (60 %), en France (50 %), au Monténégro (64 %) ou encore aux Pays-Bas (39 %). La Wallonie n'ayant adopté une législation relative à la contamination des sols qu'en 2009, elle n'est pas encore reprise dans les statistiques européennes.

Les sols agricoles représentent une superficie importante de sols contaminés en ETM en Europe et dans le reste du monde bien que leurs teneurs soient nettement inférieures à celles des sites industriels. Les dépôts atmosphériques, l'épandage de boues d'épuration, de fumier et lisier et l'utilisation de fertilisants phosphatés sont les causes majeures de l'augmentation constante des teneurs en ETM durant les deux derniers siècles (Nicholson *et al.* 2003). Les concentrations en Cd dans les sols agricoles ont par exemple augmenté d'un facteur 1,3-2,6 durant les 19<sup>ème</sup> et 20<sup>ème</sup> siècles (Jones *et al.* 1987, Six and Smolders 2014). Une analyse récente de bilan de masse de Cd prédit cependant une légère baisse des concentrations en Cd dans les sols agricoles européens (15 % en 100 ans) principalement liée aux réductions des dépôts atmosphériques et à la baisse de l'utilisation des fertilisants phosphatés (Six et Smolders 2014). Cette valeur cache cependant des disparités entre pays comme le souligne un bilan de masse fait pour les sols français qui prédit au contraire une légère augmentation de 3% dans les 100 prochaines années, liée à une plus haute teneur en Cd des fertilisants phosphatés en France et à moins de lixiviation que dans la moyenne européenne (Sterckeman *et al.* 2018). L'apport annuel moyen de Cd par les fertilisants phosphatés sur les sols agricoles européens est d'environ 0.8 g Cd ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup>, tandis que les dépôts atmosphériques moyennes s'élèvent à 0.35 g Cd ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> (Six et Smolders 2014). En ce qui concerne le zinc (Zn), les apports annuels sur les sols agricoles européens sont d'environ 400-800 g ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> jusqu'à environ 4500 g ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> sur les sols où sont épandues des boues d'épuration (Mertens et Smolders 2013, Nicholson *et al.* 2003). La prise de conscience des

problèmes de contamination des sols agricoles a cependant rendu plus strictes les normes de concentrations en ETM dans les boues d'épuration, divisant ainsi par deux les teneurs moyennes dans les boues épandues en Allemagne et en Autriche pendant la période 1980-2000 (Mertens et Smolders 2013). Par ailleurs, la réduction des dépôts atmosphériques de Cd mentionnée plus haut a lieu de manière graduelle et conjointe à celles de l'As, Cr, Ni et Pb depuis le milieu des années 60 et s'explique par l'introduction de méthodes plus efficaces de filtration, de précipitation et ensuite de désulfurisation des gaz de combustion aux points d'émission majeurs (fonderies, centrales électriques, fours de cimenterie, ...) ainsi qu'à la migration de certaines industries en dehors de l'Europe (Pacyna *et al.* 2007).

A l'échelle d'une ville comme **Bruxelles**, c'est près de 18 % de la surface qui serait potentiellement contaminée selon l'inventaire de l'état du sol (Bruxelles Environnement 2018). Les contaminants les plus fréquents sont les huiles minérales (environ 40% des cas), les ETM (25%) et les HAP (25%). Les ETM dépassant les plus fréquemment les normes dans les sols bruxellois sont le Pb, le Cd et le Zn. Entre 2005 et 2016, environ 479 ha ont été traités en région bruxelloise, pour un coût total de 403 millions d'euros, soit 84 euros le m<sup>2</sup> (Bruxelles Environnement 2018). La répartition spatiale des sites contaminés en ville est particulièrement hétérogène et essentiellement dépendante de la localisation des industries et activités à risque. A Bruxelles, c'est l'axe situé le long du canal de Charleroi-Bruxelles-Willebroek qui concentre le plus de sites potentiellement pollués ou en cours de traitement à cause de l'importante activité industrielle présente et passée autour de cette voie de transport (Figure 1). A notre connaissance, il n'existe pas de données sur les dépôts atmosphériques d'ETM à Bruxelles. A Paris, ils étaient évalués à environ 3 g Cd ha<sup>-1</sup> et 150 g Zn ha<sup>-1</sup> par an en 2000 (Azimi *et al.* 2005), tandis qu'en Europe ils s'élèvent en moyenne à moins d'1 g Cd ha<sup>-1</sup> et 100 g Zn ha<sup>-1</sup> par an (Alloway 2013).

**Figure 1.** Carte de l'inventaire de l'état du sol en Région Bruxelloise, reprenant près de 15 000 parcelles cadastrales classées en 5 catégories majeures en fonction des activités menées sur celle-ci ou sur base d'études de sol. La **Catégorie 0** (Cat 0) reprend toutes les parcelles sur lesquelles s'exerce ou s'est exercée une activité à risque et où il y a donc présomption de pollution. Les catégories 1 à 4 reprennent les parcelles qui ont fait l'objet d'études de reconnaissance de l'état du sol et dont les concentrations en polluants sont soit 1) de **Catégorie 1** (Cat 1) : inférieures aux normes d'assainissement (NA) ; 2) de **Catégorie 2** (Cat 2) : supérieures aux NA mais inférieures aux normes d'intervention (NI) ; 3) de **Catégorie 3** (Cat 3) : supérieures aux NI mais jugées sans risque ou dont le risque est rendu tolérable par des mesures de restriction d'usage ; 3) de **Catégorie 4** (Cat 4) : supérieures aux NI, en cours d'étude, de gestion de risque ou d'assainissement. Bruxelles Environnement 2018.



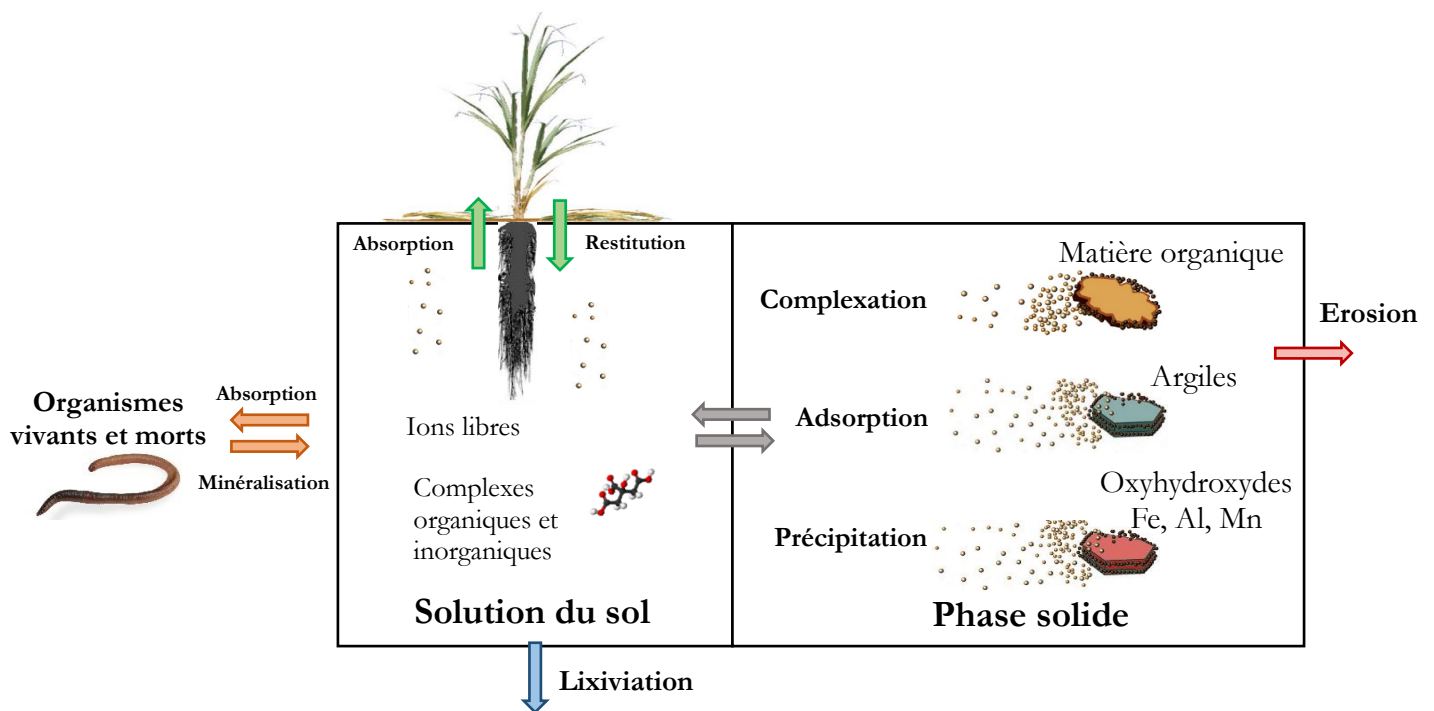
### 1.3. Biodisponibilité des ETM dans le continuum sol-plante

Le sol est une composante particulière dans le cycle des ETM car il constitue à la fois un puits pour les contaminants, mais également parce qu'il joue un rôle tampon très important dans le transfert vers les autres composantes que sont l'atmosphère, l'hydrosphère et les organismes vivants (Kabata-Pendias 2010). Ce sont généralement les horizons de surface du sol (0-30 cm) qui présentent l'enrichissement le plus important en ETM. Les trois principales voies de sortie des ETM du sol sont l'absorption par des organismes vivants (plantes et animaux), la lixiviation vers la nappe phréatique et les eaux souterraines et la dispersion par érosion des couches superficielles (Tack 2010). Plusieurs paramètres édaphiques physiques, chimiques et biologiques influencent les formes sous lesquelles se trouvent les ETM du sol et donc leur mobilité et leur disponibilité pour les plantes, appelée **biodisponibilité** environnementale (Sauvé *et al.* 2000, Degryse *et al.* 2009). Les ETM se retrouvent soit dans la **phase solide** du sol, soit en **solution** (Figure 2). La phase solide correspond aux éléments adsorbés sur des surfaces d'échanges (argile ou matière organique), des oxyhydroxydes ou des carbonates, ou précipités sous formes de complexes organiques, de phosphates ou de sulfures (Tack 2010). En solution, les ETM peuvent se retrouver sous formes d'ions libres ou complexés à des chélatants organiques ou inorganiques (substances humiques, citrate, malate, oxalate) ou liés à des colloïdes en suspension (Schneider et Nguyen 2011). Ce sont les ETM en solution qui sont les plus facilement disponibles pour les plantes, ainsi que les formes **labiles**, c'est-à-dire faiblement adsorbées (Young 2013). La disponibilité des ETM est principalement influencée par le pH qui joue un rôle important dans les réactions de sorption et désorption, précipitation et dissolution (Kabata-Pendias 2010). Un pH faible favorise la mise en solution des ETM, tandis qu'un pH élevé réduit les concentrations en ETM dans la solution du sol (au-delà de pH 8 les ETM sont peu disponibles). Les autres facteurs influençant la biodisponibilité sont liés à la nature et aux caractéristiques des phases solides du sol : la **matière organique** a un pouvoir adsorbant sur beaucoup d'éléments dont les ETM, elle peut les immobiliser ; la **texture** influence aussi l'adsorption et la mise en solution ou non des ETM (un sol sableux aura tendance à avoir un pouvoir de sorption plus faible qu'un sol argileux) ; la présence de **carbonates** ou d'**oxyhydroxydes de Fe, Al et Mn** participe également à la sorption des ETM (Tack 2010).

Les plantes absorbent les macroéléments essentiels ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,...) tout comme les microéléments essentiels ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,...) et non essentiels ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,...) via des canaux et transporteurs racinaires sous forme d'ions libre ou de complexes organiques. L'absorption peut être améliorée par l'exploration racinaire et par les sécrétions de protons ou de molécules organiques par les racines, ou encore par l'activité bactérienne rhizosphérique, qui peuvent faciliter la désorption des cations et augmenter leur mobilité au

niveau de la rhizosphère (Cuypers *et al.* 2013). Par ailleurs, les ETM peuvent entrer en compétition avec d'autres cations ou entre eux lorsqu'ils utilisent des sites d'absorption semblables ; on peut par exemple citer les interactions  $\text{Cd}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  (McLaughlin *et al.* 2011).

La biodisponibilité environnementale d'un ETM reste cependant un concept plastique, variable en fonction du type d'organisme considéré, de l'espèce végétale, voire même des variétés d'une même plante. Il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de la caractériser, mais la méthode la plus fréquente est l'utilisation d'extractants chimiques (Peijnenburg *et al.* 2007). D'un point de vue analytique, on peut doser d'une part les **concentrations totales** – c'est-à-dire la masse totale d'un élément présent dans le sol (toutes fractions et formes confondues) – par dissolution acide et, d'autre part, différentes **concentrations** dites **échangeables**, qui approximent des fractions plus ou moins facilement disponibles en fonction du pouvoir de l'extractant utilisé ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$ , EDTA, DTPA,...) (Kumpiene *et al.* 2017, Meers *et al.* 2007, Peijnenburg *et al.* 2007).



**Figure 2.** Représentation schématique des différentes phases et fractions des ETM dans les sols.

#### 1.4. Risques pour l'environnement et la santé publique

La contamination des sols par des ETM peut à la fois être néfaste pour la qualité des sols et pour les organismes qui y vivent, mais aussi pour la santé humaine. C'est ainsi qu'on peut différencier les **risques environnementaux** (ou écotoxicologiques) et les **risques sanitaires** liés à la contamination (De Vries *et al.* 2013).

Les **risques écotoxicologiques** sont liés aux effets des ETM sur les organismes du sol et sur les plantes, et peuvent se marquer par une réduction de la diversité, de l'abondance et de la biomasse, et des changements dans les processus microbiens et physiologiques (Hodson 2013). Le **cadmium** est ainsi toxique pour les plantes, ce qui se manifeste par de la chlorose ou une réduction de croissance à partir de concentrations en Cd dans les tissus déjà relativement élevées (8-12 mg kg<sup>-1</sup> de matière sèche) par rapport à des teneurs normales (0.5-1 mg kg<sup>-1</sup> de matière sèche) (Balsberg Pålsson 1989). Dans l'ensemble, les concentrations en Cd du sol qui sont toxiques pour les invertébrés et les microorganismes du sol et les plantes sont plus élevées que celles pour lesquelles il existe un risque pour la santé humaine (Mertens et Smolders 2013). Les risques écotoxicologiques liés au Cd sont donc beaucoup moins étudiés que les risques sanitaires. A l'inverse, le **zinc** ne constitue généralement pas un élément toxique pour l'Homme, mais est un élément essentiel pour lequel environ un tiers de la population mondiale est en déficit (Mertens et Smolders 2013). Cependant, des concentrations élevées en Zn peuvent être toxiques pour les plantes et les (micro)organismes du sol. Des concentrations entre 100 et 500 mg Zn kg<sup>-1</sup> dans les plantes peuvent déjà causer des réductions de rendement (des plantes saines ayant en moyenne 60 mg Zn kg<sup>-1</sup>), en réduisant la croissance racinaire et aérienne et en induisant des carences en fer et en magnésium (Macnicol et Beckett 1985). L'évaluation du risque lié au Zn est donc uniquement basée sur l'effet sur les organismes du sol et sur son fonctionnement (Smolders *et al.* 2009).

Les **risques sanitaires** sont eux essentiellement liés à l'accumulation des ETM dans la chaîne alimentaire. Les voies principales d'exposition humaine aux ETM sont l'ingestion – accidentelle ou volontaire – de sol et la consommation d'aliments d'origine végétale (légumes et céréales) bien devant l'exposition par inhalation ou par voie cutanée (McLaughlin *et al.* 2011). Le **cadmium** est un des métaux les plus toxiques pour l'être humain. Il s'accumule dans le corps (foie et reins) ; une exposition chronique au cadmium augmente fortement le risque de maladie hépatique et de cancer (Järup et Åkesson 2009). Le cas aigu d'intoxication au Cd est la maladie d'Itai-Itai, apparue au Japon au début du 20<sup>ème</sup> siècle, caractérisée par une fragilité osseuse entraînant fractures et déformations et par de l'insuffisance rénale. La voie principale d'exposition au Cd est le tabac dans le cas des fumeurs et la nourriture pour les non-fumeurs, plus particulièrement les produits à base de céréales, les légumes, les racines et tubercules (EFSA 2012). Le blé et les pommes de terre sont les principales sources alimentaires de Cd en Europe tandis que le riz est la première en Asie, ce qui s'explique par leur importance dans le régime alimentaire et par l'impact de l'apport de fertilisants phosphatés et de boues d'épuration (Baize 2009, Clemens *et al.* 2013, Six et Smolders 2014). La concentration en Cd dans les grains de blé a ainsi augmenté de manière graduelle au 20<sup>ème</sup> siècle, faisant plus que doubler entre 1918 et 1980 (Andersson et Bingenfors 1985).



Le **plomb** est également un élément réputé pour sa toxicité, notamment car il fut à l'origine, sous l'Empire Romain, d'un des premiers cas connus d'intoxication massive liée à un contaminant métallique, qu'on a appelé plus tard le saturnisme (Nriagu 1983). Le plomb affecte le système nerveux et les reins, cause de l'anémie, diminue le développement cognitif chez les enfants, accélère l'apparition des maladies cardio-vasculaires et est cancérigène (Kabata-Pendias et Mukherjee 2007). Les voies d'exposition au plomb se font par l'eau, la nourriture (bien que ce soit un élément relativement peu disponible pour les plantes), l'inhalation de poussières et l'ingestion de sol (Kabata-Pendias et Mukherjee 2007).

Compte tenu de l'importance de la voie alimentaire, le suivi de la qualité des produits agricoles pour la santé humaine est primordial. Les végétaux cultivés sur sols contaminés peuvent en effet accumuler des ETM dans leurs parties souterraines et aériennes par absorption racinaire, mais aussi être contaminés par les dépôts atmosphériques de métaux, principalement en zone urbaine et industrielle (Finster *et al.* 2004, Hough *et al.* 2004, Säumel *et al.* 2012, Wang *et al.* 2005). Actuellement, des normes réglementaires pour les teneurs en ETM dans les céréales, fruits et légumes n'existent que pour le Cd et le Pb (règlement européen CE n°1881/2006 du 19 décembre 2006).

En ville, ce sont surtout des légumes qui sont cultivés dans les potagers et jardins et ce sont donc sur eux que se concentrent les risques sanitaires. A Bruxelles, aucune étude systématique de la contamination des légumes produits sur le territoire n'a encore été réalisée à ce jour. En Wallonie par contre, la Société publique d'aide à la qualité de l'environnement (SPAQvE) – une société publique régionale – a commandité une étude d'investigation des zones de pollution atmosphérique de proximité dans 10 communes identifiées comme les plus à risque (Pereira *et al.* 2012). Un volet de cette étude, appelée POLLUSOL 2, s'est concentré sur les jardins potagers. Les chercheurs ont mis en évidence que les légumes poussant dans ces zones avaient des teneurs moyennes en ETM plus élevées que dans un référentiel de légumes produits sur sol non contaminés. De manière générale, l'étude montre que les légumes-feuilles et les légumes-racines accumulent plus d'ETM que les légumes-fruits et les légumes tubercules, ce qui est cohérent avec la littérature (McLaughlin *et al.* 2011). En moyenne, environ 10 % des légumes-racines et feuilles de l'étude présentaient des teneurs en Cd ou en Pb supérieures aux normes européennes. Dans 3 des 8 zones échantillonnées, c'est même 20 à 50 % de ces légumes qui étaient contaminés par un des deux éléments au moins.

Alors que la majorité des études de toxicité considère les effets de chaque contaminant séparément et fait l'hypothèse que les effets toxiques sont additifs (Järup 2003), on ne peut mettre de côté l'existence potentielle d'effets synergiques ou de renforcement liés à la présence simultanée d'un mélange de contaminants métalliques (Hodson 2013). Ces « effets

cocktails », semblables à ce qui est démontré avec les pesticides, peuvent être dus à des effets d'inhibition de mécanismes de détoxification d'un autre métal ou de réactions entre métaux, et ont déjà été démontrés pour certains organismes (Lock et Jansen 2002, Jonker *et al.* 2004). Ils restent cependant absents des études de risque (McCarty et Borgert 2006).

D'un point de vue scientifique, un sol est considéré comme contaminé en ETM quand la concentration d'au moins un élément dépasse un seuil où il affecte ses processus biochimiques et biologiques (Knox *et al.* 1999). Par ailleurs, d'un point de vue législatif, la contamination est établie sur base de normes réglementaires. Sur base de modèles de biodisponibilité et d'analyse de risque, sont définies à la fois des concentrations prédites sans effet (*Predicted No Effect Concentration*, PNEC) en dessous desquelles il n'y a pas d'effet négatif pour l'environnement ou l'Homme, mais aussi des normes et valeurs seuils de concentrations en ETM (variables entre pays), établies en fonction de l'utilisation du site (Smolders *et al.* 2009). On distingue à Bruxelles les **normes d'assainissement**, au-dessous desquelles on considère qu'il n'existe pas de risque, des **normes d'intervention** au-dessus desquelles une intervention est requise (Tableau 1). Entre ces deux seuils, une analyse de risque doit définir si des mesures de gestion de risque doivent être mises en place.

**Tableau 1.** Normes de contamination des sols en ETM (concentrations totales) en Belgique pour les Régions bruxelloise<sup>1</sup> (Bru.), flamande<sup>2</sup> (Fla.) et wallonne<sup>3</sup> (Wal.). Pour chaque affectation du sol, les Valeurs Références (ou Cibles) indiquent les teneurs sous lesquelles un sol est considéré comme non pollué, les Valeurs d'Assainissement (ou Seuil) impliquent une étude de caractérisation si elles sont dépassées et les Valeurs d'Intervention imposent un traitement de la pollution en cas de dépassement.

En mg kg <sup>-1</sup> MS	Cd			Cu			Ni			Pb			Zn		
	Bru.	Fla.	Wal.	Bru.	Fla.	Wal.	Bru.	Fla.	Wal.	Bru.	Fla.	Wal.	Bru.	Fla.	Wal.
<i>Valeur Référence</i>															
Toutes zones	0.7	0.2		20	14		16	24		31	25		77	67	
<i>Valeur d'Assainissement</i>															
Naturel	1.2		1	72		40	56		60	120		120	200		120
Agricole	1.2		1	72		50	56		65	120		200	200		155
Résidentiel	1.2		3	72		110	56		150	120		200	200		230
Commercial	1.2		10	72		110	56		150	120		280	200		230
Industriel	1.2		15	72		120	56		210	120		385	200		320
<i>Valeur d'Intervention</i>															
Naturel	2	2	10	120	120	80	93	93	100	200	200	170	333	333	215
Agricole	2	2	10	120	120	145	93	93	200	200	200	400	333	333	300
Résidentiel	6	6	30	197	197	290	95	95	300	560	560	700	333	333	710
Commercial		9.5	40		500	290		530	300		735	700		1000	710
Industriel	30	30	50	500	500	500	530	530	500	1250	1250	1360	1250	1250	1300

<sup>1</sup> Arrêté du Gouvernement de la Région de Bruxelles-Capitale du 29 mars 2018, MONITEUR BELGE 02.05.2018, [https://environnement.brussels/sites/default/files/legi\\_20180329\\_arrete\\_normes\\_o.pdf](https://environnement.brussels/sites/default/files/legi_20180329_arrete_normes_o.pdf)

<sup>2</sup> Arrêté du Gouvernement flamand du 14 Décembre 2007. fixant le règlement flamand relatif à l'assainissement du sol et à la protection du sol (VLAREBO), <https://navigator.emis.vito.be/mijn-navigator?woId=22989>

<sup>3</sup> Décret relatif à la gestion des sols du 5 décembre 2008 MONITEUR BELGE 18.02.2009, <http://environnement.wallonie.be/legis/solsoussol/soloo3.htm>

## 1.5. Assainissement et gestion des risques

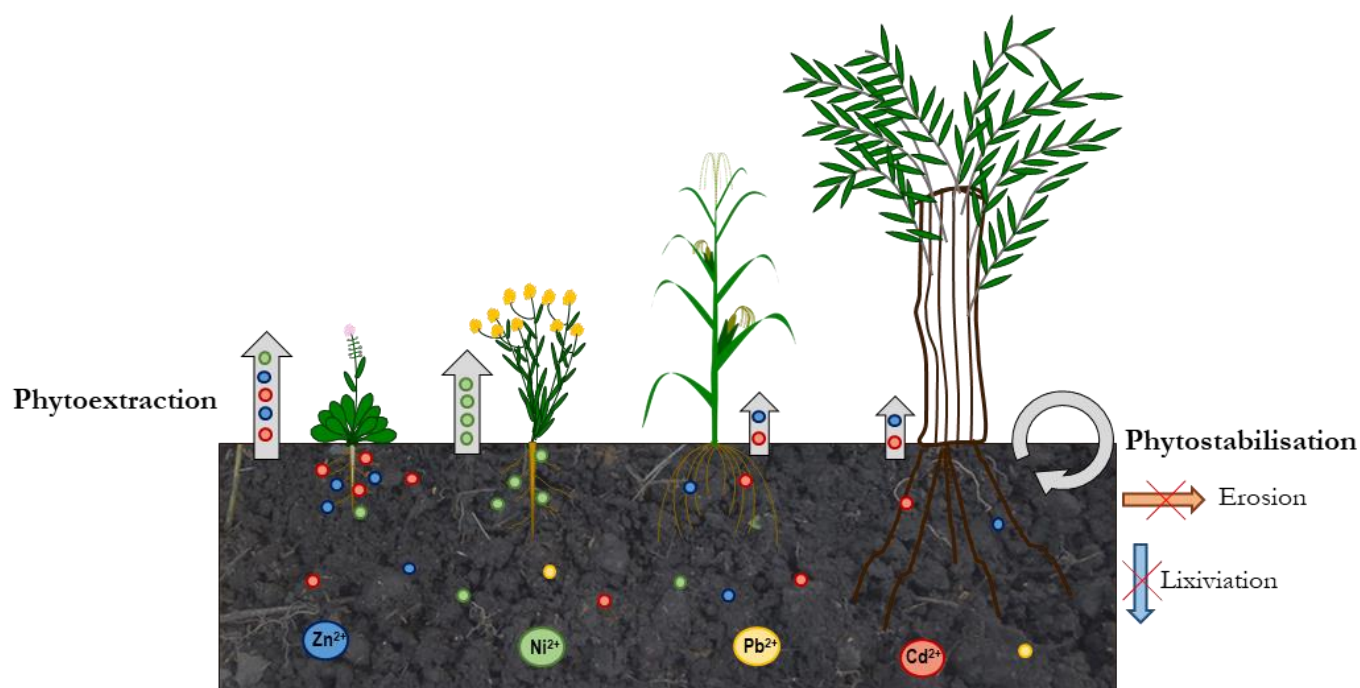
Le traitement d'un sol contaminé peut être envisagé de plusieurs manières : soit par gestion des risques, c'est-à-dire par la limitation du risque de toxicité, de diffusion ou de dispersion des contaminants dans l'environnement et à leur confinement à une zone déterminée ; soit par assainissement, c'est-à-dire par dégradation ou exportation des contaminants hors du site afin de ramener les teneurs sous la concentration seuil réglementaire d'assainissement. Dans la majorité des cas, l'assainissement d'un sol en ETM se fait par excavation des horizons contaminés, suivie soit par le stockage des terres en décharge, soit par un traitement physique ou chimique pour nettoyer les terres (Liu *et al.* 2018, Raskin *et al.* 1997, Salt *et al.* 1995). Certains traitements physiques, thermiques ou biologiques peuvent se faire *in situ* aussi. Les techniques traditionnelles nécessitent cependant un équipement spécialisé et sont relativement coûteuses, ce qui les rend principalement adaptées pour des petites surfaces à haute valeur marchande : évaluées à entre 600 000 et 1 000 000 dollars par hectare aux Etats-Unis il y a 20 ans (Cunningham et Ow 1996, Salt *et al.* 1995), ces méthodes de traitements ont coûté près de 400 millions d'euros à la région bruxelloise ces 10 dernières années, pour un coût moyen de 835 000 euros par hectare (Bruxelles Environnement 2018).

Les traitements biologiques, basés sur l'utilisation de plantes dans le cas des ETM, constituent une alternative de plus en plus étudiée pour remplacer dans certains cas les méthodes dites conventionnelles (Bert *et al.* 2017a, Bert *et al.* 2013, Cunningham et Ow 1996, Garbisu et Alkorta 2001, Mench *et al.* 2010, Vangronsveld *et al.* 2009). Pourquoi ce besoin de chercher une alternative ? L'évaluation de la durabilité des méthodes de traitement des sols peut se diviser en plusieurs volets : i) l'impact sur les propriétés physico-chimiques et biologiques du sol (maintien/amélioration/ dégradation) ; ii) l'impact environnemental global des opérations *in-* et *ex-situ* ainsi que de l'éventuelle mise en décharge des terres contaminées ; iii) la valorisation potentielle de ces sols pour la production de biomasse et le maintien voire l'augmentation de la biodiversité ; et enfin iv) le volet social prenant en compte les usages du site et ses utilisateurs. Les méthodes conventionnelles d'excavation et de traitement physico-chimique des sols ne sont pas satisfaisantes sur les volets d'intégrité du sol et d'impact environnemental. Leur coût élevé empêche aussi leur généralisation à des zones marginales ou agricoles et les limite à des sites à haute valorisation économique. Finalement, les méthodes conventionnelles satisfont relativement peu les usagers souhaitant cultiver leur sol. Elles sont d'une part trop coûteuses pour des particuliers, et d'autre part elles ne préservent pas la fertilité du sol en place, sa structure et son activité biologique.

## 2. Phytoremédiation

### 2.1. La phytoremédiation comme méthode écologique de dépollution

La phytoremédiation (aussi appelée phytotechnologies) inclut l'ensemble des techniques utilisant des végétaux pour diminuer les risques écotoxicologiques et sanitaires liés à la contamination des sols, des eaux ou des sédiments (Morel 2012). Nous ne traiterons ici que du cas des sols. Les différentes techniques associées à la phytoremédiation des sols (phytoextraction, phytostabilisation, rhizodégradation,...) peuvent se distinguer par leur objectif ultime : il s'agit soit de gérer les risques liés à une contamination sans la déplacer, soit de retirer les contaminants d'un site. Ces deux objectifs ne sont bien sûr pas opposés et peuvent parfois se combiner. La **phytostabilisation** regroupe les techniques visant à diminuer la mobilité et la diffusion des ETM dans le sol et dans les autres compartiments de l'environnement (nappe phréatique, air, faune,...) (Vangronsveld *et al.* 2009). Les végétaux peuvent limiter cette mobilité par accumulation, précipitation, dégradation par les racines ou la zone racinaire des contaminants. La **phytoextraction** vise elle à diminuer les concentrations en contaminants métalliques dans les sols, en les exportant hors d'un site dans la biomasse de plantes cultivées et récoltées à cet effet (Vangronsveld *et al.* 2009) (Figure 3). Dans ce travail, nous traiterons uniquement de la phytoextraction des ETM.



**Figure 3.** Principes de phytoextraction et de phytostabilisation avec, de gauche à droite, des espèces hyperaccumulatrices du Cd et du Zn (ex. *Noctua caerulea*) ou du Ni (ex. *Alyssum murale*) ou non hyperaccumulatrices de grande culture (ex. *Zea mays*) ou ligneuse (ex. *Salix* sp.). Les flèches verticales représentent schématiquement le prélèvement des ETM par les plantes.

La phytoextraction est souvent mise en avant comme méthode de dépollution dite écologique en comparaison des méthodes conventionnelles de traitement des sols contaminés. On peut objectiver cette réputation par plusieurs **avantages de la méthode** : 1) approche *in situ* qui ne nécessite pas de transport de terres contaminées, ni 2) de mise en décharge de celles-ci, 3) qui permet au minimum la conservation des propriétés physico-chimiques et biologiques du substrat, donc le maintien de la fertilité et encore mieux son amélioration (aération, amendement, apport de matière organique,...), 4) et qui minimise l'emploi de produits chimiques. Certaines **limites de la technique** de phytoextraction doivent toutefois être soulignées : 1) la profondeur d'action est limitée aux horizons de surface colonisés par les racines de la plante ; 2) elle n'est envisageable que pour des contaminations modérées (*e.g.* moins de 10 mg Cd kg<sup>-1</sup> et 1000 mg Zn kg<sup>-1</sup>) ; 3) les contaminants étant souvent multiples, la phytoextraction devrait parfois associer plusieurs espèces végétales voire être combinée à des microorganismes en cas de pollutions organiques ; 4) il n'existe pas encore de solution probante de phytoextraction du Pb, un des ETM les plus problématiques mais les moins mobiles ; 5) la phytoextraction est soumise aux variations du climat et de l'environnement ; 6) enfin, le temps de dépollution (se comptant en années) est nettement plus conséquent qu'avec des méthodes classiques (*e.g.* Conesa *et al.* 2012, Keller 2006, Mench *et al.* 2010, Zhao *et al.* 2003, Van Nevel *et al.* 2007).

Un nombre croissant de révisions de la littérature insiste sur le fait que la phytoextraction n'est restée jusqu'ici qu'une technique prometteuse mais qui n'a pas encore démontré son applicabilité à grande échelle (Conesa *et al.* 2012, Dickinson *et al.* 2009, Robinson *et al.* 2009, 2015). Ces études soulignent que le seul moyen de rendre la technique viable et acceptable en termes d'utilisation de sols est qu'elle soit associée à une activité économiquement rentable, c'est-à-dire pour l'essentiel de la production de biomasse ou de l'agromine (voir ci-dessous). Au-delà de ce constat, la phytoextraction peut constituer une méthode de dépollution intéressante pour de vastes surfaces caractérisées par une pollution diffuse de surface comme les sols agricoles ou encore les friches urbaines ou péri-urbaines, qui sont caractérisés par une contamination modérée et une pression d'occupation relativement faible (Dickinson *et al.* 2009, Garbisu et Alkorta 2001, Sterckeman et Puschenreiter, 2018).

## 2.2. Efficacité d'extraction et amélioration

L'efficacité de la phytoextraction est quantifiée d'une part par la masse de métaux extraite par les plantes, la **minéralomasse**, qui est le produit entre la biomasse récoltée et les concentrations en métaux dans celle-ci (Zhao *et al.* 2003). D'autre part, on peut mesurer l'efficacité de la phytoextraction par l'effet direct sur les concentrations en ETM dans l'horizon de surface du sol après récolte des plantes. Cependant, définir l'objectif de

phytoextraction sur base d'une baisse des concentrations totales en ETM sous les normes d'assainissement peut rendre le temps de remédiation extrêmement long voire irréaliste dans certains cas (Keller et Hammer 2004, Zhao *et al.* 2003, Koopmans *et al.* 2008).

Le concept de **Bioavailable Contaminant Stripping** (BCS), c'est-à-dire de remédiation des fractions biodisponibles des ETM, a donc été proposé pour repositionner l'objectif de la technique de phytoextraction (Hamon and McLaughlin 1999). La phytoextraction s'envisage alors comme une méthode de gestion des risques qui vise en priorité à diminuer les concentrations en formes disponibles des ETM dans le sol. Cela permet d'orienter l'évaluation de l'efficacité en fonction de l'usage, par exemple celui de l'accumulation des ETM par des plantes cultivées. Cette évaluation peut se faire de manières multiples – via des méthodes d'extraction chimiques, de kits de biosenseur, par gradients de diffusion sur lames minces, ou plus pragmatiquement par des cultures de plantes dites **phytomètres** (*e.g.* la laitue cultivée) qui suivent directement la phytoextraction (*e.g.* Keller et Hammer 2004, Li *et al.* 2016, 2018, Herzig *et al.* 2014). Cependant, les effets sur les concentrations disponibles peuvent être contrastés entre éléments comme l'a récemment montré un essai avec l'hyperaccumulatrice *Sedum plumbizincicola*, où la diminution de la fraction labile de Cd et Zn était accompagné d'une augmentation de celle du Cu et du Pb, des éléments non accumulés par la plante, mais en partie mobilisés dans le sol (Li *et al.* 2018). La difficulté liée à cette approche est l'incertitude sur le caractère définitif de la diminution du pool biodisponible (Keller et Hammer 2004, Koopmans *et al.* 2008). Un réapprovisionnement des fractions les plus solubles à partir de fractions moins biodisponibles suite à une phytoextraction a en effet déjà pu être démontré (Hammer et Keller 2002). Un deuxième obstacle est que la plupart des législations relatives à l'assainissement de sols se basent sur les concentrations totales et non des concentrations échangeables pour fixer des seuils réglementaires (Adriano 2001).

Par ailleurs, pour améliorer la phytoextraction, de nombreuses études se sont penchées sur **l'utilisation de chélatants** (EDTA, DTPA, EDDS, NTA) ou d'acides organiques comme l'acide citrique pour augmenter la disponibilité des ETM et ainsi augmenter le rendement d'extraction (Chen *et al.* 2004, Cooper *et al.* 1997, Evangelou *et al.* 2007, Huang *et al.* 1997, Hsiao *et al.* 2007, McGrath *et al.* 2006, Quartacci *et al.* 2007). Leurs résultats en termes d'augmentation de l'extraction ont souvent été mitigés alors que l'ajout de ces adjuvants comporte de nombreux aspects négatifs : un coût assez élevé, un risque important de contamination des eaux souterraines par lixiviation/chéluviation des ETM et la perturbation de la faune du sol et des processus biogéochimiques (Lin *et al.* 2014, Nowack *et al.* 2006, Römken *et al.* 2002). C'est pour cette raison que plusieurs auteurs ont soutenu que la

phytoextraction assistée avec des chélatants était une option à exclure (Chaney *et al.* 2007, Evangelou *et al.* 2007).

La nouvelle voie de recherche actuellement privilégiée pour augmenter l'efficacité d'extraction d'ETM est de stimuler le microbiote du sol voire d'y ajouter des microorganismes comme des champignons endomycorhiziens ou des bactéries de la rhizosphère qui stimulent la croissance de la plante (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*, PGPR). L'intérêt est d'à la fois stimuler la croissance des plantes cultivées pour la phytoextraction (meilleure acquisition des nutriments, protection contre les pathogènes) et également d'augmenter l'accumulation des ETM (effet sur la solubilisation, synthèse d'acides organiques ou de sidérophores) (Li *et al.* 2012, Gerhardt *et al.* 2017, Ullah *et al.* 2015, Weyens *et al.* 2009).

### 2.3. Filières hyperaccumulatrices et à haute biomasse

L'espèce végétale idéale pour la phytoextraction serait celle qui maximise à la fois la biomasse et les concentrations en ETM dans ses parties aériennes, mais celle-ci n'existe malheureusement pas. Deux approches de phytoextraction sont donc envisagées en parallèle : une première qui utilise des plantes à haute biomasse accumulant modérément les ETM et une seconde avec des plantes hyperaccumulatrices d'ETM (voir définitions ci-dessous) (Tableau 2).

Les **plantes à haute biomasse** communément utilisées sont des ligneux comme *Salix* sp. et *Populus* sp. et des plantes de grande culture comme *Zea mays*, *Nicotiana tabacum*, *Oryza sativa*, *Brassica rapa*, *Brassica juncea*, *Brassica napus* ou encore *Helianthus annuus* (e.g. Herzig *et al.* 2014, Kayser *et al.* 2000, Meers *et al.* 2005, Pulford et Watson 2003, Yang *et al.* 2017). Les avantages de cette filière sont la très bonne connaissance agronomique des espèces végétales et l'existence de l'itinéraire technique, l'extraction potentielle d'ETM à des profondeurs supérieures à 20 cm (dans le cas des ligneux) mais aussi la valorisation des produits de la récolte (biomasse) (Keller *et al.* 2003, Vangronsveld *et al.* 2009, Vassilev *et al.* 2004). Ces espèces sont en général tolérantes à des contaminations en ETM modérées mais les accumulent très faiblement comparé aux hyperaccumulatrices (Meers *et al.* 2005, Dickinson et Pulford 2005). Un des essais de phytoextraction du Cd les plus concluants avec une espèce non-hyperaccumulatrice a été réalisé au Japon avec un cultivar accumulateur de riz Indica (*Oryza sativa*) et a permis de diminuer en deux ans les concentrations du sol en Cd de 38 % (Murakami *et al.* 2009).

L'approche qui vise à utiliser les **plantes hyperaccumulatrices** possède à l'inverse comme inconvénient principal l'utilisation de plantes non domestiquées dont l'itinéraire de culture est inconnu. Par contre, le grand intérêt de ces espèces est leur capacité d'accumuler des ETM même à des concentrations dans le sol relativement faibles et, par ailleurs, à l'inverse des

plantes à haute biomasse, que leur croissance n'est pas affectée par des concentrations élevées en ETM (Keller *et al.* 2003, Roosens *et al.* 2003). Jusqu'ici les principales espèces hyperaccumulatrices étudiées pour développer la phytoextraction sont *Noccaea caerulescens* et *Arabidopsis halleri*, deux Brassicaceae européennes (Baker *et al.* 1994, Hammer et Keller 2003, McGrath *et al.* 2006, Robinson *et al.* 1998). Plus récemment, d'autres plantes accumulatrices découvertes en Chine ont été utilisées dans des essais de phytoextraction, dont deux Crassulaceae, *Sedum plumbizincicola* (Arnamwong *et al.* 2015, Deng *et al.* 2016, Li *et al.* 2014) et *Sedum alfredii* (Wu *et al.* 2007, Yang *et al.* 2004, Zhuang *et al.* 2007) et une Solanaceae, *Solanum nigrum* (Ji *et al.* 2011, Niu *et al.* 2015, Wang *et al.* 2015, Wei *et al.* 2005). Le caractère hyperaccumulateur de ces deux dernières espèces est cependant contestable compte tenu des faibles concentrations en Cd obtenues dans des essais de terrain.

**Tableau 2.** Potentiel de phytoextraction de différentes espèces végétales (biomasse, concentrations et minéralomasses en Cd et en Zn) évalué dans des essais de terrain pour une année ou saison de culture. Les données sont les moyennes  $\pm$  écart-type au sein des études mentionnées ; les valeurs en italiques sont indicatives (calculées sur bases de la biomasse et de la minéralomasse). Cette synthèse n'est pas exhaustive et se veut seulement indicative.

Espèce	Biomasse (t ha <sup>-1</sup> )	Cd		Zn		Références
		Conc. ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Minéralo. (g ha <sup>-1</sup> )	Conc. ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Minéralo. (kg ha <sup>-1</sup> )	
<b>Haute Biomasse</b>						
<i>Averrhoa carambola</i>	13 $\pm$ 6	10 $\pm$ 2	128 $\pm$ 56			Li <i>et al.</i> 2009
<i>Helianthus annuus</i>	24 $\pm$ 3			286 $\pm$ 52	7 $\pm$ 2	Herzig <i>et al.</i> 2014
<i>Nicotiana tabacum</i>	12 $\pm$ 0.1	17 $\pm$ 5	117 $\pm$ 80			Yang <i>et al.</i> 2017
<i>Nicotiana tabacum</i>	32 $\pm$ 5			466 $\pm$ 133	14 $\pm$ 4	Herzig <i>et al.</i> 2014
<i>Oryza sativa</i> Indica	8 $\pm$ 1	32 $\pm$ 13	267 $\pm$ 116	136 $\pm$ 63	1.1 $\pm$ 0.6	Murakami <i>et al.</i> 2009
<i>Zea mays</i>	16 $\pm$ 4	0.6 $\pm$ 0.2	9 $\pm$ 3	129 $\pm$ 30	2 $\pm$ 0.6	Keller <i>et al.</i> 2003
<i>Salix viminalis</i>	8 $\pm$ 4.5	4 $\pm$ 2	37 $\pm$ 4	740 $\pm$ 780	3 $\pm$ 0.5	Hammer <i>et al.</i> 2003
Végétation spontanée*	4.6 $\pm$ 0.4		4 $\pm$ 2		1.9 $\pm$ 0.4	Hammer et Keller 2003
<b>Pseudo-hyperaccumulatrice</b>						
<i>Solanum nigrum</i>	20 $\pm$ 3	9.8 $\pm$ 0.1	195 $\pm$ 29			Ji <i>et al.</i> 2011
<i>Sedum alfredii</i>	6	5 - 10	41 $\pm$ 16	800	4.7 $\pm$ 2.2	Wu <i>et al.</i> 2007
<b>Hyperaccumulatrice</b>						
<i>Sedum plumbizincicola</i>	4.5 $\pm$ 1.6	139 $\pm$ 38	661 $\pm$ 320	5360 $\pm$ 630	23 $\pm$ 7	Deng <i>et al.</i> 2016
<i>Noccaea caerulescens</i>	13 $\pm$ 3.8	8 $\pm$ 3.2	127 $\pm$ 56	2545 $\pm$ 1470	34	Felix 1997
<i>Noccaea caerulescens</i>	0.9 $\pm$ 0.2	184 $\pm$ 38	179 $\pm$ 79	5265 $\pm$ 612	5 $\pm$ 1.7	Keller <i>et al.</i> 2003
<i>Noccaea caerulescens</i>	2.1 $\pm$ 0.2	257 $\pm$ 60	539 $\pm$ 127	9500 $\pm$ 2000	20 $\pm$ 4	Hammer et Keller 2003
<i>Noccaea caerulescens</i>	2.1 $\pm$ 0.9	760 $\pm$ 470	1660 $\pm$ 1380	7670 $\pm$ 1660	16 $\pm$ 8	McGrath <i>et al.</i> 2006
<i>Noccaea caerulescens</i>	2.5	124	312	980	2.5	Maxted <i>et al.</i> 2007
<i>Noccaea caerulescens</i>	1.2 $\pm$ 0.7	2370 $\pm$ 1210	2730 $\pm$ 1840	6090 $\pm$ 4680	6.6 $\pm$ 4.5	Tlustoš <i>et al.</i> 2016

\* *Galinsoga quadriradiata*, *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album*



Plusieurs études ont tenté de comparer l'efficacité de phytoextraction avec à la fois des espèces hyperaccumulatrices et des plantes à haute biomasse : alors que certaines ont soit supposé (Chaney *et al.* 1997) soit démontré un avantage net des plantes hyperaccumulatrices (Keller *et al.* 2003, Zhuang *et al.* 2007), d'autres n'ont pas montré de différence majeure entre les deux types de plantes (Fischerova *et al.* 2006, Kayser *et al.* 2000, Broadhurst *et al.* 2015). Bien qu'au cas par cas, l'avantage relatif des deux filières soit variable, une synthèse de 87 études a mis en évidence une tendance nette selon laquelle la filière hyperaccumulatrice est en moyenne près de deux fois plus efficace pour l'extraction du Cd que la filière à haute biomasse (Li *et al.* 2012).

#### 2.4. Valorisation de la biomasse, recyclage des ETM et agromine

Un des inconvénients majeurs de la phytoextraction est la durée de remédiation longue (plusieurs années) qui est un paramètre déterminant de la viabilité du processus. Plusieurs possibilités de valorisation s'offrent pour « rentabiliser » l'occupation des sols par la phytoextraction : la valorisation de la biomasse produite, le recyclage des ETM extraits ou simplement l'apport intrinsèque de services écosystémiques et sanitaires qui ont en soi une valeur économique.

La valorisation des terres cultivées par la production de biomasse est surtout valable pour des plantes à haute biomasse. Les filières potentielles sont la production de bois, de biochar ou de bioénergies (Conesa *et al.* 2012). Il existe cependant une incertitude (liée à la législation et aux coûts) sur la possibilité actuelle de traitement et de valorisation de biomasse issue de phytoextraction par des installations existantes de traitement de la biomasse (Bert *et al.* 2017b). Avec des installations de combustion équipées de filtres performants, la valorisation de la biomasse pour la bioénergie est possible, mais la question du devenir des cendres volantes et résiduelles reste à élucider (Delplanque *et al.* 2013)

Le devenir des ETM extraits et récoltés dans la biomasse des plantes est à la fois un enjeu important de la phytoextraction mais également une opportunité de valorisation. La voie la plus « simple » est la mise en décharge de la biomasse contaminée qui occuperait déjà un volume moins grand que les terres excavées. Cependant, afin de proposer un réel processus circulaire de dépollution d'un sol –et non un processus linéaire– certaines équipes de recherche étudient la possibilité de recycler les métaux de la biomasse des plantes et de les valoriser en tant que métaux d'origine végétale.

La valorisation du nickel est la voie la plus prometteuse et la plus aboutie à ce jour, notamment dans le cadre du projet Agromine de valorisation des sols ultramafiques pour produire des sels de Ni (Nti Nkruma *et al.* 2016, Simonnot *et al.* 2018). L'agromine, aussi appelée phytomine, est l'exploitation de gisements de surface de métaux – généralement

secondaires, multicontaminés ou faibles – par extraction par des plantes accumulatrices et leur valorisation en minerai d'origine végétale pour des utilisations industrielles (Van der Ent *et al.* 2015). C'est une suite logique à la phytoextraction dans une optique de rentabilité mais surtout de fermeture du cycle de récupération des ETM. Pour l'instant, seule la récupération du Ni est appliquée avec succès par cette voie (Chaney *et al.* 2018).

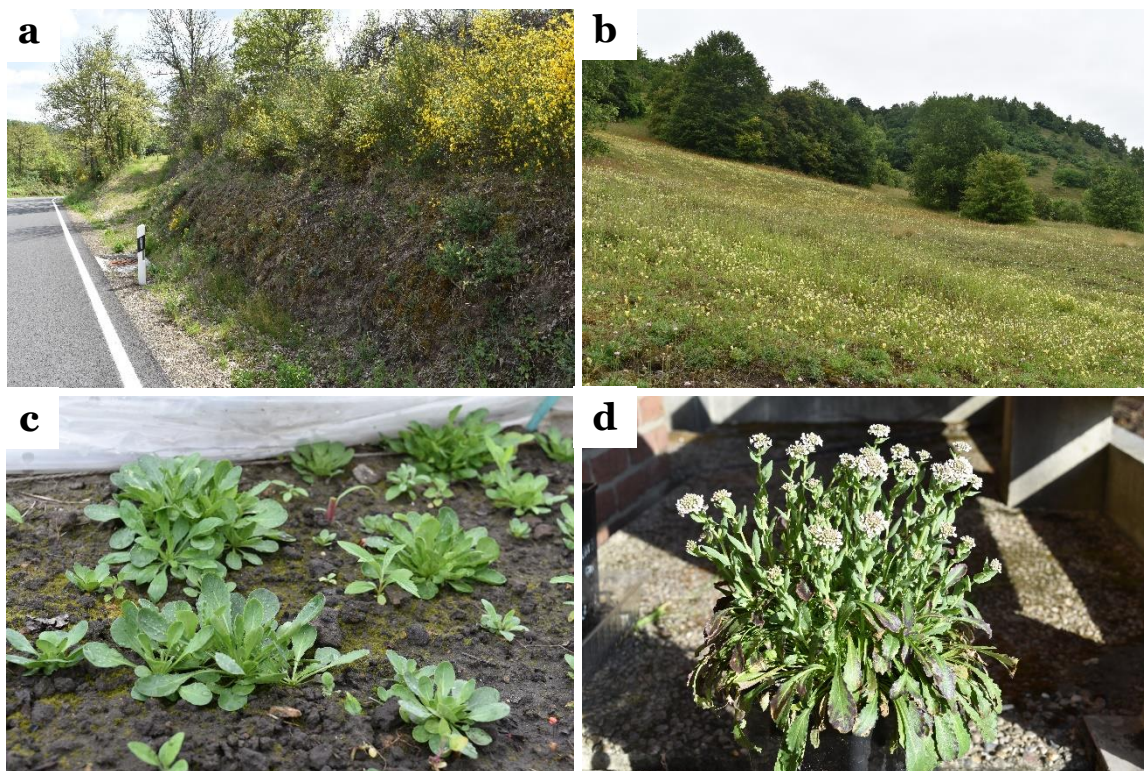
Le Cd et le Zn seraient des ETM plus difficilement valorisables via l'agromine car ils ont une faible valeur marchande. Pour le Cd et le Zn, Keller *et al.* (2005) ont montré que la pyrolyse était une méthode de traitement possible, pour récupérer le Cd et le Zn de la biomasse de *N. caerulescens* et réutiliser les cendres restantes comme fertilisant. Par ailleurs, plusieurs équipes ont proposé des procédés de recyclage du Zn et ou du Cd contenus dans des plantes de *N. caerulescens* via des écocatalyseurs acides de Lewis (Escandé *et al.* 2014, Losfeld *et al.* 2012) ou par hydrométallurgie (Hazotte *et al.* 2017). Deyris *et al.* (2018) ont également démontré la faisabilité de fabriquer des écocatalyseurs polymétalliques à partir de biomasse contaminée d'*A. halleri* et de *Salix "Tordis"* (*Salix schwerinii* × *Salix viminalis*). Les débouchés potentiels de ces produits seraient l'industrie chimique, pharmaceutique ou cosmétique et constitueraient ainsi une voie prometteuse de recyclage des ETM extraits avec les plantes hyperaccumulatrices.

### 3. *Noccaea caerulescens* - De l'hyperaccumulation à la phytoextraction

#### 3.1. Cycle de vie, écologie et distribution

*Noccaea caerulescens* est une espèce herbacée de la famille des Brassicaceae (Fig. 4). Le **cycle de vie** de *N. caerulescens* commence par la germination des graines qui a lieu en deux cohortes principales dans les populations d'Europe occidentale (Belgique, Luxembourg, France) : la principale à la fin de l'été ou au début de l'automne et la seconde au printemps (Dubois 2005, Dechamps *et al.* 2011). La plantule forme une rosette de feuilles basales, avant d'initier la floraison à la fin de l'hiver ou au début du printemps en formant une ou plusieurs hampes florales à maturation acropète portant des fleurs blanches ou rosâtres. La durée de la période pré-reproductive varie selon l'environnement et la zone géographique, allant de quelques mois (annuelle d'hiver) à plus d'un an (bisanuelle) ou même deux ans (pérenne à courte durée de vie ; Dechamps *et al.* 2011). *N. caerulescens* ne présente pas d'auto-incompatibilité (Riley 1956) et a un système de reproduction mixte entre autogamie stricte et allogamie (Dubois *et al.* 2003, Besnard *et al.* 2009, Mousset *et al.* 2016). Lors de la fructification (silicules), les feuilles basilaires meurent et l'intégralité des ressources est allouée à la formation des graines qui sont matures à la fin du printemps. Selon les

environnements et les zones géographiques, les individus sont monocarpiques à cycle de vie annuel ou bisannuel, ou polycarpiques à courte durée de vie et fleurissent alors deux années successives (Dubois 2005, Dechamps *et al.* 2011). Un facteur qui semble influencer le cycle de vie de manière déterminante est le niveau de stress, notamment la sécheresse, auquel sont soumises les plantes : dans les sites métallifères à végétation rase fortement exposés au soleil et dans les sites du Sud de la France, le cycle dominant est annuel ; dans les sites non métallifères du Luxembourg et dans les zones boisées des sites métallifères, la plupart des individus sont bisannuels (Dechamps *et al.* 2011).



**Figure 4.** Exemples de sites d'origine de *N. caerulescens*, au Grand-Duché de Luxembourg (Wilwerwiltz, population non-métallicole) (a) et dans l'est de la Belgique (Prayon, population métallicole) (b) et individus cultivés, au stade de rosette (c) et de floraison (d).

*N. caerulescens* pousse naturellement dans trois types d'environnement contrastés, correspondant chacun à un écotype, c'est-à-dire à un ensemble des populations adaptées à l'environnement donné : deux **écotypes métallicoles** qu'on trouve sur des sols calaminaires (CAL) (enrichis en Zn, Cd et Pb) et des sols serpentiniques (SERP) (sols ultramafiques enrichis en Ni et Mg) et un **écotype non-métallicole** (NMET) que l'on retrouve sur des sols non-métallifères. Les plantes capables de coloniser des sites métallifères sont appelées **métallophytes**. *N. caerulescens* est considérée comme une métallophyte facultative, ou pseudométallophyte, étant donné qu'elle est capable de vivre à la fois sur des sols métallifères et des sols non-métallifères (Pollard *et al.* 2002, 2014).

Les **sols métallifères** sont enrichis en ETM qui peuvent être d'origine naturelle ou anthropique. Les sols métallifères naturels, dits primaires, se sont développés sur des affleurements rocheux particulièrement riches en certains ETM, sont souvent isolés géographiquement et pourraient avoir été les premiers habitats où a eu lieu la colonisation par des espèces végétales tolérantes. Parmi les **sites calaminaires**, quelques-uns constituent des affleurements primaires non influencés par l'activité humaine, mais la majorité est d'origine anthropique et est généralement située à proximité de sites d'extraction, de transformation ou de traitement des minerais et ETM (Graitson 2005). À l'inverse, les **sites serpentiniques**, moins nombreux que les sites calaminaires, sont presque tous naturels (Reeves *et al.* 2001, Gonneau *et al.* 2017). Dans les sols calaminaires, les concentrations totales en ETM sont extrêmement élevées et varient de 10 à 500 mg **Cd** kg<sup>-1</sup>, entre 1000 et 60 000 mg **Zn** kg<sup>-1</sup> (parfois jusqu'à 100 000 mg Zn kg<sup>-1</sup>) et de 1000 à 30 000 mg **Pb** kg<sup>-1</sup> (jusqu'à plus de 150 000 mg Pb kg<sup>-1</sup> dans les cas extrêmes) (Escarré *et al.* 2011, Reeves *et al.* 2001). Les sols serpentiniques présentent eux des concentrations extrêmes en nickel pouvant aller jusqu'à 2500 mg Ni kg<sup>-1</sup> (Chardot *et al.* 2007, Reeves *et al.* 2001).

La plupart des **sites non-métallifères** sont situés dans des massifs de moyenne et haute montagne : Ardennes, Vosges, Jura, Massif Central, Alpes et Pyrénées (Basic *et al.* 2006, Besnard *et al.* 2009, Molitor *et al.* 2005, Reeves *et al.* 2001, Sirguy *et al.* 2018). On retrouve fréquemment les populations non-métallicoles dans des stations soumises à l'influence anthropique, sur des talus forestiers ou de bord de route et dans des pelouses et pâtures mésotrophes, souvent sur des substrats peu profonds et relativement rocailleux ou caillouteux (Basic *et al.* 2006, Molitor *et al.* 2005, Sirguy *et al.* 2018).

Sa **distribution** s'étend dans toute l'Europe nord-occidentale et centrale, depuis la Norvège jusqu'au nord de l'Italie et de l'Espagne et de la Grande-Bretagne jusqu'à l'est de la Pologne. Les populations de *N. caerulea* sont distribuées sur une large gamme d'altitudes allant de moins de 100 m dans de rares cas jusqu'à des stations à plus de 2000 m dans les Alpes ou les Pyrénées, l'essentiel des stations se trouvant cependant entre 300 m et 1500 m (Gonneau *et al.* 2017). On peut la qualifier d'espèce alpine ou subalpine étant donné sa distribution – en Europe de l'Ouest – essentiellement restreinte aux massifs de moyenne et haute montagne. Présentant une large variation de phénotypes, l'espèce *N. caerulea* est taxonomiquement très complexe, notamment dû à la possible existence de plusieurs sous-espèces et à la proximité morphologique avec l'espèce congénérique *N. brachypetala* (Koch et German 2013). Beaucoup d'espèces de *Noccaea* étaient d'ailleurs encore incluses dans le genre *Thlaspi* jusqu'aux révisions de Meyer dans les années 1970 (Meyer 1973 et 1979) et le changement de genre ne fut réellement adopté par la communauté scientifique que lors de la dernière révision (Meyer 2006). Il est convenu actuellement que *N. caerulea* est séparée

en deux sous-espèces, l'une en Europe de l'Ouest (sous-espèce *sylvestris*) et l'autre en Europe de l'Est (sous-espèce *caerulescens*) (Koch et German 2013, Meyer 2006). Beaucoup d'autres espèces du genre *Noccaea*, comme *N. praecox* ou *N. goesingense*, sont aussi des métalophytes accumulant le Zn et/ou le Ni (Koch et German 2013, Krämer 2010).

### 3.2. Tolérance et hyperaccumulation des ETM

#### Définitions

*N. caerulescens* est constitutivement tolérante et hyperaccumulatrice de Cd, Zn et/ou Ni, en fonction des populations (voir 3.3) (Assunção *et al.* 2003b, Escarré *et al.* 2000, Meerts et Van Isacker 1997, Reeves *et al.* 2001). Toutes les populations de *N. caerulescens*, y compris les non-métallicoïdes, sont plus tolérantes aux ETM que des plantes normales comme *Arabidopsis thaliana*.

Les plantes adaptées à l'environnement métallifère se caractérisent par le trait de **tolérance** aux ETM du sol, qui est la capacité d'une espèce à y pousser et donc à tolérer des concentrations en ETM dans le sol anormalement élevées et est estimée par la production de biomasse aérienne (Macnair 2003, Pollard 2002). La stratégie de tolérance la plus répandue est celle de l'exclusion des ETM, qui minimise leur transfert dans les organes aériens, en les stockant par exemple dans les vacuoles des

cellules racinaires (Baker 1981, Macnair 2003). La seconde stratégie de tolérance est l'hyperaccumulation, c'est-à-dire la capacité d'une espèce à accumuler les ETM à des concentrations très élevées (voir ci-dessous) dans ses parties aériennes (Antonovics *et al.* 1971, Baker 1981). Ces espèces de plantes, dites **hyperaccumulatrices**, accumulent des métaux ou métalloïdes dans leurs parties aériennes entre 10 et 1000 fois plus que d'autres espèces proches phylogénétiquement, dites normales. Près de 720 espèces de plantes hyperaccumulatrices ont été identifiées d'après la base de données la plus récente (septembre 2017), dont plus de 500 sont des accumulatrices de Ni contre seulement 7 pour le Cd, avec

Le terme **hyperaccumulation** a été redéfini dans une révision de Van der Ent *et al.* (2013). Initialement introduit par Brooks *et al.* (1977) pour décrire des espèces accumulant plus de 1000  $\mu\text{g g}^{-1}$  de Ni dans leurs feuilles (en matière sèche), le terme est relativement flou et arbitraire s'il se contente de valeurs seuils. Van der Ent *et al.* (2013) ont donc proposé de réserver le statut d'hyperaccumulatrices aux plantes satisfaisant les conditions suivantes : un niveau d'accumulation i) 2 à 3 ordres de magnitude plus grand que dans les plantes poussant sur sols normaux et ii) au moins un ordre de magnitude plus grand que sur des plantes non accumulatrices sur sols métallifères ; un facteur de bioconcentration  $>1$ , un ratio concentrations aériennes/racinaires  $>1$  et une hypertolérance aux métaux démontrée par des mécanismes de détoxification.

une importante proportion d'espèces appartenant à la famille des Brassicaceae (83 espèces) (Krämer *et al.* 2010, Reeves *et al.* 2018, Van der Ent *et al.* 2013). On peut s'attendre à ce que ce nombre continue d'augmenter avec la poursuite des prospections au Brésil, en Nouvelle Calédonie et en Asie du Sud-Est notamment et l'avènement de nouvelles technologies analytiques comme la fluorescence par rayons X (XRF) (Reeves *et al.* 2018).

L'avantage sélectif d'hyperaccumuler des métaux reste aujourd'hui globalement peu compris. L'hyperaccumulation engendre en effet un coût lié à la prise en charge et la détoxification des métaux qui doit a priori être compensé par un avantage sélectif. Les conditions de sécheresse et de faible disponibilité en nutriments sur les sites métallifères engendrent un coût supplémentaire de tolérance écologique pour les métallophytes (Ernst *et al.* 2006). L'hypothèse la plus probable est celle de la tolérance accrue aux ETM, bien qu'elle n'ait jamais été démontrée formellement (Macnair 2003). Une autre hypothèse largement véhiculée dès les premières études sur le sujet (Boyd et Martens 1992) et récemment révisée (Hörger *et al.* 2013) est celle de la défense contre les herbivores et/ou les pathogènes qui serait la raison d'être de l'accumulation. Il a récemment été montré dans le cas de *N. caerulescens* que l'hyperaccumulation a un effet direct sur la résistance aux maladies bactériennes et que les bactéries endophytes (*Pseudomonas sp.*) qui colonisent les feuilles de *N. caerulescens* montrent des signes d'adaptation et de tolérance aux hautes concentrations en Zn (Fones *et al.* 2010, 2013, 2016). Ces études ne permettent cependant pas de démontrer une adaptation et donc un avantage sélectif, mais montrent simplement que les gènes de réponse aux pathogènes sont régulés à la baisse chez les populations métallicoles de *N. caerulescens*, probablement expliquée par le relâchement de la pression biotique sur sols métallifères (Ernst *et al.* 1990, Noret *et al.* 2007). L'hypothèse de la résistance aux herbivores suscite donc toujours le débat, plusieurs études ayant montré des résultats contradictoires. Les hautes concentrations en Zn dans les feuilles de *N. caerulescens* ne les protègent par exemple pas des herbivores (Noret *et al.* 2005, 2007 ; Jacobs *et al.* 2017), ni des pathogènes (études de terrain, Jacobs *et al.* 2018a). Les autres hypothèses possibles seraient la résistance au stress hydrique, l'allélopathie, c'est-à-dire une protection contre les autres plantes compétitrices, ou encore le prélèvement indirect (Macnair 2003).

### ***Physiologie et mécanismes moléculaires de l'hyperaccumulation***

Ce sont les deux espèces hyperaccumulatrices de Cd et de Zn *N. caerulescens* et *A. halleri* qui ont été rapidement choisies comme espèces modèles pour l'étude des mécanismes moléculaires de l'hyperaccumulation (Assunção *et al.* 2003a), vu leur proximité phylogénétique avec *A. thaliana*, avec qui *N. caerulescens* partage 88 % de séquence de nucléotides des régions codantes (Peer *et al.* 2003, 2006). La compréhension actuelle des mécanismes moléculaires de l'hyperaccumulation du Cd et du Zn ont été résumés de manière

extensive par Verbruggen *et al.* (2009), Krämer *et al.* (2010), Hanikenne et Nouet (2011) et Merlot *et al.* (2018). L'hyperaccumulation est un processus complexe impliquant plusieurs étapes : i) l'absorption racinaire (épiderme) et le transport radial à travers le cortex et l'endoderme vers les tissus conducteurs, ii) le chargement du xylème et la translocation vers les parties aériennes et iii) la séquestration vacuolaire dans les cellules de destination (tissus).

Les études moléculaires ont permis de montrer que les gènes impliqués dans l'hyperaccumulation ne sont pas spécifiques aux espèces hyperaccumulatrices mais sont en fait différemment régulés et/ou présents en de plus nombreuses copies. Voici ce que nous connaissons actuellement concernant les gènes impliqués dans ces 3 étapes (résumé dans la Figure 5) :

i) Absorption racinaire et transport radial :

Les protéines de la famille **ZIP (Zinc-regulated transporter, Iron-regulated transporter Protein)**, codées par les gènes ZNT1 et ZNT2 surexprimés dans les racines de *N. caerulescens*, sont des transporteurs membranaires des cellules du cortex de l'endoderme et du péri-cycle, qui permettraient un plus grand influx racinaire, moins de séquestration dans les vacuoles des cellules racinaires et un transport accru du Zn et du Cd vers le xylème (Lasat *et al.* 1996, Lin *et al.* 2016, Pence *et al.* 2000).

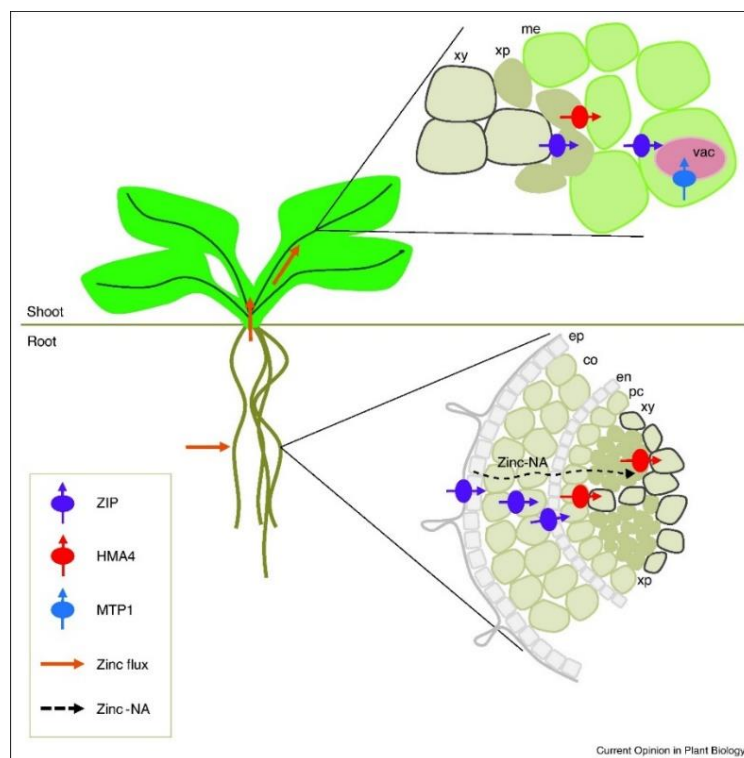
ii) Chargement du xylème et translocation vers les parties aériennes :

Le gène **HMA4 (Heavy Metal ATPase 4)** codant pour une ATPase membranaire, exprimé essentiellement dans les cellules du xylème et parenchyme racinaire, permet un chargement accru du xylème en Cd et Zn, mais également au déchargement et à la distribution vers les sites de stockage car il est aussi exprimé au niveau de la tige (Mishra *et al.* 2017). L'abondance de transcrits, fortement augmentée par rapport à *A. thaliana*, est due à une triplication voire une quadruplication du gène et à une plus grande expression liée à des promoteurs plus forts (Craciun *et al.* 2012, Hanikenne *et al.* 2008, Lochlainn *et al.* 2011). Par ailleurs, il est hautement probable que des **chélatants** soient impliqués dans les mécanismes d'hyperaccumulation (transport et détoxification) mais aucun schéma précis n'a encore pu être mise en évidence jusqu'ici (Callahan *et al.* 2006, Haydon et Cobbet 2007, Salt *et al.* 1999). L'histidine joue un rôle dans le transport racinaire du Zn et/ou le chargement du xylème (Kozhevnikova *et al.* 2014), tandis que la nicotianamine est impliquée dans le transport intercellulaire du Zn et sa détoxification au sein des cellules du mésophylle (Schneider *et al.* 2013).

iii) Séquestration vacuolaire dans l'épiderme et le mésophylle foliaire :

Enfin, **MTP1 (Metal Tolerance Protein 1)** code pour un transporteur vacuolaire de Zn et grâce à un niveau de transcrits bien plus élevé chez *A. halleri* et *N. caerulescens* que chez *A.*

*thaliana*, il permettrait la séquestration active du Zn dans les vacuoles de l'épiderme foliaire (Assunção *et al.* 2001a, Gustin *et al.* 2009, Milner et Kochian 2008). Il a été montré que le citrate et le malate forment des complexes labiles avec le Zn dans les vacuoles des cellules de l'épiderme foliaire (Schneider *et al.* 2013).



**Figure 5.** Mécanismes d'hyperaccumulation et de tolérance du Zn chez *A. halleri* et *N. caerulescens*, selon l'état des connaissances synthétisées par Hanikenne et Nouet (2011). Trois familles de transporteurs majeurs sont identifiées : les protéines ZIP (ZNT1 et ZNT2), les ATPases HMA4 et les transporteurs vacuolaires MTP1. co: cortex, en: endoderme, ep: épiderme, me: mésophylle; Zinc-NA: chélates zinc-nicotianamine, pc: péricycle, vac: vacuole, xp: parenchyme xylémique, xy: xylème.

### 3.3. Variations génétiques et phénotypiques entre populations

*N. caerulescens* présente une grande variation intraspécifique de la tolérance et de l'hyperaccumulation du Cd et du Zn. La variation quantitative de ces deux traits entre écotypes CAL, SERP et NMET a été mesurée dans de nombreuses études, sur le terrain ou en conditions contrôlées, en hydroponie ou sur du sol artificiellement ou naturellement contaminé (Assunção *et al.* 2003b, Escarré *et al.* 2000, 2013, Gonneau *et al.* 2014, Meerts et van Isacker 1997, Roosens *et al.* 2003).

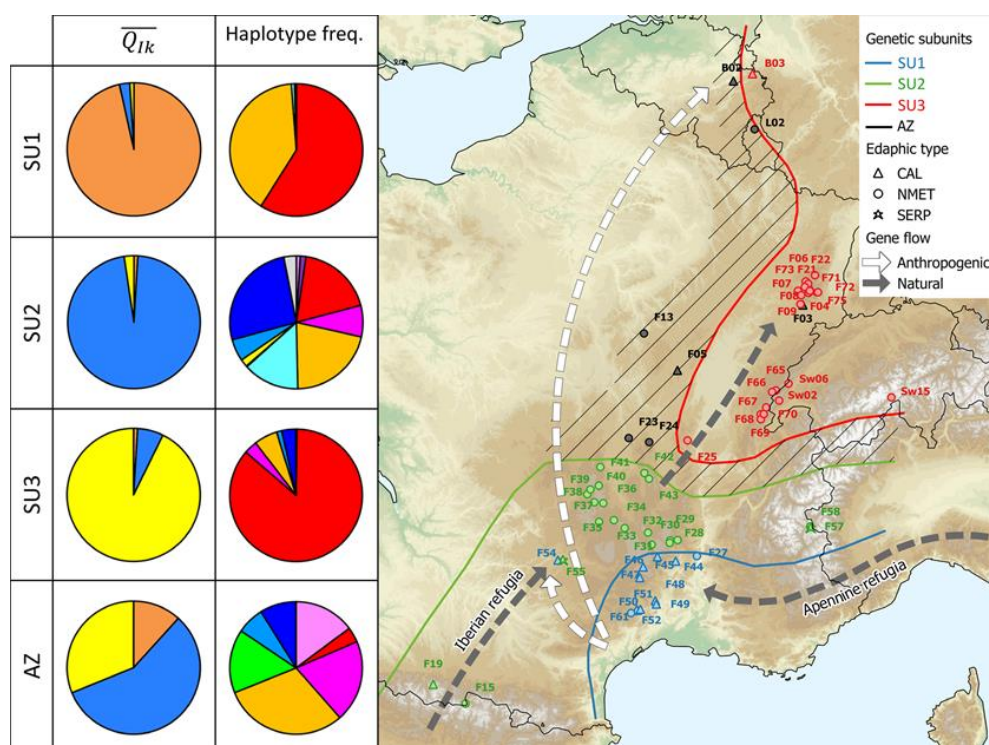
De manière générale, les populations NMET sont moins tolérantes aux ETM que les populations CAL ou SERP (Escarré *et al.* 2000, Meerts et van Isacker 1997) ; les populations SERP ne sont cependant tolérantes qu'au Ni et ne tolèrent ni le Zn, ni le Cd. En ce qui concerne l'hyperaccumulation des métaux, les populations NMET accumulent plus de Zn et de Ni que les populations CAL (Escarré *et al.* 2000, Meerts et van Isacker 1997). A l'inverse,



pour le Cd, les populations CAL du Sud de la France (CAL-SF), ont les niveaux d'accumulation les plus élevés, au-delà de 1000  $\mu\text{g g}^{-1}$  (Lombi *et al.* 2001a, Robinson *et al.* 1998) ce qui n'est pas le cas pour les autres populations CAL qui ont des niveaux d'accumulation similaires à ceux des populations NMET (max 300  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) (Dechamps *et al.* 2005, Sterckeman *et al.* 2017).

D'un point de vue génétique, certaines différences ont pu être partiellement expliquées au niveau moléculaire. Comme par exemple les niveaux exceptionnels d'accumulation du Cd chez les populations de St-Félix-de-Pallières et Ganges (CAL-SF) qui sont liés à un plus grand nombre de copies du gène HMA4 : 4 pour ces deux populations, 3 pour Prayon (CAL) et 2 pour la population serpentinique de Puente Basadre (Craciun *et al.* 2012, Lochlainn *et al.* 2011). Par ailleurs, dans une large caractérisation de l'expression des gènes potentiellement impliqués dans la tolérance et l'hyperaccumulation pour trois accessions contrastées (Ganges (CAL-SF), La Calamine (CAL) et Monte Prinzera (SERP)), Halimaa *et al.* (2014) ont notamment mis en évidence une plus faible expression de HMA4 chez la population SERP, expliquant la plus faible tolérance et accumulation de celle-ci, mais cependant pas chez la population CAL. Enfin, Frérot *et al.* (2003) ont suggéré via des croisements entre MET et NMET que la différence d'hyperaccumulation du Zn est héritable, potentiellement par un système monogénique dont l'allèle dominant est celui de la restriction du Zn (pop MET) et l'allèle récessif est celui de l'augmentation de l'hyperaccumulation du Zn (pop NMET).

L'étude de la **structure génétique** et de l'**histoire évolutive** des populations de *N. caerulescens* en Europe occidentale, qui a progressé grâce au travail de Gonneau *et al.* (2017), permet également d'expliquer ces variations entre populations. Leur étude a permis de mettre en évidence trois sous-unités génétiques cohérentes géographiquement et phénotypiquement en ce qui concerne la singularité des populations CAL-SF (Figure 6). Le scénario évolutif le plus probable est celui d'une isolation initiale au dernier maximum glaciaire (~30 000 ans) des populations situées au sud du Massif Central (SU1 dont font partie les CAL-SF, Figure 6), suivie d'une séparation des deux autres sous unités (SU2 et SU3) au nord du Massif Central à la période postglaciaire (~10 000 ans). Ces résultats suggèrent que la division en sous-unités existait déjà avant la colonisation et l'adaptation aux sites métallifères d'origine anthropique. Il y aurait donc eu plusieurs évènements distincts de colonisation des sites métallifères et donc une convergence phénotypique entre sous-unités.



**Figure 6.** Carte synthétique (A) des graphes de répartition des coefficients de pools de gènes nucléaires et de fréquences d'haplotypes de chaque sous-unité et (B) de la distribution géographique de populations de *N. caerulescens* en Europe de l'Ouest, en fonction du type édaphique et de la sous-unité géographique identifiée. Trois sous-unités distinctes (SU1, 2, 3) y sont identifiées ainsi qu'une zone de mélange entre celles-ci (*Admixture Zone*, AZ). Les potentielles routes de colonisation postglaciaire ou d'origine anthropogénique sont indiquées en fonction des scénarios démographiques et du niveau de mélange entre sous-unités (Gonneau *et al.* 2017).

Par ailleurs, entre populations d'un même écotype et d'une même sous-unité génétique, les variations d'accumulation de Cd et Zn peuvent encore être très importantes. Parmi 8 populations non-métalliques luxembourgeoises, Molitor *et al.* (2005) ont montré que l'accumulation du Cd et du Zn sur des sols artificiellement contaminés variaient d'un facteur deux (Cd, 180–330 mg kg<sup>-1</sup> ; Zn, 8000–16000 mg kg<sup>-1</sup>). Sirguy *et al.* (2018) ont également mis en évidence de fortes variations de teneurs foliaires en Zn *in situ* (entre 2000 et 14 000 mg kg<sup>-1</sup>) parmi 29 populations non-métalliques des Vosges. Cette variabilité élevée a incité plusieurs chercheurs à réaliser des phénotypages en conditions contrôlées d'un grand nombre de populations de *N. caerulescens* afin de potentiellement identifier des cultivars pour la phytoextraction (Escarré *et al.* 2013, Gonneau *et al.* 2014, Sterckeman *et al.* 2017). Cela a notamment permis de montrer qu'il n'y aurait pas de trade-off entre la production de biomasse et la teneur en ETM chez les populations calaminaires et non-métalliques (Gonneau *et al.* 2014, Sterckeman *et al.* 2017).

Enfin, d'autres variations phénotypiques entre écotypes méritent d'être soulignées. Comme introduit ci-dessus (3.1), *N. caerulescens* présente un cycle de vie variable : dans le Sud de la France les plantes (CAL et NMET) sont majoritairement annuelles, tandis qu'en Belgique et au Luxembourg, seules les plantes CAL sont principalement annuelles, les NMET étant plutôt

bisannuelles (Dechamps *et al.* 2011, Jiménez-Ambriz *et al.* 2007). Ce cycle de vie semble cependant plastique chez les CAL alors qu'il est fixé chez les NMET (Dechamps *et al.* 2007, 2008). Les NMET produisent aussi moins de biomasse et d'inflorescences, ont un ratio racines-tige plus faible, fleurissent plus tard (période pré-reproductive plus longue), accumulent plus de Zn et Ni et ont des teneurs plus élevées en Ca et Mg que les populations calaminaires (Dechamps *et al.* 2005, Dechamps *et al.* 2011, Sterckeman *et al.* 2017). Plusieurs études ont démontré l'existence chez les populations CAL et NMET de *root foraging*, une sélectivité racinaire spécifique de *N. caerulescens* qui est capable de faire proliférer ses racines dans des zones du sol plus concentrées en métaux, à la fois pour le Cd et pour le Zn, augmentant ainsi leur efficacité d'accumulation (Dechamps *et al.* 2008, Schwartz *et al.* 2003, Whiting *et al.* 2000). Dechamps *et al.* (2008) ont cependant montré que le *root foraging* pour le Zn était dépendant des conditions de croissance chez les CAL (et pas pour les NMET) et que seules les CAL étaient capables de *root foraging* pour le Ni.

### 3.4. Phytoextraction avec *N. caerulescens*

Nous avons déjà abordé dans cette introduction le concept de phytoextraction avec des plantes hyperaccumulatrices. *N. caerulescens* a rapidement été considérée comme une plante prometteuse pour le développement de cette méthode à cause de ses capacités exceptionnelles d'accumulation du Cd, du Zn et du Ni (Baker *et al.* 1994, Cunningham et Ow 1996). Beaucoup d'études ont alors commencé à évaluer le potentiel de la phytoextraction avec *N. caerulescens* sur des sols naturellement ou artificiellement contaminés en pots ou sur le terrain. Il faut noter la forte différence entre essais en pots et essais de terrain. Ainsi, parmi 18 essais en pots et 7 essais de terrain, le pourcentage de Cd extrait avec *N. caerulescens* est en moyenne 6 fois plus élevé en pots (Li *et al.* 2012). On peut en partie attribuer cette différence aux plus faibles biomasses généralement obtenues sur le terrain (aléas climatiques, ravageurs et pathogènes, suivi de culture plus complexe,...) et à la nature hétérogène et généralement moins biodisponible de la contamination du sol en ETM sur le terrain (Li *et al.* 2012, Robinson *et al.* 2006).

Dans une synthèse récente, Sterckeman et Puschenreiter (2018) ont fait l'état de l'art des essais de phytoextraction du Cd sur le terrain avec *N. caerulescens* et d'autres plantes. Une quinzaine d'essais de phytoextraction en champ avec *N. caerulescens* ont été entrepris depuis le début des années 90, au Royaume-Uni (Baker *et al.* 1994, Felix 1997, McGrath *et al.* 1993, 2000, 2006, Maxted *et al.* 2007), aux Etats-Unis (Brown *et al.* 1995), en France (Schwartz *et al.* 2003, Rees 2014, Lovy 2012), en Suisse (Hammer et Keller 2003, Keller et Hammer 2004, Keller *et al.* 2003, Felix 1997, Kayser *et al.* 2000) et en Thaïlande (Simmons *et al.* 2015). Tous les essais se sont faits sur sols agricoles contaminés par l'ajout d'amendements (boues d'épuration, compost, fumier) ou par des dépôts atmosphériques émis par des usines

métallurgiques ou par l'activité minière. Aucun essai n'a jusqu'ici encore été réalisé sur sol urbain ou industriel. L'efficacité globale d'extraction de ces essais est hautement variable et, parmi les études qui évaluent la diminution relative dans le sol, l'ordre de grandeur moyen est autour des 5-10 % de diminution des concentrations totales en Cd dans les 20 à 30 premiers cm du sol après une récolte (McGrath *et al.* 2006, Schwartz *et al.* 2003, Lovy 2012), jusqu'à 20-25 % dans deux essais (McGrath *et al.* 2006, Rees 2014).

Les enjeux majeurs du cycle de phytoextraction avec *N. caerulescens* peuvent être résumés sur base des essais de terrain déjà réalisés. Les **populations** qui ont été utilisées sont toutes calaminaires, initialement Prayon dans les premiers essais (Baker *et al.* 1994, Brown *et al.* 1995, Felix 1997, Hammer et Keller 2003, McGrath *et al.* 1993, 2000, Schwartz 1997) et ensuite « Ganges » essentiellement, suite à la mise en évidence de ses capacités exceptionnelles d'accumulation du Cd (Hammer et Keller 2003, McGrath *et al.* 2006, Maxted *et al.* 2007, Rees 2014, Robinson *et al.* 1998). Quelques autres populations calaminaires ont été utilisées de manière occasionnelle : Whitesike (Baker *et al.* 1994), Viviez (Schwartz 1997, Lovy 2012, Simmons *et al.* 2015) et trois autres populations des Cévennes (Saint-Félix-de-Pallières, Les Malines, La Sanguinède) (Simmons *et al.* 2015). Aucune population NMET n'a par contre été utilisée dans des essais de phytoextraction.

La **conduite de culture** est relativement disparate entre les essais : densité de repiquage (50 ou 100 plantes m<sup>-2</sup>), saison de plantation (souvent au printemps, plus rarement à la fin de l'été ou en automne) et durée de croissance sont assez variables (Hammer et Keller 2003, McGrath *et al.* 2006, Maxted *et al.* 2007). La majorité des essais a été mené sans vernalisation avec entre deux et cinq mois de croissance au printemps et au début de l'été (Baker *et al.* 1994, Brown *et al.* 1995, Felix 1997, McGrath *et al.* 2000, Rees 2014). Quelques essais plus longs (6-14 mois) avec parfois une installation avant l'hiver ont été réalisés (McGrath *et al.* 2006, Lovy 2012). C'est donc sans surprises que beaucoup d'études et synthèses de la littérature concluent que les besoins majeurs en termes de recherche concernent les pratiques culturales, notamment la fertilisation, l'irrigation, la gestion des adventices et des ravageurs ou encore la durée de croissance (Koopmans *et al.* 2008, Li *et al.* 2012, Maxted *et al.* 2007, McGrath *et al.* 2006, Vangronsveld *et al.* 2009)

Un autre enseignement important des essais de phytoextraction avec *N. caerulescens* est l'extrême **variabilité des rendements de biomasse**, allant de 0,28 t ha<sup>-1</sup> à 7,8 t ha<sup>-1</sup> (MS), généralement compris entre 0,5 et 2 t ha<sup>-1</sup>. Cette variabilité est en partie due aux différences de pratiques entre études mais aussi très certainement à la diversité de conditions édaphiques. La compréhension de l'influence de la variation des paramètres édaphiques sur l'efficacité d'extraction semble donc non seulement cruciale pour comprendre la très grande

variabilité observée entre essais mais aussi pour définir les types de sols sur lesquels la remédiation par phytoextraction est envisageable ou non praticable.

Enfin, certaines études ont aussi souligné la **variabilité inter-individuelle de croissance** (Schwartz *et al.* 2001) **et d'accumulation** (Maxted *et al.* 2007), d'un facteur 4 à 5, observées entre plantes au sein d'une même parcelle. Cela souligne l'intérêt de sélectionner des cultivars de *N. caerulescens* à la fois pour leurs capacités d'accumulation et leur production de biomasse (Sterckeman *et al.* 2017). Dans cette perspective, une comparaison des biomasses et concentrations en Cd intra- et inter-populations a montré que *N. caerulescens* répondrait potentiellement bien à des méthodes de sélection classique (Schwartz *et al.* 2006). La variation de production de biomasse aurait d'ailleurs une bonne héritabilité (Pollard et Baker 1996, Molitor *et al.* 2005).

Finalement, dans le contexte du développement de l'agriculture urbaine et des jardins collectifs, la phytoextraction avec *N. caerulescens* pourrait constituer un outil de dépollution intéressant. Aucun test avec *N. caerulescens* n'avait jusqu'ici été réalisé sur des sols urbains. Les jardins collectifs urbains constituent un terrain propice au déploiement d'essais de phytoextraction pour plusieurs raisons : 1) la fréquente contamination en ETM de leurs sols ; 2) le besoin de conserver voire stimuler la fertilité et l'intégrité du sol ; 3) l'absence d'activité économique sur ces terres et une pression d'utilisation modérée, même si la pression croissante de les bâtir constitue une menace ; 4) la présence sur ces sites d'un public réellement intéressé par ce type de techniques et pouvant constituer une main d'œuvre pour le suivi et l'entretien des cultures. Une limite à cette approche unique peut déjà être identifiée en amont de ce travail : alors que le Pb dépasse fréquemment les seuils réglementaires dans les sols des potagers et friches à Bruxelles, *N. caerulescens* n'hyperaccumule pas le Pb et ne peut donc résoudre ce problème là.

---

# Objectifs de la thèse

---

Cette thèse a pour objectif principal d'**optimiser la phytoextraction du Cd et du Zn** avec l'espèce hyperaccumulatrice *Noccaea caerulescens* au moyen de plusieurs essais de terrain sur des sols urbains contaminés en ETM.

Deux grandes voies peuvent être explorées afin d'optimiser le rendement de phytoextraction :

- La prise en compte de la variabilité inter-individuelle et inter-populationnelle de la production de biomasse et de l'accumulation des ETM pour sélectionner des cultivars plus performants ;
- Le développement de pratiques culturales adéquates.

Un premier élément marquant souligné dans la revue de la littérature est la **faible exploitation de la diversité intraspécifique de l'espèce** et surtout l'**absence de populations non-métallicoles** dans les essais. Un deuxième point important est le peu de comparaisons de pratiques de culture et le **manque général de connaissances agronomiques** sur *N. caerulescens*. Enfin, il apparaît que les conditions édaphiques propices à la phytoextraction restent très peu définies.

Le **premier objectif** de ce travail, traité dans les **chapitres 1, 3 et 5**, est donc d'évaluer l'effet de la variabilité d'accumulation d'ETM, de la production de biomasse et du cycle de vie sur l'efficacité de phytoextraction. Ces paramètres seront étudiés pour deux populations contrastées de *N. caerulescens*.

Le **deuxième objectif**, traité dans les **chapitres 2, 3 et 4**, est de tester l'impact de plusieurs pratiques de culture sur le résultat de la phytoextraction, afin de développer un itinéraire de culture performant (fertilisation, cycle de culture, densité de semis).

Le **troisième objectif**, traité dans le **chapitre 4**, est d'étudier l'impact de différentes variables du sol sur la croissance et l'accumulation de *N. caerulescens*.

Le **quatrième objectif**, transversal de ce travail, est d'évaluer si la phytoextraction par *N. caerulescens* peut permettre de décontaminer un sol modérément contaminé en Cd et/ou en Zn.

---

# Chapitre 1

---

## Phytoremédiation des sols urbains contaminés en ETM avec *Noccaea caerulescens* : comparaison de populations non-métallicoles avec la population métallicole ‘Ganges’

### Phytoremediation of urban soils contaminated with trace metals using *Noccaea caerulescens*: comparing non-metallicolous populations to the metallicolous ‘Ganges’ in field trials

Ce premier chapitre a pour originalité principale de comparer pour la première fois l'écotype Ganges, principale population utilisée dans des essais de phytoextraction avec *N. caerulescens* à cause de sa très bonne accumulation du Cd, avec deux populations non-métallicoles luxembourgeoises, choisies pour leur bon potentiel de croissance et d'accumulation dans un pool de populations luxembourgeoises. L'intérêt majeur est d'évaluer la performance relative de ces deux écotypes très contrastés en conditions de terrain, sur deux friches contaminées en ETM à Bruxelles. Par ailleurs, nous évaluons aussi avec cet essai de terrain les bénéfices potentiels de l'ajout d'amendement organique (compost) ou de fertilisant sur l'efficacité de phytoextraction.



# Phytoremediation of urban soils contaminated with trace metals using *Noccaea caerulescens*: comparing non-metallicolous populations to the metallicolous ‘Ganges’ in field trials

Arnaud Jacobs, Thomas Drouet, Thibault Sterckeman, Nausicaa Noret

*Published in Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24: 8176–8188*

## Abstract

Urban soil contamination with trace metals is a major obstacle to the development of urban agriculture as crops grown in urban gardens are prone to accumulate trace metals up to toxic levels for human consumption. Phytoextraction is considered as a potentially cost-effective alternative to conventional methods such as excavation. Field trials of phytoextraction with *Noccaea caerulescens* were conducted on urban soils contaminated with Cd, Cu, Pb and Zn (respectively around 2, 150-200, 400-500 and 400-700  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  of dry soil). Metallicolous (Ganges population) and non-metallicolous (NMET) populations were compared for biomass production and trace metal uptake. Moreover, we tested the effect of compost and fertilizer addition. Maximal biomass of 5 t ha<sup>-1</sup> was obtained with NMET populations on some plots. Compared to Ganges –the high-Cd accumulating ecotype from South of France often used in phytoextraction trials– NMET populations have an advantage for biomass production and for Zn accumulation, with an average Zn uptake 2.5 times higher. The addition of compost seems detrimental due to metal immobilization in the soil with little or no effect on plant growth. In addition to differences between populations, variations of growth and metal accumulation were mostly explained by soil Cd and Zn concentrations, and texture. Our field trials confirm the potential of using *N. caerulescens* for both Cd and Zn remediation of moderately contaminated soils –with uptake values up to 200 g Cd ha<sup>-1</sup> and 47 kg Zn ha<sup>-1</sup>– and show the interest of selecting the adequate population according to the targeted metal.

**Keywords:** Cadmium, Hyperaccumulation, Phytoextraction, Soil remediation, *Thlaspi caerulescens*, Zinc



## 1. Introduction

One of the main threats on urban soils is the contamination with trace metals like lead (Pb), cadmium (Cd), copper (Cu), nickel (Ni), and zinc (Zn) or organic contaminants such as polycyclic aromatic hydrocarbons. In urban environments, the anthropogenic sources of trace metals include primarily atmospheric inputs from industrial activities, waste incineration and car use as well as solid inputs such as construction wastes (Alloway, 2013; Wong *et al.*, 2006). In contrast with agricultural soils, urban soils are characterised by the spatial heterogeneity of contamination (Alloway, 2013; Meuser, 2010), which complicates remediation strategies. Urban soil contamination by toxic trace metals is detrimental for soil quality but is also harmful for human health resulting from accidental soil ingestion and consumption of crops grown on these soils, generally more exposed to trace metals than when grown in rural areas (Finster *et al.*, 2004; Hough *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Säumel *et al.*, 2012). Conventional soil remediation practices such as excavation are often considered too difficult and too costly to be implemented on enclosed urban surfaces that could be converted for agricultural use.

Phytoextraction with hyperaccumulating plants has been suggested to be a promising technique to remediate soils contaminated with trace metals (Hammer and Keller, 2003; Koopmans *et al.*, 2008; Maxted *et al.*, 2007; McGrath *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 1998; Schwartz *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2003). Hyperaccumulating plants accumulate metals in shoots at concentrations above defined thresholds when grown in their natural habitats, *i.e.* 100  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  for Cd, 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  for Ni or 3000  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  for Zn, on a dry weight basis (Krämer, 2010; van der Ent *et al.*, 2013).

The small size and short life cycle of hyperaccumulating plants can be viewed as an advantage for the remediation of small and enclosed surfaces such as urban plots. The technique could be worth considering only with moderate total and highly available trace metals concentrations (Hammer and Keller, 2003; Zhao *et al.*, 2003), *i.e.* less than  $10^3$  and  $10^2$   $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  of soil total Zn and Cd, respectively (Zhao *et al.* 2003). Therefore, the concept of bioavailable contaminant stripping (BCS) - which aims at removing only the bioavailable metal pools - is thought to be a more realistic alternative (Hamon and McLaughlin, 1999).

*Noccaea caerulescens* (Brassicaceae, formerly *Thlaspi caerulescens*) is one of the most promising candidate species for Cd and Zn phytoextraction (Koopmans *et al.*, 2008; Maxted *et al.*, 2007; McGrath *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2003). Three ecotypes of *N. caerulescens* have been described: metallicolous plants grow in soils enriched in Cd-Zn-Pb (calamine, CAL) and in serpentine sites (mostly enriched in Ni), whereas non-metallicolous (NMET) grow in

uncontaminated soils (Escarré *et al.*, 2000; Meerts and van Isacker, 1997; Molitor *et al.*, 2005; Reeves *et al.*, 2001).

CAL and NMET ecotypes have different metal related-traits. When grown in the same substrate, NMET accumulate more Zn (about twice) and Ni than CAL (Escarré *et al.*, 2000; Meerts and van Isacker, 1997), and NMET can reach 20,000  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  of Zn on moderately contaminated substrates (Dechamps *et al.* 2007). On the other hand, high Cd CAL populations from South of France (such as Saint-Félix or Ganges) have been identified for their great potential of Cd phytoextraction, as they can accumulate up to 1000  $\mu\text{g g}^{-1}$  (Hammer and Keller, 2003; Lombi *et al.*, 2001a; Robinson *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2003), compared to 300  $\mu\text{g g}^{-1}$  for NMET (Dechamps *et al.*, 2005). Furthermore, life history traits of *N. caerulescens* differ according to the geographic origin and among ecotypes: NMET populations from Luxemburg are mostly short-lived monocarpic perennials while CAL from South of France are in general winter annuals (Dechamps *et al.*, 2011; Jiménez-Ambriz *et al.*, 2007). Lastly, CAL populations are less adapted to herbivore attacks than NMET as they exhibit lower levels of chemical defences (*e.g.* lower glucosinolate concentrations) (Noret *et al.*, 2005; Noret *et al.*, 2007).

The potential efficiency of phytoextraction with *N. caerulescens* has first been tested in pot trials using soils spiked with metals or from polluted field sites (*e.g.* Robinson *et al.* 1998; Escarré *et al.* 2000; Keller and Hammer 2004). These studies concluded that phytoextraction offers a great potential for Cd and Zn remediation achievable in a few crops for moderate soil concentrations. Despite the need of field experiments on a range of soil conditions to assess the actual phytoextraction efficiency, the number of field trials reported in the literature is surprisingly still very scarce (Hammer and Keller, 2003; Maxted *et al.*, 2007; McGrath *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 2003; Simmons *et al.*, 2015; Tlustoš *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2003), in comparison to pot experiments (see more than 14 references in Li *et al.* 2012). So far, the limits of the method and the biggest lack of knowledge that still need to be field tested concern the adequate agricultural practices *e.g.* fertilisation, weed and pest control, irrigation and resistance to hot weather, optimal length of growth (Koopmans *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012; Maxted *et al.*, 2007; McGrath *et al.*, 2006; Vangronsveld *et al.*, 2009).

Adequate fertilisation is expected to be the most important practice for increasing biomass production. Concerning the use of synthetic fertilizers, previous pot studies showed that nitrogen fertilisation enhances *N. caerulescens* biomass production (+30%) (Sirguy *et al.*, 2006), while its effects on phytoextraction efficiency can either be neutral (Sirguy *et al.*, 2006) or positive with a stronger effect with  $\text{NO}_3^-$  compared to  $\text{NH}_4^+$  (Monsant *et al.*, 2008; Schwartz *et al.*, 2003). In the case of Ni phytomining, Álvarez-López *et al.* (2016) showed that compost addition enhances biomass production and extraction by Ni

hyperaccumulators, despite lowering metal bioavailability. The effect of compost addition has however never been tested with *N. caerulescens* while organic amendments such as compost have the advantage of positively influencing soil biological, chemical and physical characteristics (Bulluck *et al.*, 2002), and of being produced in urban environments.

In summary, strategies to improve phytoextraction efficiency can be classified in two categories: (i) the improvement of the agronomic practices, and (ii) the selection of outstanding populations or individuals based on desired agronomic and phytoextraction characteristics (Li *et al.*, 2012; Schwartz *et al.*, 2006; Vangronsveld *et al.*, 2009).

The present study tested the phytoextraction technique with both metallicolous and non-metallicolous populations of *N. caerulescens* in field conditions in the context of urban soil remediation for agricultural use. NMET from Luxemburg have never been tested as potential candidates for phytoextraction despite their outstanding metal accumulation capacities (Meerts and Van Isacker 1997), most field studies using the high-Cd CAL ecotype (Maxted *et al.*, 2007; McGrath *et al.*, 2006). Field trials are of crucial importance to assess which soil parameters influence most biomass production and phytoextraction efficiency, and evaluate the potential of the method and its limits. Therefore the objectives of the present study were to: (i) compare MET and NMET populations in phytoextraction field trials; (ii) test the effect of compost addition on biomass production and phytoextraction efficiency; (iii) test the potential of phytoextraction for remediation of urban soils.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Site description

Field trials were conducted in two urban wastelands located in Brussels, Belgium. The first one, *Gare Royale* (GR) (50°52'07"N, 4°21'39"E), is located along a railway on an embankment slope created at the end of the 19<sup>th</sup> century. The second one, *Masui* (MAS) (50°52'31"N, 4°21'40"E), lies on the old bed of the river Senne, which has been diverted and filled in the middle of the 20<sup>th</sup> century. Both sites are contaminated with trace metals and PAH (polycyclic aromatic hydrocarbons) and consists of embankment material at 1 m depth (ballast, slags and bricks). On average five PAH out of 16 are slightly above regional thresholds but the total PAH content is globally low (sum of 16 PAH: 22 ± 5 mg kg<sup>-1</sup> at GR, 40 ± 60 mg kg<sup>-1</sup> at MAS) (Geosan, 2013). Due to the high cost of remediation, the foreseen conversion of the sites by the city is on hold. Topsoils of both sites are characterised by a neutral pH (GR: 7.2) or alkaline (MAS: 8.2), a coarse texture (sandy loam) and a very high loss on ignition for GR (19.7%, and around 10% organic matter when coal is subtracted; MAS: 5.7%). Average nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) and ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) levels of the top soil are twice higher at

GR (44 and 10 mg kg<sup>-1</sup> respectively) than at MAS (23 and 5 mg kg<sup>-1</sup>). Vegetation on both sites is mostly composed of pioneer and invasive species which thrive on frequently disturbed wastelands (e.g., *Urtica dioica*, *Rubus idaeus*, *Buddleja davidii*).

Climatic conditions during growth season (May–November) in 2014 (recorded in Uccle, Royal Meteorological Institute) were the following: mean monthly temperature of 14.9 °C (ranging from 8.8 °C in November to 19.3 °C in July), mean monthly rainfall of 73.7 mm (ranging from 15.1 mm in September to 136 mm in August) and total rainfall during the growth period of 516 mm.

## 2.2. Experimental design and plant cultivation

*Noccaea caerulescens* seeds came from three populations: two NMET from The Grand Duchy of Luxemburg, *Wilwerwiltz* and *Goebelsmühle* (hereafter WIL and GOE) (Molitor *et al.*, 2005), and one metallicolous *Ganges* (GAN, or 'Avinières') from St-Laurent-le-Minier, France (Escarré *et al.*, 2000). Seedlings of *N. caerulescens* were grown in greenhouse for 2.5 months before transplanting in the field.

In each site, four blocks (3.6×1 m) were set up and split into three plots (1×1 m) corresponding to three treatments each separated by 30 cm (compost addition, fertilisation, control). Each block was excavated to 20 cm depth and the topsoil was thoroughly homogenised before being replaced. On the appropriate plots, fertilizer and amendment were applied two weeks before transplantation. Green waste compost (containing 1.4 g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 8.8 g K<sub>2</sub>O, 1.3 g MgO, Cd 0.35 mg, Cu 9.2 mg, Pb 23 mg, Zn 70 mg per kg, as exchangeable ions) was spread at the rate of 20 L m<sup>-2</sup>. Fertilizer made of chicken manure and meat-and-bone meal (500 g organic matter, 60 g N, 30 g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and 50 g K<sub>2</sub>O per kg) was added as a 60 g.m<sup>-2</sup> split in one initial application followed by one each month. Quantities applied were chosen based on fertility recommendations for small Brassicaceae, and on the very poor quality of the wastelands soils.

Each plot was then divided into four subplots (0.5×0.5 m) to compare different populations. In three subplots, twenty-five seedlings of *N. caerulescens* (four leaves stage) per population were transplanted in May 2014, every 10 cm (density 100 m<sup>-2</sup>). The last subplot was left unplanted for control. Plants were watered (5 L m<sup>-2</sup> every other week if it had not rained) and plots were weeded twice a month. Flower stalks were systematically cut off to favor vegetative growth. Aerial parts of *N. caerulescens* were harvested in November 2014 after 6.5 months of growth by cutting the plants at the root collar. Four plants were selected in each subplot for elemental composition analysis based on their proximity to the points of soil sampling (see after). The rest of the plants was collected, rinsed once with tap water and dried. Aboveground biomasses of 65 °C-dried plants were determined for every subplot, and the

number of individuals was counted to determine the survival rate. Mean individual biomass was calculated by dividing total biomass by the number of surviving individuals at harvest.

### 2.3. Soil analysis

Before and after cultivation, soil samples were collected with a 2-cm diameter auger down to 20 cm depth at 4 points in each subplot; the 4 samples were bulked as one composite sample per subplot. Soil treatments were applied one week before the first soil sampling.

All measurements - except those specifically mentioned - were carried out following standard protocols of soil analysis (Pansu and Gautheyrou, 2006). Soil samples were air-dried and sieved at 2 mm. Soil pH-H<sub>2</sub>O was measured using glass electrodes in a 1:5 soil:water suspension. Soil water content (moisture) was measured after cultivation as the loss on drying at 105°C. Exchangeable cations (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>) were extracted with ammonium acetate (0.5 M) and EDTA (0.02 M) at pH 7 (Cottenie *et al.*, 1979) and their concentrations were measured with inductively coupled plasma emission spectrometer (ICP-OES) (Varian Vista-MPX). Organic matter (OM) content was measured by loss on ignition at 500 °C. The cation exchange capacity (CEC, cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>) was measured on a soil extract with cobaltihexamine trichloride according to the ISO norm 23470:2007. Soil texture (percentage of clay, silt and sand) was determined using wet sieving and the pipette method after OM destruction with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Na citrate dispersion of clay.

Total trace metal concentrations were measured on bulk samples (one per 1 m<sup>2</sup> plot) by tri-acid (HCl 37%, HNO<sub>3</sub> 65%, HF 40%) attack of finely ground soil samples on a hot plate at 70 °C during 48 h. The dry residue was re-dissolved with 1 mL HNO<sub>3</sub> 65% in a volume of 30 mL and total element concentrations were determined by ICP-OES (Varian Vista-MPX). The method was checked with a certified reference soil material (SRM 2711a, Montana II Soil).

### 2.4. Plant analysis

The four individuals used for elemental composition were thoroughly washed once with tap water, and twice with deionized water. Samples were then dried at 65 °C for 48 hours and ground. Subsamples of 0.4 g were dry-ashed during 12 h at 500 °C and dissolved with concentrated HNO<sub>3</sub> (65%). Concentrations in Zn, Cd, Cu, Ni, Pb and major elements (expressed as µg g<sup>-1</sup> of 105 °C-dried plant) were determined with ICP-OES (Varian, Vista MPX). Analytical method was checked on NIST standard reference (SRM 1545, Peach leaves).

### 2.5. Statistical analysis

Data were Box-Cox transformed to meet the assumptions of normality of residuals and homoscedasticity between groups. Soil parameters were analyzed for each site separately

using two-way factorial ANOVA's to test for the effect of soil treatments and possible differences between blocks. Variations of biomass, plant elemental concentrations and metal masses in plants were analyzed with three-way ANOVAs for each site with populations, soil treatments and blocks as fixed factors. Post-hoc comparisons were performed using Tukey HSD test. Comparisons between soil concentrations in trace metals before and after plant cultivation were conducted using student paired t-tests.

In order to test for the influence of soil parameters on biomass production and metal uptake, linear models were constructed using both factors (population and site) and continuous variables (%OM, texture, exchangeable concentrations in trace metals and Ca, K, Mg, P). All soil variable combinations that respected the assumption of non-collinearity (Variance Inflation Factor (VIF) < 10) were introduced in linear models. CEC and pH were not introduced as variables in the models because of their multivariate nature (multiple influence on soil chemistry), and because pH values within sites are very homogeneous and particularly high (7-8) which is already known to be detrimental for metal accumulation (Wang *et al.*, 2006; Yanai *et al.*, 2006). Since total biomass is strongly influenced by unwanted mortality (herbivory), we chose to test for the influence of soil parameters on mean individual biomass (instead of total biomass).

Based on the Bayesian information criterion (BIC) (a more parsimonious alternative to Akaike information criterion), the most parsimonious model was selected for each response variable. The relative contribution of factors and selected variables were then calculated using LMG, the  $R^2$  contribution averaged over orderings among regressors (Kruskal, 1987), with R package *relaimpo* (Grömping, 2006).

All statistical analyses were carried out with the R statistical software v. 3.1.2 (R Development Core Team, 2015).

**Table 1.** Soil trace metals concentrations (total and ammonium acetate-EDTA extraction) before cultivation, among treatments (Comp. = compost addition; Fert. = fertilizer; Cont. = control) and blocks. Values are means and in brackets are the standard errors of the mean ( $n = 3$  to 16). Different subscript letters indicate significant differences between treatments or blocks at the  $P < 0.05$  level. Results of the analyses of variance are found in the supporting information (Table S2).

			Cd (mg.kg <sup>-1</sup> )		Cu (mg.kg <sup>-1</sup> )		Ni (mg.kg <sup>-1</sup> )		Pb (mg.kg <sup>-1</sup> )		Zn (mg.kg <sup>-1</sup> )	
			Total	Ac. EDTA	Total	Ac. EDTA	Total	Ac. EDTA	Total	Ac. EDTA	Total	Ac. EDTA
GR	Treatment	Comp.	1.4 (0.2) <sup>a</sup>	0.85 (0.06) <sup>a</sup>	150 (40) <sup>a</sup>	36 (3) <sup>a</sup>	36 (6) <sup>a</sup>	1.6 (0.1) <sup>a</sup>	480 (180) <sup>a</sup>	160 (30) <sup>a</sup>	410 (50) <sup>a</sup>	138 (8) <sup>a</sup>
		Fert.	2.1 (0.7) <sup>a</sup>	1.02 (0.08) <sup>b</sup>	190 (60) <sup>ab</sup>	52 (6) <sup>ab</sup>	46 (11) <sup>b</sup>	2.3 (0.1) <sup>b</sup>	1800 (1400) <sup>a</sup>	300 (80) <sup>b</sup>	550 (130) <sup>a</sup>	164 (14) <sup>a</sup>
		Cont.	1.7 (0.4) <sup>a</sup>	1.11 (0.12) <sup>b</sup>	180 (60) <sup>b</sup>	54 (5) <sup>b</sup>	44 (10) <sup>b</sup>	2.3 (0.1) <sup>b</sup>	900 (500) <sup>a</sup>	280 (60) <sup>b</sup>	480 (80) <sup>a</sup>	160 (10) <sup>a</sup>
	Block	1	2.5 (0.3) <sup>a</sup>	1.48 (0.11) <sup>a</sup>	310 (30) <sup>a</sup>	73 (5) <sup>a</sup>	65 (8) <sup>a</sup>	2.1 (0.2) <sup>b</sup>	3200 (1500) <sup>a</sup>	620 (60) <sup>a</sup>	720 (110) <sup>a</sup>	218 (11) <sup>a</sup>
		2	2.5 (0.6) <sup>a</sup>	1.00 (0.04) <sup>b</sup>	200 (20) <sup>b</sup>	51 (3) <sup>b</sup>	47 (3) <sup>b</sup>	2.2 (0.2) <sup>ab</sup>	450 (20) <sup>b</sup>	125 (5) <sup>c</sup>	470 (30) <sup>a</sup>	135 (4) <sup>b</sup>
		3	1 (0.1) <sup>b</sup>	0.84 (0.03) <sup>c</sup>	100 (10) <sup>c</sup>	39 (4) <sup>c</sup>	30 (1) <sup>c</sup>	2.5 (0.1) <sup>a</sup>	240 (10) <sup>c</sup>	85 (4) <sup>d</sup>	360 (4) <sup>b</sup>	137 (7) <sup>b</sup>
		4	1 (0.1) <sup>b</sup>	0.66 (0.02) <sup>d</sup>	80 (10) <sup>c</sup>	26 (1) <sup>d</sup>	25 (2) <sup>d</sup>	1.6 (0.1) <sup>c</sup>	390 (90) <sup>bc</sup>	160 (14) <sup>b</sup>	370 (26) <sup>b</sup>	127 (4) <sup>b</sup>
	MAS	Treatment	Comp.	2 (0.4) <sup>a</sup>	0.50 (0.02) <sup>a</sup>	230 (80) <sup>a</sup>	39 (2) <sup>a</sup>	34 (3) <sup>a</sup>	0.8 (0.1) <sup>a</sup>	430 (30) <sup>a</sup>	100 (4) <sup>a</sup>	530 (50) <sup>a</sup>
Fert.			1.7 (0.2) <sup>a</sup>	0.56 (0.03) <sup>ab</sup>	180 (10) <sup>a</sup>	48 (4) <sup>b</sup>	43 (5) <sup>a</sup>	0.9 (0.2) <sup>a</sup>	440 (30) <sup>a</sup>	125 (10) <sup>b</sup>	630 (70) <sup>a</sup>	90 (8) <sup>ab</sup>
Cont.			2.2 (0.3) <sup>a</sup>	0.66 (0.05) <sup>b</sup>	230 (20) <sup>a</sup>	53 (3) <sup>b</sup>	43 (3) <sup>a</sup>	1.2 (0.2) <sup>b</sup>	500 (30) <sup>a</sup>	135 (10) <sup>b</sup>	710 (70) <sup>a</sup>	97 (8) <sup>b</sup>
Block		1	1.9 (0.1) <sup>a</sup>	0.53 (0.02) <sup>ab</sup>	190 (30) <sup>a</sup>	51 (6) <sup>a</sup>	35 (2) <sup>a</sup>	0.7 (0.2) <sup>a</sup>	460 (10) <sup>a</sup>	130 (10) <sup>a</sup>	590 (50) <sup>a</sup>	89 (6) <sup>b</sup>
		2	2.1 (0.3) <sup>a</sup>	0.68 (0.06) <sup>c</sup>	160 (10) <sup>a</sup>	43 (3) <sup>a</sup>	42 (7) <sup>a</sup>	0.8 (0.1) <sup>a</sup>	450 (40) <sup>a</sup>	120 (10) <sup>a</sup>	690 (80) <sup>a</sup>	90 (6) <sup>b</sup>
		3	2.4 (0.3) <sup>a</sup>	0.62 (0.03) <sup>bc</sup>	310 (90) <sup>a</sup>	47 (3) <sup>a</sup>	47 (3) <sup>a</sup>	1.8 (0.1) <sup>b</sup>	520 (30) <sup>a</sup>	140 (10) <sup>a</sup>	740 (60) <sup>a</sup>	117 (6) <sup>a</sup>
		4	1.4 (0.1) <sup>a</sup>	0.47 (0.03) <sup>a</sup>	180 (20) <sup>a</sup>	45 (3) <sup>a</sup>	37 (4) <sup>a</sup>	0.6 (0.05) <sup>a</sup>	390 (30) <sup>a</sup>	88 (4) <sup>b</sup>	480 (40) <sup>a</sup>	56 (3) <sup>c</sup>

**Table 2.** Soil fertility parameters on sites Gare Royale (GR) and Masui (MAS) before cultivation, among treatments (Comp. = compost addition; Fert. = fertilizer; Cont. = control) and blocks. Parameters are percentage of organic matter (% OM), pH, cationic exchange capacity (cobaltihexamine method), texture, and exchangeable cations. Values are means and in brackets are the standard errors of the mean (n = 3 to 16). Different subscript letters indicate significant differences between treatments or blocks at the  $P < 0.05$  level. Results of the analyses of variance are found in the supporting information (Table S3).

			%OM	pH	CEC (cmol <sub>c</sub> .kg <sup>-1</sup> )	% Clay	% Silt	% Sand	Ca (mg.kg <sup>-1</sup> )	K (mg.kg <sup>-1</sup> )	Mg (mg.kg <sup>-1</sup> )	P (mg.kg <sup>-1</sup> )
GR	Treatment	Comp.	19.2 (1.8) <sup>a</sup>	7.6 (0.1) <sup>a</sup>	30.7 (3) <sup>a</sup>	14.2 (1.3) <sup>a</sup>	30.8 (3.1) <sup>a</sup>	54.2 (4.2) <sup>a</sup>	6570 (240) <sup>a</sup>	1820 (220) <sup>a</sup>	345 (32) <sup>a</sup>	79 (8.4) <sup>a</sup>
		Fert.	19.9 (2.2) <sup>a</sup>	7.1 (0.1) <sup>b</sup>	27 (2) <sup>ab</sup>	16.1 (1.7) <sup>a</sup>	29.1 (3.7) <sup>a</sup>	53.9 (4.8) <sup>a</sup>	5730 (170) <sup>b</sup>	430 (20) <sup>b</sup>	208 (12) <sup>b</sup>	18 (1.8) <sup>b</sup>
		Cont.	19.7 (2.1) <sup>a</sup>	7.2 (0.1) <sup>b</sup>	26 (2) <sup>b</sup>	15.6 (2) <sup>a</sup>	30.7 (2) <sup>a</sup>	52.9 (2) <sup>a</sup>	6020 (180) <sup>b</sup>	440 (20) <sup>b</sup>	215 (12) <sup>b</sup>	21 (2.2) <sup>b</sup>
	Block	1	30.6 (1) <sup>a</sup>	7.2 (0.1) <sup>a</sup>	34 (2) <sup>a</sup>	11.4 (0.3) <sup>a</sup>	22.6 (2.1) <sup>a</sup>	64.6 (2) <sup>a</sup>	6950 (180) <sup>a</sup>	1250 (360) <sup>a</sup>	340 (33) <sup>a</sup>	46 (14) <sup>a</sup>
		2	22.9 (0.8) <sup>b</sup>	7.3 (0.1) <sup>a</sup>	29 (3) <sup>ab</sup>	16.3 (1.7) <sup>b</sup>	28.2 (1.6) <sup>ab</sup>	54.5 (3) <sup>ab</sup>	6420 (230) <sup>a</sup>	990 (270) <sup>b</sup>	290 (32) <sup>b</sup>	42 (13) <sup>a</sup>
		3	12.9 (0.3) <sup>c</sup>	7.1 (0.1) <sup>a</sup>	24 (1) <sup>c</sup>	18.3 (0.3) <sup>b</sup>	36.5 (1.4) <sup>c</sup>	44.7 (1.1) <sup>c</sup>	5440 (140) <sup>b</sup>	540 (70) <sup>c</sup>	220 (7) <sup>c</sup>	28 (4) <sup>a</sup>
		4	12.1 (0.3) <sup>c</sup>	7.6 (0.1) <sup>b</sup>	25 (1) <sup>bc</sup>	15.3 (0.5) <sup>ab</sup>	33.5 (0.9) <sup>bc</sup>	50.9 (1.3) <sup>bc</sup>	5610 (110) <sup>b</sup>	790 (120) <sup>a</sup>	180 (13) <sup>d</sup>	42 (6) <sup>b</sup>
MAS	Treatment	Comp.	6.6 (0.6) <sup>a</sup>	8.2 (0.02) <sup>a</sup>	16.3 (0.5) <sup>a</sup>	9 (1.9) <sup>a</sup>	22.7 (3.6) <sup>a</sup>	68 (1.8) <sup>a</sup>	5960 (40) <sup>a</sup>	640 (40) <sup>a</sup>	117 (5) <sup>a</sup>	30.6 (2.2) <sup>a</sup>
		Fert.	5.4 (0.2) <sup>a</sup>	8.2 (0.03) <sup>a</sup>	12.2 (1.2) <sup>b</sup>	10.1 (0.8) <sup>a</sup>	23.5 (4.7) <sup>a</sup>	66.1 (3.9) <sup>a</sup>	5940 (60) <sup>a</sup>	251 (10) <sup>b</sup>	64.6 (1.7) <sup>b</sup>	14.9 (1.1) <sup>b</sup>
		Cont.	5.7 (0.2) <sup>a</sup>	8.2 (0.03) <sup>a</sup>	13.8 (2) <sup>ab</sup>	9.4 (2) <sup>a</sup>	22.7 (2) <sup>a</sup>	67.6 (2) <sup>a</sup>	6010 (40) <sup>a</sup>	277 (10) <sup>b</sup>	70.2 (2.8) <sup>b</sup>	15.05 (1.32) <sup>b</sup>
	Block	1	4.8 (0.2) <sup>a</sup>	8.1 (0.03) <sup>a</sup>	14.7 (0.2) <sup>a</sup>	9.1 (2.2) <sup>a</sup>	22.2 (4.1) <sup>a</sup>	68.4 (1.9) <sup>a</sup>	6010 (40) <sup>a</sup>	340 (60) <sup>a</sup>	80 (9) <sup>a</sup>	24 (3) <sup>a</sup>
		2	5.7 (0.3) <sup>b</sup>	8.2 (0.03) <sup>bc</sup>	13.2 (2.3) <sup>a</sup>	9.2 (1.6) <sup>a</sup>	21.2 (2) <sup>a</sup>	69.3 (0.6) <sup>a</sup>	6080 (50) <sup>a</sup>	420 (70) <sup>ab</sup>	78 (9) <sup>a</sup>	21 (3) <sup>a</sup>
		3	6.2 (0.2) <sup>b</sup>	8.2 (0.02) <sup>ab</sup>	14.1 (1.3) <sup>a</sup>	10.7 (1.5) <sup>a</sup>	19.4 (3.7) <sup>a</sup>	69.6 (2.3) <sup>a</sup>	5870 (70) <sup>a</sup>	470 (60) <sup>b</sup>	94 (8) <sup>a</sup>	24 (3) <sup>a</sup>
		4	6.9 (0.7) <sup>b</sup>	8.3 (0.02) <sup>c</sup>	14.5 (1.3) <sup>a</sup>	8.9 (1.5) <sup>a</sup>	29.1 (4.4) <sup>a</sup>	61.6 (3.5) <sup>a</sup>	5940 (50) <sup>a</sup>	320 (40) <sup>ab</sup>	85 (7) <sup>a</sup>	12 (2) <sup>b</sup>



### 3. Results

#### 3.1. Soil characteristics

Table 1 presents total and exchangeable (NH<sub>4</sub> acetate - EDTA) concentrations of trace metals in soils. Soil concentrations in Cd, Cu, Pb and Zn measured at GR and MAS sites are above regional thresholds for parks, natural areas and agricultural lands (2 mg kg<sup>-1</sup>, 120 mg kg<sup>-1</sup>, 200 mg kg<sup>-1</sup>, 333 mg kg<sup>-1</sup> for Cd, Cu, Pb and Zn, respectively) (Brussels Government, 2009). For both sites, soil Pb and Zn concentrations exceeded regional thresholds in the four blocks. For Cd and Cu, soil concentrations exceeded regional thresholds in at least 2 out of 4 blocks in both sites.

The soil treatments (compost or fertilizer addition) had little or no effect on total soil metal concentrations but significantly influenced the exchangeable fraction (Table 1 and Table S2). A significant decrease in exchangeable forms of the four trace metals considered was measured in the compost treatment compared to the control (-24% Cd, -26 up to -33% Cu, -26 up to -43% Pb, -14 up to -20% Zn). These results can be partly attributed to the diluting effect of the application of compost, but this would account for max 10% of this decrease. The immobilising effect of organic matter is expected to be responsible for the rest of this decrease (Beesley *et al.*, 2010).

There was no effect of fertilizers' application on soil fertility parameters (Table 2 and Table S3), probably because the quantity applied was much too low. The application of compost led to significantly higher CEC, and exchangeable K, Mg, P contents in both sites, and to higher pH and Ca content at GR site.

#### 3.2. Biomass: effects of soil treatment and population

The average yields of *N. caerulea* dry biomass grown at sites GR and MAS were 2.55 ± 1.38 (mean ± SD) t.ha<sup>-1</sup> and 1.16 ± 0.62 t.ha<sup>-1</sup>, respectively. GAN population yielded a lower biomass than NMET populations at both sites, although not significantly different at MAS (Fig. 1; Table S1). In GR, GAN biomass was two times lower compared to NMET biomass. GAN plants had on average lower survival rates (GR: 52 ± 30%, MAS: 52 ± 27%), at both sites compared to NMET plants (GR: GOE 72 ± 19%, WIL 72 ± 24%; MAS: GOE 69 ± 12%, WIL 67 ± 26%) but the difference was not significant.

The treatment (addition of fertiliser or compost) had no general significant effect on plant biomass production (Fig. 1). Results show however a negative effect of compost on GAN biomass at GR. As the individual biomass of GAN was not affected by compost addition ( $P > 0.05$ ), it seems that the compost mainly impacted the survival of GAN plants. Plant biomass

also varies significantly between blocks in both sites due to a large heterogeneity of soil conditions (trace metal contents and physico-chemical properties) (Tables 1 & 2).

### 3.1. Metal concentrations in plants

Concentrations of Cd, Ni, and Zn in *N. caerulescens* plants for each population and treatment are shown in Figure 2. Foliar concentrations in all trace metals were significantly different depending on the block (Table 3), which is explained by the significant heterogeneity in soil metal concentrations among blocks (Table 2) expected in field experiments.

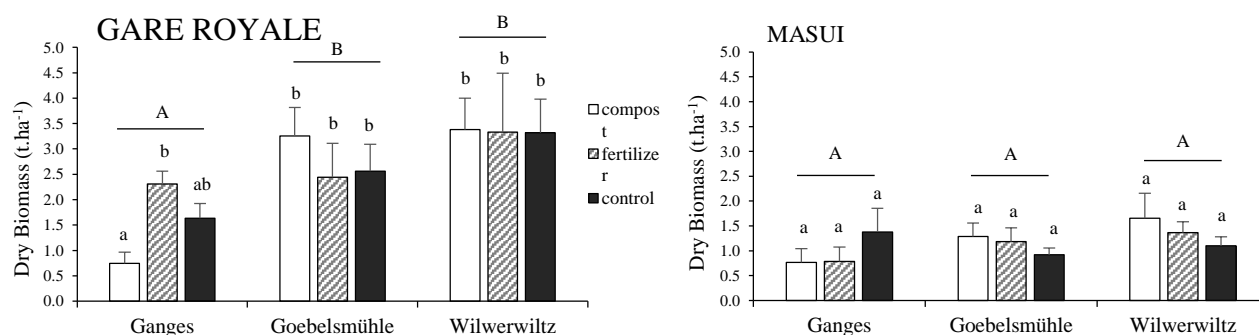
#### ***Effect of population***

Populations had significantly different foliar concentrations in Cd, Ni and Zn in both sites (Fig. 2 and Table 3). Cadmium concentration in GAN shoots ( $128 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  at GR and  $92 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  at MAS) was about three times higher than in NMET populations ( $45 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  at GR and  $25 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  at MAS). In contrast, NMET populations accumulated about 1.2-1.8 (WIL) and 1.2-2.3 (GOE) times more Zn, and about 1.3-2 (WIL) and 1.7-2.5 (GOE) times more Ni compared to GAN (shoot concentrations in  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

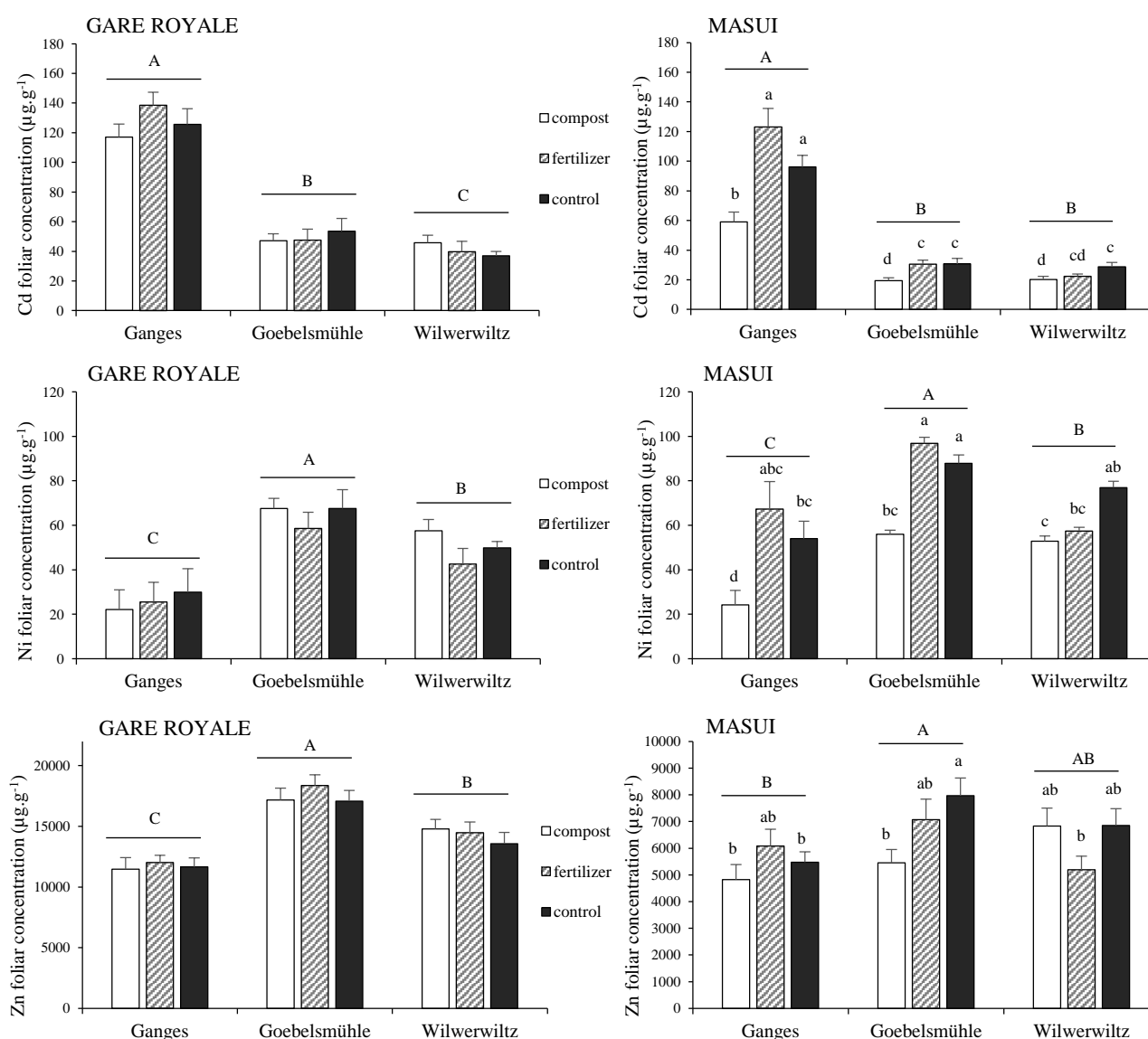
Cu and Pb concentrations were all relatively low but slightly higher in GAN plants (respectively,  $12 \pm 5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  and  $4 \pm 4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  at GR,  $22 \pm 8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  and  $7 \pm 3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  at MAS) compared to NMET populations ( $6 \pm 3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  and  $3 \pm 3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  at GR,  $14 \pm 5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  and  $5 \pm 2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  at MAS) in both sites.

#### ***Effect of soil treatment***

The application of fertilizers did not influence trace metal concentration in plants. In contrast, compost addition had a negative effect on concentrations of Cd, Ni, and Zn at MAS site, for all three populations but this decreasing effect was most striking on GAN (*e.g.* Cd  $96 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  on control *vs*  $59 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  with compost, Fig. 2). At GR, compost addition had the same negative effect on GAN but on metal uptake of Cd, Ni and Zn ( $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ), while it slightly increased metal extraction of NMET populations.



**Figure 1.** Dry biomass of *N. caerulea* plants coming from three origins (Ganges, Goebelsmühle, Wilwerwiltz), grown on three soil treatments (compost, fertiliser and control) at site Gare Royale and site Masui. Means with different letters indicate significant difference between populations (uppercase) and treatments (lowercase) at the  $P < 0.05$  level. The error bars are standard errors.



**Figure 2.** Trace metal concentrations (Cd, Ni, Zn) in the shoots of *N. caerulea* plants coming from three origins (GAN, GOE, WIL), grown on three soil treatments (compost, fertilizer and control) at site Gare Royale and site Masui. Means with different letters indicate significant difference between populations (uppercase) and treatments (lowercase) at the  $P < 0.05$  level. There were no significant differences between treatments at GR. The error bars are standard errors.

**Table 3.** Analysis of variance of foliar concentrations in trace metals of three population of *N. caerulescens* (one calamine, Ganges, and two nonmetallicolous, Wilwerwiltz and Goebelsmühle) grown on three soil treatments (control soil, fertilizer, compost) in two experimental sites (GR = Gare Royale and MAS = Masui). For each factor (Pop.= population, Treat.= Treatment, Block) and interactions, the number of degrees of freedom (d.f.), mean square (MS), F value and level of significance associated (\*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*,  $P < 0.05$ ; ·,  $P < 0.1$ ; ns, not significant) are given.

		Foliar concentration in Cd			Foliar concentration in Ni			Foliar concentration in Zn		
		d.f.	MS	F	d.f.	MS	F	d.f.	MS	F
GR	Pop.	2	113	332 ***	2	4.16	86.13 ***	2	19735	47.8 ***
	Treat.	2	0.13	0.38 ns	2	0.17	3.53 *	2	242	0.59 ns
	Block	3	28.6	84 ***	3	6.92	143.4 ***	3	4313	10.4 ***
	Pop. × Treat.	4	1.4	4.3 **	4	0.23	4.6 **	4	146	0.35 ns
	Pop. × Block	6	1.7	5.0 ***	6	0.42	8.79 ***	6	841	2.04 ·
	Treat. × Block	6	1.4	4.0 **	6	0.27	5.55 ***	6	275	0.67 ns
	Pop. × Treat. × Block	12	2.1	6.2 ***	12	0.09	1.92 *	12	486	1.18 ns
	Residuals	95	0.34		92	0.05		94	413	
MAS	Pop.	2	2.56	167 ***	2	16.8	16.2 ***	2	6186	4.44 *
	Treat.	2	0.345	22.4 ***	2	45.2	43.6 ***	2	5488	3.94 *
	Block	3	0.140	9.05 ***	3	92.2	88.8 ***	3	18607	13.34 ***
	Pop. × Treat.	4	0.023	1.54 ns	4	5.95	5.73 ***	4	4461	3.20 *
	Pop. × Block	6	0.033	2.18 ·	6	4.86	4.68 ***	6	4570	3.28 **
	Treat. × Block	6	0.063	4.14 ***	6	5.51	5.31 ***	6	3376	2.42 *
	Pop. × Treat. × Block	11	0.017	1.13 ns	11	2.84	2.73 **	11	2815	2.02 *
	Residuals	97	0.015		99	1.04		98	1394	

### 3.2. Metal uptake

Cd uptake is highest for GAN plants ( $0.20 \pm 0.12 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  at GR,  $0.10 \pm 0.07 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  at MAS) compared to NMET populations ( $0.14 \pm 0.11 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  at GR,  $0.03 \pm 0.02 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  at MAS). It is interesting to notice that Cd uptake by NMET at GR is higher than GAN uptake at MAS. Ni and Zn uptakes are on the other hand higher for NMET populations (Ni:  $0.20 \pm 0.18 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  at GR,  $0.08 \pm 0.07 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  at MAS; Zn:  $47 \pm 24 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  at GR,  $7.9 \pm 5.4 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  at MAS) compared to GAN plants (Ni:  $0.04 \pm 0.04 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  at GR,  $0.05 \pm 0.05 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  at MAS; Zn:  $18 \pm 10 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  at GR,  $5.9 \pm 4.1 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  at MAS).

Metal uptake by *N. caerulescens* after 6.5 months of growth resulted into significant decreases in exchangeable concentrations of trace metals in the soils only at GR (paired t-test performed on concentrations measured in soils sampled before and after the culture,  $n = 36$ ,  $t = 8.3$ ,  $p < 0.001$ ): 23% less Cd and 31% less Zn on average (see details in supplementary Table S4). In the unplanted subplot within the  $1 \text{ m}^2$  plot the decreases were 10 and 13% for Cd and Zn. At MAS, however, there was a significant overall increase in exchangeable Zn by 13% ( $p < 0.05$ ), and by 10% for Cd ( $p = 0.07$ ).

### 3.3. Soil influence on plant biomass and concentrations

Results of the explanatory models are presented in Table 4. Across the two sites, clay content positively influences (19%) individual biomass production, while site specificity alone (factor site in the model) explains 25% of the variation. Soil exchangeable Zn at MAS enhances biomass production (28%) while at GR Pb and/or Zn (correlation between variables  $r = 0.94$ ) negatively influence it, but only for NMET populations. The part of biomass variance explained by the population factor is relatively limited across the two sites (8%) while at GR it accounts for a more significant part of the variation (26%).

Across both sites variation of shoot concentration in Cd is mostly explained by the population effect (50%) while site (7%), soil Cd (9%) and Pb (5%) explain together about 20% of the variance. When MET and NMET populations are considered separately, soil Cd concentration accounts for 28% and 17% of the variance, respectively. Variation of shoot concentration in Zn is however mostly explained by site (21%) or soil parameters (44%) among which OM (18%), clay content (13%) and soil Zn concentration (10%) while the population factor explains only about 6% of the variation. Again at GR, population effect accounts for a more significant part of the variation (37%).

**Table 4.** Summaries of the best linear models explaining variation of biomass, plant metal concentration and uptake, selected for minimising the Bayesian information criterion (BIC). For each model, the adjusted R<sup>2</sup>, the relative contribution of the population and the selected soil variables with their relative contribution (in brackets) are detailed.

Variable	Gare Royale							Masui					Both sites					
	R <sup>2</sup> adj.	pop.	1	2	3	4	5	R <sup>2</sup> adj.	pop.	1	2	3	R <sup>2</sup> adj.	pop.	Site	1	2	3
Mean Individual Biomass	0.40	0.26	- Pb (0.14)					0.40	0.07	+ Zn (0.28)	- Cd (0.06)		0.52	0.08	0.25	+ Clay (0.19)		
Shoot Cd concentration	0.80	0.57	- Pb (0.10)	+ Cd (0.10)	+ Zn (0.03)			0.68	0.60	- P (0.08)			0.74	0.50	0.07	+ Cd (0.09)	- Pb (0.05)	
Shoot Zn concentration	0.47	0.37	- Pb (0.09)	+ Cd (0.02)				0.12	0.04	+ OM (0.08)			0.71	0.06	0.21	+ OM (0.18)	+ Clay (0.13)	+ Zn (0.10)
Individual Cd uptake	0.66	0.16	+ Clay (0.16)	- Pb (0.14)	+ Ca (0.07)	+ Cd (0.06)	+ Sand (0.06)	0.57	0.39	+ Zn (0.12)	- Cd (0.04)	- P (0.03)	0.67	0.18	0.15	+ Clay (0.15)	+ Cd (0.14)	- Pb (0.03)
Individual Zn uptake	0.62	0.40	- Pb (0.18)	+ Ca (0.03)	- K (0.02)			0.35	0.05	+ Zn (0.22)	- Cd (0.05)	+ OM (0.04)	0.74	0.07	0.29	+ Clay (0.20)	+ Zn (0.16)	- Pb (0.03)

## 4. Discussion

### 4.1. MET and NMET populations for phytoextraction

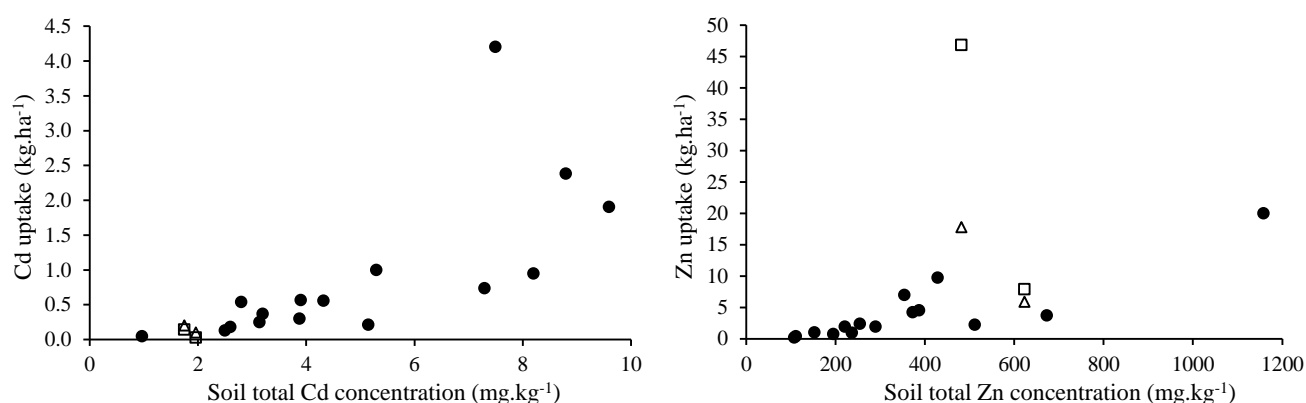
Our trials yielded a quite remarkable biomass production at GR with 2.55 t.ha<sup>-1</sup> of dry biomass on average and up to 5 t.ha<sup>-1</sup> for NMET on the best plot. These results are globally coherent with other field studies with average reported yields of 1-2 t.ha<sup>-1</sup>, and max. of 4 t.ha<sup>-1</sup> (Hammer and Keller, 2003; Maxted *et al.*, 2007; McGrath *et al.*, 2006; Simmons *et al.*, 2015). So far, as underlined by Simmons *et al.* (2015), the initial yield predictions of 5 to 10 t.ha<sup>-1</sup> (Zhao *et al.*, 2003) had not been supported by any field trials. Similar yield assumptions had also been made based on individual biomass with theoretical extrapolations of one harvest on three successive crops the same season (Hammer and Keller, 2003; Maxted *et al.*, 2007) which seems highly unreasonable given the difficult establishment of seedlings late in the season. Even if yields of 10 t.ha<sup>-1</sup> are most likely unrealistic for field conditions, our trials show that NMET populations can produce up to 5 t.ha<sup>-1</sup> of dry biomass in one harvest in certain conditions, which is the best yield obtained so far in six months of growth.

The comparison of GAN and NMET populations in terms of biomass production gives an advantage to the latter, mostly in good growth conditions (around 2 times more at GR site). With lower survival, GAN (52%) appears first to be clearly more sensitive to herbivore pressure than NMET (70%) as had already been demonstrated in the field (Noret *et al.* 2007). Secondly, our results show a tendency for NMET plants to produce greater individual biomass (at GR, 1.5 times more than GAN). This might be explained by the difference of dominant natural life cycle of the two ecotypes: annual for CAL (GAN) while NMET from Luxemburg are mostly short-lived perennials (Dubois 2005; Dechamps *et al.* 2011). With a longer vegetative growth prior to flowering, NMET from Luxemburg may therefore have an advantage in terms of biomass production. It would however be relevant to confirm this by performing a field trial in a growth cycle following the dominant natural cycle of the plant (germination in autumn, vernalisation, flowering and harvest in late spring/early summer). In sum, while most studies focus on the use of CAL populations (Koopmans *et al.*, 2008; Maxted *et al.*, 2007; McGrath *et al.*, 2006), the relative advantage of NMET populations for biomass production and resistance to herbivory should be taken into account and further studied.

GAN population was, as expected (Zhao *et al.*, 2003), a better performer for Cd phytoextraction. With Cd shoot concentrations about 2 to 3 times higher than in NMET plants in our essays, the advantage of the high Cd CAL populations from South of France in terms of Cd accumulation is clear. Although Cd is generally the main target element with phytoextraction, Zn is also an element of environmental concern which should also be

considered when evaluating the efficiency of phytoextraction with *N. caerulescens*. Numerous urban sites contaminated with trace metals are above thresholds for Zn in Brussels as other urban areas in the world (Imperato *et al.*, 2003; Kachenko and Singh, 2006; Li *et al.*, 2001). This study has confirmed for the first time in field trials the interest of using NMET populations of *N. caerulescens* for Zn phytoextraction. Their higher potential for Zn extraction had already been shown (Meerts and van Isacker 1997; Escarré *et al.* 2000) but had never been tested in the field. The average metal uptake of NMET was 27 kg Zn ha<sup>-1</sup>, compared to 11 kg Zn ha<sup>-1</sup> for GAN. The advantage of the NMET ecotype over GAN appears more markedly at GR with the highly available Zn content in the soil and higher plant accumulation. At MAS with higher mortality and lower Zn bioavailability, the difference between GAN and NMET is still significant but less pronounced.

Comparing phytoextraction efficiency with previous field trials is difficult because of the variability of soil conditions, cultural practices and lengths of growth (from 2 to 14 months). However metal uptake is still mostly dependent on soil metal concentrations as can be seen when plotting Cd and Zn uptake versus corresponding soil concentrations from this study and selected field trials from the literature which all used the GAN ecotype (for similar initial concentrations *i.e.* Cd < 10 mg.kg<sup>-1</sup>, Zn < 1200 mg kg<sup>-1</sup>) (Hammer and Keller, 2003; Maxted *et al.*, 2007; McGrath *et al.*, 2006) (Fig. 3). This comparison shows first that in spite of the advantage of GAN population for Cd extraction (*e.g.* at GR 0.20 kg.ha<sup>-1</sup> vs 0.14 kg.ha<sup>-1</sup> for NMET), initial soil concentration is the main determining factor of the level of Cd uptake. The advantage of NMET on GAN for Zn uptake occurs particularly at GR where GAN uptake is slightly above the general trend while NMET uptake is markedly higher than in any other field trial with GAN. The dependence of Zn uptake on the initial soil concentration is also clear though with more variability probably explained by differences in bioavailability.



**Figure 3.** Metal uptakes of *Noccaea caerulescens* as a function of Cd and Zn soil concentrations. Data were collected from the 3 main field trials found in the literature (solid circles) with soil concentrations Cd < 10 mg.kg<sup>-1</sup>, Zn < 1200 mg.kg<sup>-1</sup> (Hammer and Keller 2003 n=2, McGrath *et al.* 2006 n=8, Maxted *et al.* 2007 n=6), and from the present study at MAS and GR sites with nonmetallicolous populations (open squares) and calamine “Ganges” population (open triangles).



The results of our comparison of CAL and NMET ecotypes suggest interesting research perspectives in terms of population or cultivar selection. It appears that life history traits and the adaptation to biotic pressure are as much relevant as metal-related traits (*e.g.* accumulation), and that all should be considered when trying to select for ideotypes for phytoextraction. There is a clear interest in selecting, for example, for higher individual biomass among and within populations judged most suitable for phytoextraction, given the large inter- and intra-pop variation in biomass production (Meerts and van Isacker, 1997; Molitor *et al.*, 2005). Furthermore, considering the relative genetic proximity between MET and NMET populations from South of France within one divergent genetic unit (Jiménez-Ambriz *et al.*, 2007; Gonneau *et al.*, 2017), it can be expected that the latter accumulate more Cd than NMET from Luxemburg, even if it is still less than GAN population (Escarré *et al.*, 2000). With the relative advantage of the NMET ecotype in terms of suitability for field conditions with moderate soil contamination, it may then be worth testing NMET populations from South of France for Cd phytoextraction to combine advantages of high Cd accumulation and resistance to biotic stress.

#### 4.2. Effect of soil amendment

The addition of compost had mostly negative effects on the phytoextraction efficiency. In addition to a slight diluting effect, there was a clear immobilisation of trace metals by the organic matter as reflected by the lower exchangeable concentrations in the compost treatment. It resulted in relative diminution of shoot concentration in Cd (- 35%), Ni (- 40%) and Zn (- 15%) compared to the control at MAS site. Similar effect of organic amendments were reported for other Cd or Ni hyperaccumulators (Álvarez-López *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2010). Probably due to higher bioavailability of trace metals and to the naturally high content in coal and organic matter at GR (18%), such effect was not observed on that site. The slightly positive effect of compost on individual biomass production for the two NMET populations did not balance this negative impact. This weak effect may be related to the high soil fertility in itself (in the case of GR) and to an inappropriate timing of compost addition that did not permit sufficient compost maturation. GAN plants yielded however lower total biomass production on compost at GR and hence lower global metal uptake. This negative effect of compost on GAN survival is not well understood but a possible explanation might be the detrimental effect of a greater soil water retention capacity on plants normally living in a drier climate and on well-drained substrates and therefore inducing a higher mortality caused by pathogens or herbivores. This hypothesis is supported by the fact that there was an average increase of soil moisture by 20% on the compost treatment compared to the control.

In conclusion, benefits of organic amendments for biomass production were tenuous or even absent in the two sites and did not mitigate the adverse effect of metal immobilisation as it

was the case in the study of Álvarez-López *et al.* (2016). On the whole, compost addition is most probably suitable for phytostabilisation to stimulate plant growth and mitigate toxic effects of soil trace metals (Vangronsveld *et al.*, 2009). In the case of phytoextraction, further research needs to be done to determine what would be an adequate compost use - timing of application, type of compost, quantity – and on which type of soil it could be favourable.

On the other hand, the fertilisation dose used in the second treatment was clearly not adequate to make any reliable conclusions on its potential since it had no general and coherent effect on fertility levels, plant growth and metal uptake. The fertility level at GR was actually already very high while at MAS other soil parameters might have limited plant growth. It would be necessary to test the effect of higher doses of fertilizers on plant growth and metal uptake.

### 4.3. Influence of soil on biomass and metal accumulation

In addition to the population effect, we observed a high variability of biomass production and metal accumulation between the two sites and among blocks within them. Globally, the individual metal uptake is mostly influenced by the combination of variables selected for explaining separately individual biomass and shoot concentration, which shows that both variables are determinant when trying to improve metal uptake efficiency. Soil parameters such as metal content (Zn, Cd and Pb) and texture (clay content) explain the biomass and metal accumulation differences within and among sites. Increasing soil Zn and Cd exchangeable concentrations are predictably positively impacting plant accumulation but also individual plant biomass in the case of Zn. Previous observations on the positive effect of Cd on *N. caerulescens* growth have been made (Pongrac *et al.*, 2009; Yanai *et al.*, 2006), while for Zn it has been mostly shown for MET populations but with no clear effect for NMET (Escarré *et al.*, 2000). Here we show a positive influence of increasing exchangeable Zn concentrations on the growth of both MET and NMET populations. However, there might be a threshold concentration above which Zn no longer stimulates plant growth as suggested by the negative correlation between plant Zn uptake and exchangeable concentration in the soil at GR (only significant for NMET plants). Such negative effect has already been observed at high and very high Zn concentrations (1000 and 8000 mg kg<sup>-1</sup>) (Dechamps *et al.*, 2007). Nevertheless, for NMET plants only, the adverse effect of increasing Zn concentrations at GR might be linked to the jointly increasing Pb concentrations up to a potentially toxic level (on average 400-500 mg.kg<sup>-1</sup> total Pb on both sites, up to 3000 mg kg<sup>-1</sup>). This negative effect did not impact MET plants which are more adapted to such levels of Pb contamination (Escarré *et al.*, 2000; Reeves *et al.*, 2001). Furthermore, within the range of clay content found on both sites (8 – 18 %), individual biomass tends to be higher on soils with more clay, either for chemical or physical reasons. Based on field observations, *N. caerulescens* thrives best on

well-drained soils with coarser texture. At these low percentages, clay influence on soil physics is probably weak while its effect on soil exchange complex and its capacity to retain major cations could be more important. This rather supports the hypothesis of a positive impact of clay in terms of chemical fertility. In a pot study, Yanai *et al.* (2006) showed an opposite effect of texture on Cd uptake by *N. caerulea*, but within a wider range of clay contents (2 - 40 %).

Besides differences of soil texture and of trace metal concentrations, other non-measured physical factors or organic contaminants could explain the remaining fraction of variation and the site effect. Our experimental design does not enable further analysis of the environmental influence on phytoextraction efficiency. This would require a large sample of sites with contrasted conditions to ensure sufficient heterogeneity and enable meaningful inference.

#### 4.4. Phytoextraction efficiency on urban soils

In the perspective of conversion of contaminated soils for urban agriculture, bioavailable contaminant stripping (BCS) (Hamon and McLaughlin, 1999) would be an adequate form of remediation. Therefore, in this context, it is relevant to evaluate phytoextraction efficiency by looking at its effect on bioavailable forms of soil trace metals. Relative diminutions in exchangeable forms of about 10% were recorded in the unplanted subplots, which could be explained by immobilisation and insolubilisation of the exchangeable fraction and partly lixiviation. When accounting for this effect in the other subplots, the maximum relative diminution that can be attributed to plant uptake were obtained with GAN for Cd (-17%) and with NMET for Zn (-23%) at GR, which is very close to what is expected based on plant metal uptake (-16% Cd for GAN and -27% Zn for NMET, based on 20 cm depth). Based on the results obtained at GR, Cd and Zn remediation of urban soils could be achieved within realistic timeframes (less than 5 years) in the case of moderate contamination (*i.e.* less than 2 and 200 ppm of exchangeable Cd and Zn in the soil), after choosing appropriate populations, which appears quite promising. However, BCS with *N. caerulea* seems realistic only in adequate growth conditions to enable sufficient biomass production. Indeed, at MAS, there were no decreases of soil exchangeable forms of Cd and Zn but instead significant increases (10%). This surprising result could be explained by the very low metal uptake, the solubilisation of less mobile forms and the decay of *N. caerulea* roots. A minimum plant uptake is needed to reach a significant diminution in the soil available fraction. Ideally, in addition to chemical extractions (*i.e.* with ammonium acetate-EDTA), the diminution of exchangeable forms should be further assessed on the long term – to let the soil solution reach a new equilibrium – by using techniques such as diffusive gradients in thin films (DGT) to mimic the re-supply of metals in the soil solution (Li *et al.*, 2014). Another way would be to

grow vegetable crops accumulating trace metals and use them as a test for metal phytoavailability (Keller and Hammer, 2004).

## 5. Conclusion

This field study has demonstrated the interest of using non-metallicolous populations of *N. caerulescens* for Zn phytoextraction. Their higher biomass production and Zn accumulation show the importance of reconsidering the choice of ecotype and/or population when selecting plants for phytoextraction. It appears from our results that phytoextraction with *N. caerulescens* could be an adequate option for both Cd and Zn remediation of urban soils moderately contaminated once sufficient dry matter production would be reached. Yet, it is unclear which conditions can enable sufficient plant growth for efficient extraction. Our results further suggest to test on various field contaminated soils the relative influence of soil characteristics on Cd and Zn uptake: metals of interest (Cd, Zn), metals with possibly negative effects (Cu and Pb) and other fertility parameters (texture, pH, major cations). Furthermore, the lack of clear information in field studies on the length and period of growth, the harvest stage or the planting density underlines the need to test growth cycles and basic cultural practices to optimize the process.

## Acknowledgements

This work was financially supported by the Regional Ministry for the Environment, Brussels, BE. A.J. is a research fellow of the Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (FRIA, Belgium). The authors gratefully acknowledge the regional administration (S. El Fadili, Bernard Lemaire and R. Rubert from Bruxelles Environnement) and the Contrat de Quartier Durable Bockstael for sites access, and the Centre d'Ecologie Urbaine for project coordination and help in the field.

---

# Chapitre 2

---

## Phytoextraction du Cd et du Zn avec *Noccaea caerulescens* pour la remédiation des sols urbains : influence de la fertilisation azotée et de la densité de repiquage

-

## Phytoextraction of Cd and Zn with *Noccaea caerulescens* for urban soil remediation: influence of nitrogen fertilization and planting density

Le premier chapitre a permis de démontrer l'avantage relatif des populations non-métallicoles luxembourgeoises à la fois pour la production de biomasse et pour l'accumulation du Zn par rapport à l'écotype Ganges, lui champion de l'accumulation du Cd. Les deux populations luxembourgeoises ne montraient pas ou peu de différences entre elles. Dans ce deuxième chapitre, il a donc été décidé de conserver une des deux populations luxembourgeoises (Wilwerwiltz) et de la comparer toujours avec la population Ganges mais cette fois pour tester la réponse à un traitement azoté, et à l'effet de la densité de repiquage. Il est en effet difficile de faire une conclusion claire de l'effet de la fertilisation sur base du premier chapitre, et l'azote étant l'élément agissant en général le plus sur la biomasse végétative, il a été choisi comme traitement à étudier. Par ailleurs, les effets de compétition ou de couverture du sol n'ayant encore jamais été testés, deux densités de repiquage différentes sont comparées dans cette expérience.



## Phytoextraction of Cd and Zn with *Noccaea caerulescens* for urban soil remediation: influence of nitrogen fertilization and planting density

Arnaud Jacobs, Léna De Brabandere, Thomas Drouet, Thibault Sterckeman, Nausicaa Noret

*Published in Ecological engineering, 2018, 116: 178–187*

### Abstract

Phytoextraction field trials with *Noccaea caerulescens* were conducted in Brussels (Belgium) to investigate the benefits of nitrogen fertilization and planting density on phytoextraction efficiency. Both metalicolous (Ganges) and non-metallicolous (NMET, Luxembourg) populations were grown for 6 months in an urban wasteland and in a vegetable garden contaminated with trace metals at two planting densities (50 and 100 plants.m<sup>-2</sup>, D50 and D100), with and without mineral nitrogen fertilizers. Trials showed that *N. caerulescens* responded positively to nitrogen fertilization through increased biomass production. However due to lower concentrations in Cd and Zn in fertilized plants, the total metal uptake was differently impacted by fertilization: on one site metal uptake was enhanced while on the other it was reduced. Moreover fertilization had collateral effects as enhancing fungal pathogen development. The effect of planting density of *N. caerulescens* assessed in this work for the first time highlighted a clear competition between individuals at higher density – proved by lower individual biomass – but the highest metal uptake was nevertheless achieved at the highest density of 100 plants.m<sup>-2</sup> because of higher total biomass. Six months after harvest soil exchangeable concentrations were reduced by about 25% for Cd with Ganges population and by 9% for Zn with the NMET population on the best treatment (N fertilized and D100). The feasibility of using *N. caerulescens* for bioavailable contaminant stripping of moderately contaminated soils was confirmed for Cd and to a lesser extent for Zn.

**Keywords:** Cadmium, Nitrogen fertilization, Trace Metals, Hyperaccumulation, Phytoremediation, Zinc

## 1. Introduction

Among the different phytoremediation approaches, phytoextraction of metals and metalloids is suggested as a promising eco-friendly technique to remediate soils moderately contaminated with trace elements (Vangronsveld *et al.* 2009; Li *et al.* 2012). The main approach that has so far been investigated relies on the use of crops or trees tolerant to above-threshold soil metal concentrations which produce high biomass of low/moderate metal content with a valorization potential in bioenergy (Evangelou *et al.* 2015). Successive croppings slightly decrease soil metal concentrations through metal accumulation in plants and most importantly allow the economic valuation of polluted soils (Dickinson *et al.* 2009; Mench *et al.* 2010). The second approach relies on the use of hyperaccumulator plants which are undomesticated wild species accumulating about 100 times more metals in shoots compared to normal plants, at concentrations above defined thresholds when grown in their natural habitats, *i.e.* 100  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  for Cd, 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  for Ni or 3000  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  for Zn, on a dry weight basis (Krämer, 2010; van der Ent *et al.*, 2013). In this second approach, the aim is to decrease soil metal concentrations to allow future re-use of the soil; this can only address substrates with moderate total and highly available trace metal concentrations (Hammer and Keller, 2003; Zhao *et al.*, 2003), *e.g.* less than 10<sup>3</sup> and 10 mg kg<sup>-1</sup> of soil total Zn and Cd, respectively. The related concept of bioavailable contaminant stripping – which aims at removing the bioavailable metal pool – is however thought to be a more realistic alternative (Hamon and McLaughlin 1999) specifically in the case of conversion of wastelands for urban agriculture and on agricultural lands marginally contaminated (Dickinson *et al.* 2009). Despite over 20 years of research on phytoextraction using hyperaccumulators, large-scale field trials which test basic cultural practices such as fertilization, length of growth or irrigation are however still lacking (Dickinson *et al.* 2009; Mench *et al.* 2010; Robinson *et al.*, 2015).

*Noccaea caerulescens* (Brassicaceae, formerly *Thlaspi caerulescens*), is a well-known Zn, Cd, Ni hyperaccumulator (Reeves *et al.* 2001). Three ecotypes have been described: metallicolous plants naturally grow on soils enriched in Cd-Zn-Pb (calamine, CAL) and on serpentine sites (enriched in Ni), whereas non-metallicolous (NMET) grow on uncontaminated soils (Reeves *et al.* 2001). These ecotypes differ in many ways, both for metal-related traits like tolerance and accumulation (Meerts and Van Isacker, 1997; Escarré *et al.*, 2000) and for life cycle strategies (Dechamps *et al.* 2011; Sterckeman *et al.* 2017) or breeding systems (Mousset *et al.* 2016). The relative advantage of southern France CAL populations for Cd extraction has been demonstrated early on (Lombi *et al.*, 2000; Schwartz *et al.* 2003; Zhao *et al.*, 2003). Zinc and Ni uptake are higher in NMET in both pot experiments (Meerts and Van Isacker, 1997; Sterckeman *et al.* 2017) and field conditions (Jacobs *et al.*, 2017). Moreover NMET have the

advantage of being more resistant to herbivory than CAL (Noret *et al.*, 2007), resulting in lower mortality rates and higher individual biomass in field conditions (Jacobs *et al.*, 2017).

The lack of field trials assessing the best cultural practices for *N. caerulescens* is still the major limit for large scale application of the technique and assessment of its real remediation potential (McGrath *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2012) contrarily to the use of high biomass and domesticated plant species (Mench *et al.*, 2010). We have shown in a previous study that biomass production as high as 5 t.ha<sup>-1</sup> was achievable in the field but was highly dependent on growth conditions, metal content and nutrient supply (Jacobs *et al.*, 2017). Previous field trials also had variable yields ranging from 1 to 3 t.ha<sup>-1</sup> without obvious explanations on the large variations in biomass (Hammer and Keller, 2003; McGrath *et al.*, 2006; Maxted *et al.*, 2007; Simmons *et al.*, 2015; Tlustoš *et al.*, 2016; Sterckeman and Puschenreiter, 2018).

One unknown variable is the planting density required for optimal phytoextraction with *N. caerulescens*. In most field studies an arbitrary density of either 50 (McGrath *et al.*, 2006; Maxted *et al.*, 2007) or 100 plants.m<sup>-2</sup> is used (Hammer and Keller, 2003). The interest for comparing planting densities is justified by their effect on competition between plants for light, water, and uptake of nutrients and trace metals. The latter is particularly interesting as the species is known to have a metal-foraging behaviour, i.e. enhanced root allocation in metal-enriched soil patches (Whiting *et al.*, 2000; Dechamps *et al.*, 2008). Increased soil exploration through increased root proliferation due to competition (Hodge, 2004) might enhance metal uptake of closely interacting individuals. To the best of our knowledge, this hypothesis has however never been tested. Another factor linked to planting density is the strong effect of weed competition, especially in the spring when seedlings do not cover the surrounding soil. On the other hand, for practical implementation of phytoextraction and upscaling, there is an interest of transplanting fewer seedlings for limiting costs of production and transplantation.

How nitrogen fertilization influences growth and metal accumulation of *N. caerulescens* has so far been tested in both hydroponics and pot experiments, but never in field conditions. Most studies showed a positive effect of N addition on *N. caerulescens* growth (Bennett *et al.*, 1998; Schwartz *et al.*, 2003; Sirguy *et al.*, 2006; Monsanto *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2009) (see Table 1). The increase in biomass can be as high as +120-140% with high nitrogen inputs (86-150 mg N kg<sup>-1</sup> dry soil (DS)) (Monsant *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2009), while with 31 mg N kg<sup>-1</sup> DS (considered by the authors as equivalent to 110 kg N ha<sup>-1</sup>) the increase is more tenuous (+15-30%) (Sirguy *et al.*, 2006). It is worth noting that in all experiments N treatments resulted in lower Cd and/or Zn shoot concentrations, with a stronger reduction obtained with ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) compared to nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Schwartz *et al.*, 2003; Sirguy *et al.*, 2006; Monsanto *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2009; Monsanto *et al.*, 2010). This difference of uptake



between nitrogen forms is neither linked to pH nor to organic acids in the rhizosphere (Monsant *et al.*, 2010; White-Monsant and Tang, 2013). It is hypothesized that  $\text{NO}_3^-$  could increase cation uptake through root cell membrane polarization and enhance shoot translocation of metals compared to  $\text{NH}_4^+$  (Xie *et al.*, 2009; Monsant *et al.*, 2010). This effect partly compensates for the reduction in metal uptake. Interestingly, this pattern seems to be species-specific as for Cd accumulators *Carpobrotus rossii* and *Solanum nigrum* shoot Cd accumulation is greater with  $\text{NH}_4^+$  than with  $\text{NO}_3^-$  supply (Cheng *et al.*, 2016). On the whole, high nitrogen input has a strong effect on *N. caerulescens* biomass and therefore increases metal uptake (Xie *et al.*, 2009; Monsant *et al.*, 2010), while lower doses of nitrogen have no effect on metal uptake (Sirguy *et al.*, 2006). Fertilizing *N. caerulescens* with nitrogen has however never been directly tested in the field where possible negative effects could occur such as pathogens development or excessive weed growth. N fertilization with excessive doses can also alter water quality and ecosystem functioning. It is thus of high interest to test the effect of environmentally sensible inputs of nitrogen to a crop of *N. caerulescens*.

**Table 1.** Summary of experiments testing the effect of nitrogen fertilization on *N. caerulescens* growth and metal accumulation in pot or rhizobox trials with contaminated soil. The effect of fertilization on shoot biomass production and metal concentrations ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) are expressed as the percentage of increase (+) or decrease (-) obtained with N treatment compared to the control (no N addition). Cd concentrations were not measured in some studies.

	Length of growth (days)	N dose ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	N form	Biomass effect	Concentration effect	
					Cd	Zn
Bennett <i>et al.</i> 1998	140	25	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	+ 146%	/	ns
		50	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	+ 116%	/	ns
		100	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	+ 196%	/	- 43%
Schwartz <i>et al.</i> 2001 and 2003	70	80	$\text{NH}_4^+$	+ 85%	/	-34%
		80	$\text{NO}_3^-$	+ 118%	/	-26%
		200	$\text{NH}_4^+$	+ 108%	/	-50%
		200	$\text{NO}_3^-$	+ 180%	/	-28%
Sirguy <i>et al.</i> 2006	150	31	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	+ 31%	-36%	- 25%
Monsant <i>et al.</i> 2008	86	86	$\text{NH}_4^+$	+ 100%	/	- 27%
		86	$\text{NO}_3^-$	+ 125%	/	ns
Xie <i>et al.</i> 2009	100	150	$\text{NH}_4^+$	+ 72%	- 73%	- 80%
		150	$\text{NO}_3^-$	+ 141%	- 50%	- 66%

Contaminated agricultural land as well as urban and peri-urban wastelands could be adequate candidates for remediation by phytoextraction. Their frequently moderate contamination (Hough *et al.*, 2004; Joimel *et al.*, 2016), the need of non-destructive methods and the relatively low pressure on such areas could favour the use of ecological methods of remediation (Sterckeman and Puschenreiter, 2018). Moreover the small size, quite similar to vegetable crops such as corn salad, and short life cycle of hyperaccumulating plants are advantages for the remediation of small and enclosed urban surfaces where the use of larger perennial plants or trees is more difficult.

In order to improve phytoextraction efficiency with *Noccaea caerulescens* through increased biomass production and metal uptake, the objectives of this study were: (i) to test the effect of two planting densities (50 and 100 plants.m<sup>-2</sup>) and (ii) to investigate the benefits of nitrogen fertilization in field trials.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Site description

Trials were conducted on field plots in two sites located in Brussels, Belgium. *Masui* (MAS) (50°52'31"N, 4°21'40"E), is a wasteland lying on the old bed of the river Senne, which has been diverted and filled in the middle of the 20<sup>th</sup> century. Navez (NAV) (50°52'21"N 4°22'19"E), is a community vegetable garden located along a railway. Both sites are contaminated with trace metals most probably due to the poor quality of the embankment material (MAS), and to the railway activity (NAV). Topsoils of both sites are characterised by a neutral to slightly alkaline pH (NAV: 7.5 ± 0.2, MAS: 7.8 ± 0.1, mean ± SD) and a coarse texture (sandy loam). Climatic conditions during the 25 weeks of growth season (May–October 2015; recorded in Uccle, Royal Meteorological Institute) were the following: mean monthly temperature of 15.3 °C (ranging from 10.2 °C in October to 19.4 °C in August), mean monthly rainfall of 53.4 mm (ranging from 35.5 mm in July to 68.7 mm in August) and total rainfall during the growth period of 320 mm.

### 2.2. Experimental design and plant cultivation

*Noccaea caerulescens* seeds came from two populations: one non-metallicolous (NMET) from The Grand Duchy of Luxembourg, *Wilwerwiltz* (hereafter WIL) (Molitor *et al.*, 2005) whose seeds were produced in our botanical garden, and one metallicolous calamine *Ganges* (GAN, or 'Avinières') from St-Laurent-le-Minier, France (Escarré *et al.*, 2000). Seedlings of *N. caerulescens* were grown in growth chamber (20–22 °C; day-night cycles 12/12) for 3 months before transplantation in the field.

In each site, four experimental plots were set up (1 × 5 m), the soil was excavated to 30 cm depth, mixed with shovels on a tarpaulin, and then replaced to allow a thorough homogenisation of metal contamination. Initial fertilization was applied to all plots at high rates – as already used in previous phytoremediation experiments on industrial or mine soils (*e.g.* Lombi *et al.*, 2001b; Barrutia *et al.* 2009) – because of the very low fertility of abandoned wastelands soils (210 and 220 mg K, 65 and 100 mg Mg, 15 and 45 mg P kg<sup>-1</sup> of dry soil, as exchangeable ions measured 6 months before the experiment at MAS and NAV respectively). Baseline fertilization rates were calculated on a mass balance to reach soil macronutrient concentrations close to those measured on another phytoextraction experimental site where yields of 5 t ha<sup>-1</sup> were obtained on the best plots (Jacobs *et al.*, 2017) and were as follow: 330 kg K<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup> as potassium sulfate, 360 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup> as calcium phosphate and 650 kg MgO ha<sup>-1</sup> as magnesium sulfate (kieserite) for both sites. Plots were covered with perforated mulching film to reduce weed growth. Each plot was split into four

subplots (1×1 m) separated by 30 cm according to a split-plot design and each subplot was divided into two sub-subplots (0.5×1 m) to compare the two populations. Nitrogen fertilization was applied on two subplots as two times 50 kg N ha<sup>-1</sup> as NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (solution sprayed once in June and once in August), while the other two subplots were kept as control (no nitrogen addition). The two half plots were separated by a plastic coating down to 30 cm to prevent direct transfer of nitrogen fertilizer. Seedlings of *N. caerulea* (four leaves stage) were transplanted in May 2015 at two densities (50 and 100 plants m<sup>-2</sup>, hereafter D50 and D100) on each plot (two subplots of each density).

Plants were watered (5 L m<sup>-2</sup> every week if it had not rained the last 7 days) and plots were weeded twice a month. Flower stalks were systematically cut off to favour vegetative growth. Fungal development associated to root rot (most probably due to *Phytophthora* sp.) and later on white mould was identified on some plants during the growth. Dead individuals (due to fungal pathogens or herbivory) were collected, counted and weighed in August and September. All aerial parts of *N. caerulea* were harvested in October 2015 after 25 weeks of growth by cutting the plants at the root collar (leaving roots for decay in the soil). Aboveground biomasses of 65 °C-dried plants were measured for every sub-subplot, and the number of individuals was counted to determine the final survival rate. Survival at establishment was calculated as the sum of harvested plants and dead individuals collected minimum 3 months after establishment. Mean individual biomass was calculated by dividing total biomass by the number of surviving individuals at harvest.

### 2.3. Soil analysis

Soil samples were collected with a 2-cm diameter auger down to 30 cm depth at 13 points in each sub-subplot (0.5 m<sup>2</sup>) and bulked as one composite sample per sub-subplot at three different times: before cultivation (one day after baseline fertilization), at harvest and 6 months after the end of the experiment. All measurements – except those specifically mentioned – were carried out following standard protocols of soil analysis (Pansu and Gautheyrou, 2006). Soil samples were air-dried and sieved at 2 mm. Soil pH-H<sub>2</sub>O was measured using glass electrodes in a 1:5 soil:water suspension. Exchangeable cations (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>) were extracted with ammonium acetate (0.5 M) and EDTA (0.02 M) at pH 7 (Cottenie *et al.*, 1979) and their concentrations were measured with inductively coupled plasma emission spectrometer (ICP-OES) (Varian Vista-MPX). Organic matter (OM) content was measured by loss on ignition at 500 °C. The cation exchange capacity (CEC, cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>) was measured on a soil extract with cobaltihexamine trichloride according to the ISO standard 23470:2007. Particle size distribution (percentage of clay, silt and sand) was determined using wet sieving and the pipette method after OM

destruction with  $\text{H}_2\text{O}_2$  and Na citrate dispersion of clay. Undisturbed soil cores (2 per plot, 10 cm depth) were taken for bulk density measurements (cylinder method). The gravel charge of each plot was estimated as a mass percentage of gravel ( $> 2$  mm) in a soil sample taken down to 20 cm. Nitrogen status ( $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  exchangeable concentrations) was measured on 1 M KCl extract of fresh soil samples collected in July (one month after first nitrogen application) by the sulphanilamide colorimetric method for  $\text{NO}_3^-$  and indophenol blue method for  $\text{NH}_4^+$ . Total trace metal concentrations (Zn, Cd, Cu, Ni, Pb) were measured by tri-acid (HCl 37%,  $\text{HNO}_3$  65%, HF 40%) attack of finely ground soil samples on a hot plate at 70 °C during 48 h. The dry residue was re-dissolved with 1 mL  $\text{HNO}_3$  65% in a final volume of 30 mL and total element concentrations were determined by ICP-OES (Varian Vista-MPX). Method accuracy was checked with a NIST certified reference soil material (SRM 2711a, Montana II Soil; mean recovery rate of 97% and minimum of 84%).

#### 2.4. Plant analysis

Plants were thoroughly washed with deionized water, oven-dried at 65 °C for 48 hours and then ground with a Retsch ZM100 mill. Subsamples of 0.4 g were dry-ashed during 12 h at 450 °C and dissolved with concentrated  $\text{HNO}_3$  (65%). Concentrations in Cd, Cu, Ni, Pb, Zn and major elements (Ca, Fe, K, Mg, P) – expressed as  $\mu\text{g g}^{-1}$  of 105 °C-dried plant – were determined on triplicates with ICP-OES (Varian, Vista MPX). Method accuracy was checked on NIST standard reference (SRM 1547, Peach leaves; mean recovery rate of 96% and minimum of 80%). Plant metal uptake, *i.e.* metal mass in plants expressed in  $\text{g ha}^{-1}$ , was calculated as the product of total biomass and shoot Cd and Zn concentrations.

#### 2.5. Statistical analysis

Variations of biomass, plant elemental concentration and metal mass in plants were analyzed with four-way ANOVAs for each site separately with population, density, N treatment and plot as fixed factors. Post-hoc comparisons were performed using Tukey HSD test. Variations in mortality and survival rates were analysed by means of binomial generalized linear models (GLM). Comparisons between soil concentrations in trace metals before and after plant cultivation were conducted using Student paired t-tests. All statistical analyses were carried out with the R statistical software v. 3.1.2.

**Table 2.** Soil characteristics of the two experimental sites (Masui and Navez) after baseline fertilisation (K, Mg, P). All parameters were measured on samples taken before cultivation except for nitrogen which was analysed on samples taken during growth cultivation (July) (OM = Organic Matter; CEC = Cation-Exchange Capacity). Data are mean  $\pm$  standard error ( $SE = SD/\sqrt{n}$ , where SD is the standard deviation and n the number of measures, n = 4-32 depending on soil parameter). Different superscript letters for nitrogen forms indicate significant differences between treatments within experimental plots at the  $P < 0.05$  level (paired Student t-test).

		unit	MASUI	NAVEZ
<b>General parameters</b>				
	OM	%	4.9 $\pm$ 0.2	9.3 $\pm$ 0.2
	pH	/	7.79 $\pm$ 0.05	7.51 $\pm$ 0.03
	CEC	cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>	7.2 $\pm$ 0.8	15.4 $\pm$ 0.7
	Clay	%	7.8 $\pm$ 0.3	8.6 $\pm$ 0.7
	Silt	%	23 $\pm$ 1	21 $\pm$ 0.4
	Sand	%	69 $\pm$ 1	70 $\pm$ 0.5
	Soil density	kg dm <sup>-3</sup>	1.29 $\pm$ 0.01	1.12 $\pm$ 0.01
<b>Macroelements (exchangeable forms - EDTA-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> acetate)</b>				
	Ca	mg kg <sup>-1</sup>	5290 $\pm$ 24	5390 $\pm$ 23
	K	mg kg <sup>-1</sup>	277 $\pm$ 22	400 $\pm$ 21
	Mg	mg kg <sup>-1</sup>	175 $\pm$ 10	188 $\pm$ 7
	P	mg kg <sup>-1</sup>	21 $\pm$ 1	42 $\pm$ 2
<b>Nitrogen (exchangeable forms – KCl extract)</b>				
Control	NO <sub>3</sub>	mg kg <sup>-1</sup>	19 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	6.4 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>
	NH <sub>4</sub>	mg kg <sup>-1</sup>	0.54 $\pm$ 0.05 <sup>A</sup>	3.4 $\pm$ 0.3 <sup>A</sup>
Fertilized	NO <sub>3</sub>	mg kg <sup>-1</sup>	40 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	14.9 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>
	NH <sub>4</sub>	mg kg <sup>-1</sup>	0.77 $\pm$ 0.14 <sup>A</sup>	4.3 $\pm$ 0.2 <sup>B</sup>
<b>Total metal concentrations<sup>1</sup></b>				
	Cd	mg kg <sup>-1</sup>	2.2 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.1
	Cu	mg kg <sup>-1</sup>	230 $\pm$ 20	160 $\pm$ 8
	Pb	mg kg <sup>-1</sup>	500 $\pm$ 30	590 $\pm$ 50
	Zn	mg kg <sup>-1</sup>	710 $\pm$ 70	420 $\pm$ 30
<b>Exchangeable metal concentrations (EDTA-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> acetate)</b>				
	Cd	mg kg <sup>-1</sup>	0.43 $\pm$ 0.01	0.51 $\pm$ 0.01
	Cu	mg kg <sup>-1</sup>	34 $\pm$ 1	50 $\pm$ 2
	Pb	mg kg <sup>-1</sup>	87 $\pm$ 4	202 $\pm$ 7
	Zn	mg kg <sup>-1</sup>	56 $\pm$ 3	106 $\pm$ 3

<sup>1</sup> Legal thresholds in Brussels: Cd 2 mg kg<sup>-1</sup>, Cu 120 mg kg<sup>-1</sup>, Pb 200 mg kg<sup>-1</sup>, Zn 333 mg kg<sup>-1</sup>.

### 3. Results

Selected soil parameters of the two experimental sites are presented in Table 2. Total trace metal concentrations (Cd, Cu, Pb, Zn) were on average above regional thresholds on both sites except for Cd at NAV which was under the legal threshold. Topsoil at MAS had a slightly higher pH (7.8) than at NAV (7.5) with a lower organic matter content and CEC, and a higher density. Soil concentrations in  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  exchangeable forms measured during growth season after the first nitrogen application were significantly different between the fertilized treatment and the control (except for  $\text{NH}_4^+$  at MAS) (Table 2).

#### 3.1. Biomass and survival

The average yield obtained with *N. caerulea* aerial biomass including all treatments and populations was higher at NAV site ( $1.68 \pm 0.18 \text{ t ha}^{-1}$ , mean  $\pm$  SE) compared to MAS site ( $1.16 \pm 0.08 \text{ t ha}^{-1}$ ) ( $p < 0.01$ ). Results of total and individual biomass are presented in Figure 1; results of the analyses of variance are detailed in Table S1. For the sake of simplicity, only associated p values are indicated further in the text. On both sites WIL plants yielded higher total biomass than GAN plants ( $p < 0.1$  at MAS;  $p < 0.001$  at NAV), which is mostly explained at NAV by a higher individual biomass ( $p < 0.001$ ) and at MAS by a higher survival ( $p < 0.001$ ) (Table 3). N treatment had a significantly positive effect on biomass production – the average effect for both populations and densities being the strongest at NAV ( $2.2 \pm 0.2 \text{ t ha}^{-1}$  vs  $1.2 \pm 0.2 \text{ t ha}^{-1}$  for the control,  $p < 0.001$ ) compared to MAS ( $1.3 \pm 0.1 \text{ t ha}^{-1}$  vs  $1 \pm 0.1 \text{ t ha}^{-1}$  for the control,  $p < 0.05$ ) where N treatment was associated to a significantly lower survival at harvest (69%) compared to the control (77%) ( $p < 0.05$ ) (Table 2). This lower survival on the N treatment is mostly due to a higher mortality caused by fungal pathogens ( $p < 0.05$ ). Survival at harvest was also lower for GAN than for WIL plants, which in the case of MAS was mostly due to a lower establishment rate (75% vs 88%,  $p < 0.05$ ) caused by herbivore pressure (Table 3).

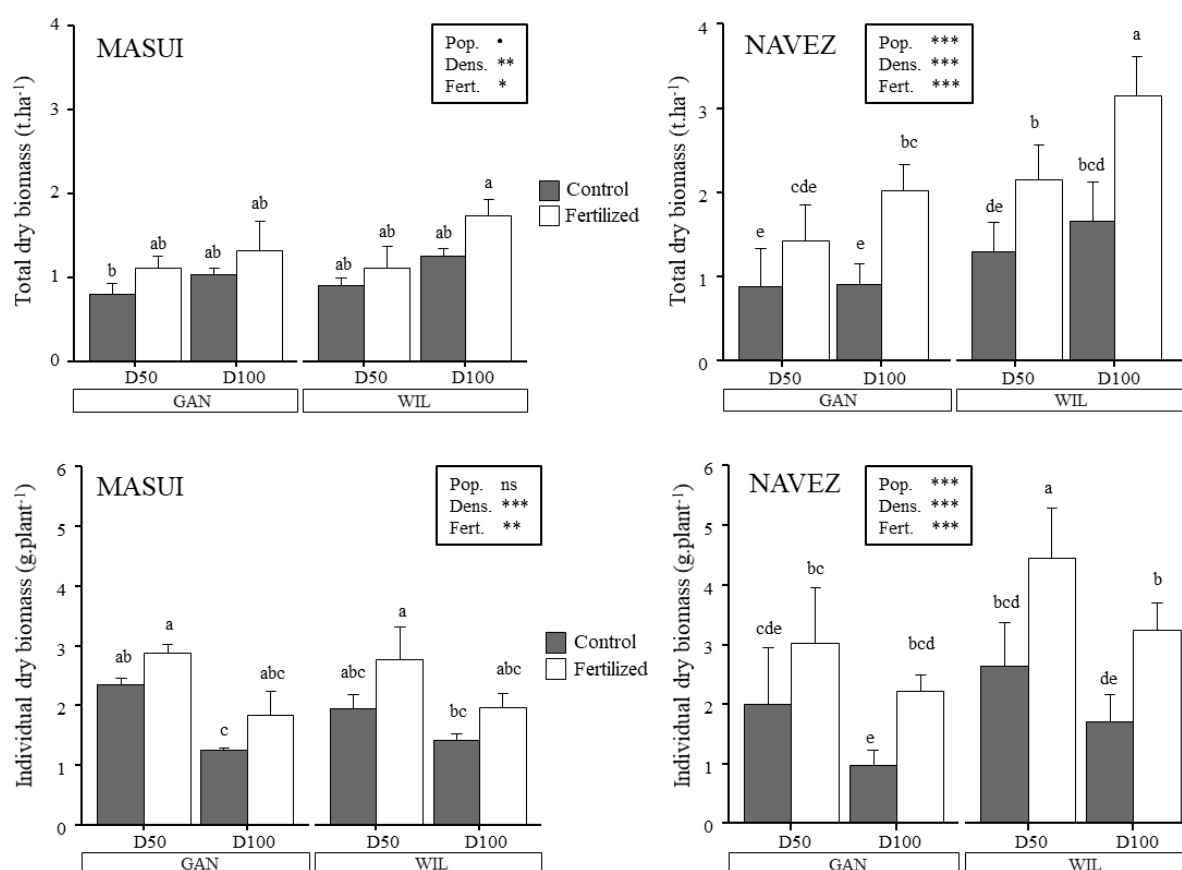
Planting density markedly influenced individual and total biomass, the lowest density (50 plants  $\text{m}^{-2}$ , D50) yielding higher individual biomass for both populations no matter the treatment (on average, at MAS:  $2.5 \pm 0.2 \text{ g plant}^{-1}$  vs  $1.6 \pm 0.2 \text{ g plant}^{-1}$  at D100,  $p < 0.001$ ; at NAV;  $3 \pm 0.4 \text{ g plant}^{-1}$  vs  $2 \pm 0.3 \text{ g plant}^{-1}$  at D100,  $p < 0.001$ ) and the highest density (100 plants  $\text{m}^{-2}$ ) yielding higher total biomass both on control and fertilized plots (+35% on average at MAS ( $p < 0.01$ ) and NAV ( $p < 0.001$ )) (Fig. 1, Table S1).

**Table 3.** Survival and mortality rates of two populations of *N. caerulescens* (one metalicolous Cd-accumulating population, GAN, and one non-metallicolous population, WIL), grown in two experimental sites (Masui and Navez). N fertilization treatment consisted of 100 kg N ha<sup>-1</sup> as NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Data are mean ± standard error ( $SE = SD/\sqrt{n}$ , where SD is the standard deviation and n the number of measures, n = 16). Different superscript letters indicate significant differences between populations (lower case) or treatments (upper case) at the P < 0.05 level (binomial GLM).

		Survival 3 months after establishment (%) <sup>*</sup>	Mortality by fungal pathogens (%) <sup>**</sup>	Survival at harvest (%)
MASUI	GAN	75 ± 4 <sup>a</sup>	12 ± 3 <sup>a</sup>	66 ± 4 <sup>a</sup>
	WIL	88 ± 3 <sup>b</sup>	9 ± 2 <sup>a</sup>	80 ± 3 <sup>b</sup>
	N fert.	79 ± 4 <sup>A</sup>	13 ± 3 <sup>A</sup>	69 ± 5 <sup>A</sup>
	Control	84 ± 4 <sup>B</sup>	8 ± 2 <sup>B</sup>	77 ± 4 <sup>B</sup>
NAVEZ	GAN	91 ± 2 <sup>a</sup>	10 ± 2 <sup>a</sup>	82 ± 3 <sup>a</sup>
	WIL	96 ± 1 <sup>b</sup>	7 ± 1 <sup>a</sup>	90 ± 2 <sup>b</sup>
	N fert.	94 ± 1 <sup>A</sup>	11 ± 2 <sup>A</sup>	84 ± 2 <sup>A</sup>
	Control	93 ± 2 <sup>A</sup>	6 ± 2 <sup>B</sup>	88 ± 3 <sup>B</sup>

<sup>\*</sup> Calculated as the sum of plants that survived establishment (harvested at the end or collected when dead min. 3 months after transplantation) divided by the total number of transplanted individuals.

<sup>\*\*</sup> Number of rotting plants collected divided by the number of plants that survived establishment



**Figure 1.** Total and individual dry biomass of *Noccea caerulescens* depending on populations (GAN and WIL), planting densities (D50: 50 plants/m<sup>2</sup> and D100: 100 plants/m<sup>2</sup>) and soil treatments (Fertilized with N and Control). Data are mean ± SE. Different superscript letters indicate significant differences at the P < 0.05 level; level of significance (\*\*\*P < 0.001; \*\*P < 0.01; \*P < 0.05; ·P < 0.1; ns, not significant) is indicated for factors Population (Pop.), Density (Dens.) and N Treatment (Fert.) (Detailed ANOVA results are presented in Table S1).

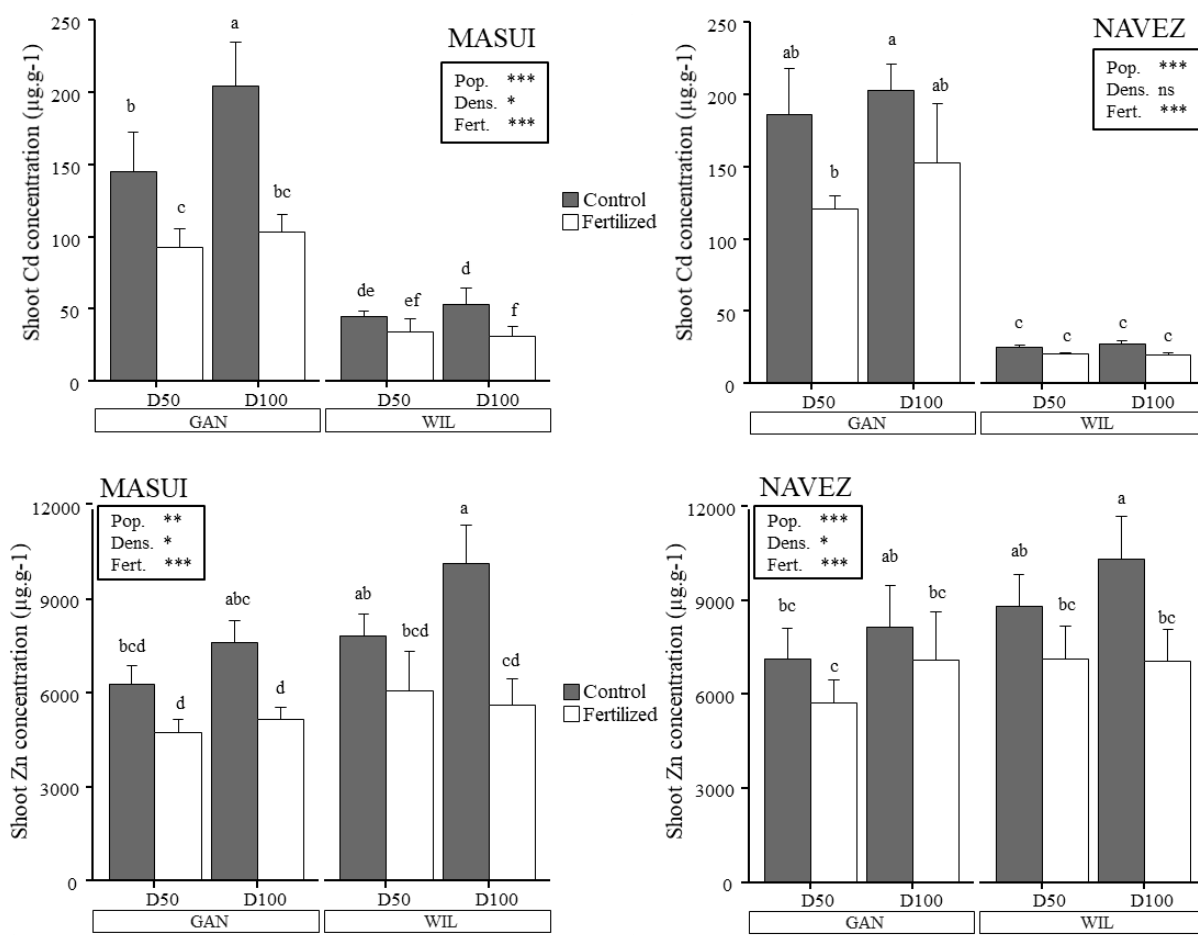


### 3.2. Metal shoot concentrations

Cd concentration was much higher in the metalicolous Cd-accumulating GAN population (from 100 to 200 mg kg<sup>-1</sup>) than in non-metallicolous Luxembourg WIL plants (from 20 to 54 mg kg<sup>-1</sup>) across treatments in both sites ( $p < 0.001$ ), while Zn concentration was slightly higher in WIL ( $7900 \pm 350$  mg kg<sup>-1</sup>) than in GAN ( $6500 \pm 250$  mg kg<sup>-1</sup>) individuals (MAS:  $p < 0.01$ , NAV:  $p < 0.001$ ) (Figure 2 and Table S1). Ni concentrations at MAS were higher in WIL ( $101 \pm 6$  mg kg<sup>-1</sup>) compared to GAN ( $60 \pm 3$  mg kg<sup>-1</sup>) ( $p < 0.001$ ), while there were similar in both populations at NAV ( $42$  mg kg<sup>-1</sup>) (Table S2).

Both Cd and Zn shoot concentrations were significantly decreased by the addition of N fertilizers ( $p < 0.001$ ) (Figure 2). For example, average Cd concentrations in N fertilized GAN plants ( $98$  and  $137$  mg kg<sup>-1</sup> at MAS and NAV respectively) were much lower than on the control ( $175$  and  $195$  mg kg<sup>-1</sup>). Ni shoot concentrations were also lower in N fertilized plants, mostly at MAS (on average for both populations and densities:  $71 \pm 5$  mg kg<sup>-1</sup> vs  $90 \pm 8$  mg kg<sup>-1</sup> on the control,  $p < 0.001$ ). Ca was the only macroelement being slightly less concentrated (-10%) in fertilized plants ( $p < 0.01$ ) (Table S2). In contrast, K, P and Cu concentrations were all significantly higher in fertilized plants (on average about +20% compared to the control) (Table S2). Other elements such as Mg, Fe and Pb did not show any difference between treatments.

Shoot concentrations in Cd and Zn were significantly higher in D100 compared to D50 for the two populations on both sites, except for Cd at NAV (Figure 2); *e.g.* at MAS for GAN plants, D100 vs D50:  $154 \pm 24$  vs  $119 \pm 17$  mg Cd kg<sup>-1</sup> ( $p < 0.05$ ),  $6400 \pm 490$  vs  $5500 \pm 450$  mg Zn kg<sup>-1</sup> ( $p < 0.05$ ). It was also the case for Ni at MAS only ( $86 \pm 7$  mg kg<sup>-1</sup> vs  $76 \pm 7$  mg kg<sup>-1</sup>,  $p < 0.05$ ) while there was no difference for major nutrients (Ca, K, P, Mg) and other trace elements (Cu, Pb) between densities (Table S2).



**Figure 2.** Shoot Cd and Zn concentrations in two populations (GAN and WIL) of *Nocca caerulea*, depending on planting densities (D50 and D100) and soil treatments (Fertilized with N and Control). Data are mean  $\pm$  SE. Different superscript letters indicate significant differences at the  $P < 0.05$  level; level of significance (\*\* $P < 0.001$ ; \* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ ;  $P < 0.1$ ; ns, not significant) is indicated for factors Population (Pop.), Density (Dens.) and N Treatment (Fert.) (Detailed ANOVA results are presented in Table S1).

### 3.3. Metal uptake and monitoring of soil exchangeable concentrations with cultivation

Results of total Cd and Zn uptake are presented in Figure 3 and results of the analyses of variance are detailed in Table S1. Individual and total Cd uptake were higher for GAN ( $0.28 \pm 0.03$  mg plant<sup>-1</sup> and  $171 \pm 23$  g ha<sup>-1</sup>) than for WIL plants ( $0.07 \pm 0.01$  mg plant<sup>-1</sup> and  $45 \pm 4$  g ha<sup>-1</sup>) ( $p < 0.001$ ). WIL plants yielded however higher individual and total Zn uptake ( $18.8 \pm 1.1$  mg plant<sup>-1</sup> and  $12.5 \pm 1.5$  kg ha<sup>-1</sup>) than GAN plants ( $12.6 \pm 1.5$  mg plant<sup>-1</sup> and  $7.6 \pm 1$  kg ha<sup>-1</sup>) ( $p < 0.001$ ). Despite higher individual Cd and Zn uptakes at D50 on both sites (about +35% at MAS ( $p < 0.01$ ) and +38% at NAV ( $p < 0.05$ ) compared to D100), the highest total Cd and Zn uptakes were achieved at D100 (+52% and +49% respectively compared to D50,  $p < 0.001$ ). N fertilization had contrasted effects on uptake depending on the site. At NAV, fertilization had a significantly positive effect on total Cd ( $146 \pm 42$  vs  $106 \pm 31$  g ha<sup>-1</sup>,  $p < 0.001$ ) and Zn uptake ( $15 \pm 2.5$  vs  $10.8 \pm 2.3$  kg ha<sup>-1</sup>,  $p < 0.001$ ) of both populations. On the other hand, at MAS, N fertilization had a significantly negative effect on Cd ( $77 \pm 13$  vs  $102 \pm 18$  g ha<sup>-1</sup>,  $p < 0.05$ ) and Zn ( $6.6 \pm 0.7$  vs  $7.8 \pm 0.9$  kg ha<sup>-1</sup>,  $p < 0.1$ ) uptake compared to the control.

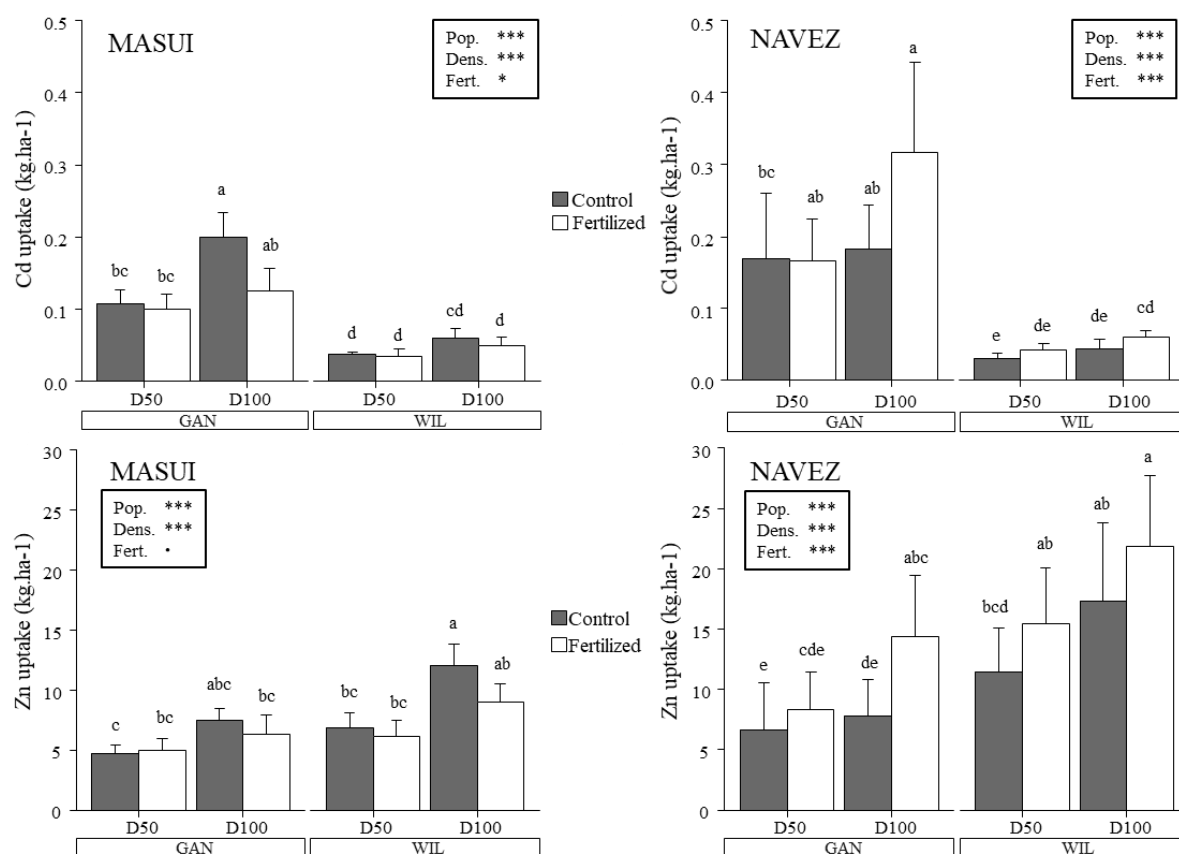
Based on plant uptake, we calculated the expected decreases in soil exchangeable concentrations in Cd and Zn with a mass balance using the following soil characteristics: depth of 20 cm, initial exchangeable metal concentration, soil bulk density and gravel charge of each plot (Table 4). The average decreases were relatively similar between MAS (Cd:  $-9 \pm 1\%$ ; Zn:  $-6 \pm 0.5\%$ ) and NAV (Cd:  $-11 \pm 2\%$ ; Zn:  $-5 \pm 0.6\%$ ), while maximal diminutions were on D100 fertilized plots with GAN for Cd ( $-27\%$  at NAV), and on D100 control (MAS) and fertilized (NAV) plots with WIL for Zn ( $-9\%$ ) (Table 4).

The effect of plant uptake was also confirmed by soil measurements, showing significant decreases of exchangeable soil concentrations in Cd and Zn (paired *t*-test,  $P < 0.001$ ; Table S3). Concentrations were measured at three sampling periods: i) before cultivation; ii) after cultivation (at harvest); and iii) six months after harvest. It appears that decreases measured right after harvest are overestimating plant uptake. After six months the decrease was much more proportional to plant uptake (Table S3), especially for Cd, while for Zn the relative decrease slightly overestimated plant uptake. Maximal decreases were measured at NAV on D100 plots with N fertilization,  $-22\%$  Cd with GAN and  $-12\%$  Zn with WIL. There was no significant difference in exchangeable soil concentrations in Cu and Pb before cultivation and six months after harvest (at MAS  $34 \pm 1$  vs  $33 \pm 1$  mg Cu kg<sup>-1</sup> and  $87 \pm 4$  vs  $85 \pm 4$  mg Pb kg<sup>-1</sup>, at NAV  $50 \pm 2$  vs  $51 \pm 2$  mg Cu kg<sup>-1</sup> and  $202 \pm 7$  vs  $196 \pm 5$  mg Pb kg<sup>-1</sup>; paired *t*-test  $p > 0.1$ ), while they were significantly lower at harvest by about 15% (at MAS  $29 \pm 1$  and  $76 \pm 3$  mg kg<sup>-1</sup>; at NAV  $42 \pm 1$  and  $70 \pm 6$  mg kg<sup>-1</sup> for Cu and Pb respectively; paired *t*-tests,  $p < 0.001$ ).

**Table 4.** Phytoextraction efficiency expressed as expected changes in soil Cd and Zn exchangeable concentrations after cultivation of two populations of *N. caerulescens* on two experimental sites (Masui and Navez) based on plant uptake<sup>1</sup> (negative values indicate a decrease of soil exchangeable concentrations) depending on planting densities (D100 and D50) and soil treatments (Fertilized with N and Control). Data are mean ± standard error (n = 4 plots of 0.5 m<sup>2</sup>).

		Relative change in soil exchangeable concentrations based on plant uptake (%)				
		Masui		Navez		
Pop.	Dens.	Treat.	Cd	Zn	Cd	Zn
GAN	D100	Fert.	-12 ± 4	-5 ± 2	-27 ± 10	-6 ± 2
		Cont.	-20 ± 4	-7 ± 2	-18 ± 6	-3 ± 1
	D50	Fert.	-10 ± 2	-4 ± 1	-15 ± 4	-3 ± 1
		Cont.	-11 ± 2	-4 ± 1	-16 ± 8	-3 ± 2
WIL	D100	Fert.	-5 ± 1	-7 ± 1	-5 ± 1	-9 ± 2
		Cont.	-6 ± 1	-9 ± 1	-4 ± 1	-7 ± 2
	D50	Fert.	-3 ± 1	-4 ± 1	-4 ± 1	-6 ± 2
		Cont.	-4 ± 0.3	-5 ± 1	-3 ± 0.1	-5 ± 1

<sup>1</sup> Calculation based on plant metal uptake (kg.ha<sup>-1</sup>) and the following soil characteristics: depth of 20 cm, plot soil bulk density and gravel charge.



**Figure 3.** Cd and Zn uptake of *N. caerulescens* depending on populations (GAN and WIL), planting densities (D50 and D100) and soil treatments (Fertilized with N and Control). Data are mean ± SE. Different superscript letters indicate significant differences at the P < 0.05 level; level of significance (\*\*\*P < 0.001; \*\*P < 0.01; \*P < 0.05; P < 0.1; ns, not significant) is indicated for factors Population (Pop.), Density (Dens.) and N Treatment (Fert.) (ANOVA, Table S1).

## 4. Discussion

### 4.1. Effects of nitrogen fertilization on biomass and survival

One of the main objectives of this field experiment was to test the effect of adding mineral nitrogen fertilizer ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) to a phytoextraction crop of *N. caerulescens*. Although previously tested in pot experiments (Schwartz *et al.*, 2001; Sirguy *et al.*, 2006; Monsanto *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2009), N fertilization had so far never been directly tested in the field. The application of environmentally sensible inputs of nitrogen fertilizers ( $100 \text{ kg ha}^{-1}$ , equivalent to  $30 \text{ mg N kg}^{-1}$  dry soil (DS)) had a clear positive effect on biomass production, with varying degree of magnitude depending on the site. It led to a mean biomass gain of about 30% at MAS and of more than 80% at NAV. The difference of effect between the two sites may be partly explained by the initial difference of nitrogen fertility ( $19 \text{ mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$  at MAS vs  $6 \text{ mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$  at NAV on average), but also by other limiting site factors at MAS that prevented good growth. Due to a high density of gastropods (snails and slugs) probably causing the lower survival at MAS site, and relatively unfavourable soil properties – high soil density ( $1.3 \text{ kg dm}^{-3}$ ) in comparison to other urban organic soils (around  $0.8\text{-}1.1 \text{ kg dm}^{-3}$ ) and high pH (7.8) – average yields were globally low on that site ( $1.2 \text{ t ha}^{-1}$ ). The influence of soil density and permeability on *N. caerulescens* growth has however never been tested. At NAV, average yields were higher ( $1.7 \text{ t ha}^{-1}$ ) but still under the  $3 - 5 \text{ t ha}^{-1}$  that have been reached in another contaminated site (Jacobs *et al.*, 2017). Yields of  $3 \text{ t ha}^{-1}$  were only obtained at NAV with NMET plants on fertilized plots at D100. Results from the present study are coherent with pot trials which showed biomass increases above +100% but for high doses of nitrogen (from  $80$  to  $200 \text{ mg N kg}^{-1}$  DS) (Schwartz *et al.*, 2001; Monsanto *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2009) while for low doses ( $30 \text{ mg N kg}^{-1}$  DS) biomass increase was reduced to +15-30% (Sirguy *et al.*, 2006).

In addition to this expected effect on biomass production, the addition of N fertilizers had noticeable effects on the development of fungal diseases (Table 3). Among plants that survived establishment, N fertilized plots had a mortality rate almost twice as important (12.3%) compared with unfertilized plots (6.7%), linked to a higher prevalence of plants affected by fungal pathogens causing root rot. Cases of fungal diseases affecting *N. caerulescens* in field trials have already been reported and identified as *Pythium sp.* (Maxted *et al.*, 2007) or *Phytophthora sp.* (Simmons *et al.*, 2015). The two sites of the present study were used for the second consecutive year for phytoextraction trials (see Jacobs *et al.*, 2017). We hypothesize that successive crops of *N. caerulescens* foster soil fungal pathogen development and this effect might be enhanced by the application of synthetic fertilizers as

already observed for many crops (Walters and Bingham, 2007), which raises the question of the need for rotation.

Survival at establishment was also influenced by herbivore damage and was lower for MET plants (83% vs 92% for NMET) which also showed more visual symptoms of herbivory (leaf damage). This suggests that MET plants are more sensitive to herbivores than NMET plants in field trials, as already previously observed (Noret *et al.* 2007, Jacobs *et al.* 2017).

#### 4.2. Effects of nitrogen fertilization on trace metal accumulation and uptake

Concerning the effect of N fertilization on metal uptake, it is worth taking into account both shoot concentrations (to study the effect on accumulation) and total metal uptake to consider the global effect of fertilizers on phytoextraction efficiency. N fertilized plants showed Cd and Zn shoot concentrations systematically lower compared to the control, by about 30% on average. This discrepancy might partly be due to a diluting effect of accumulated metals within larger plants. However, this diluting pattern is only observed for hyperaccumulated trace elements (Cd, Ni and Zn) and to a lesser extent for Ca, but neither for other trace elements (Cu and Pb) nor for major nutrients (Fe, K, P, Mg). Moreover, Lovy *et al.* (2013) did not observe any Cd dilution with plant growth in *N. caerulea* exposed to constant Cd concentrations in hydroponics. We put forward two alternative hypotheses to account for decreased Cd, Ni and Zn concentrations in N-fertilized plants. First, N forms (either  $\text{NH}_4^+$  or  $\text{NO}_3^-$ ) might compete with Cd and Zn for root absorption. As found by Xie *et al.* (2009) in a rhizobox experiment, N fertilization competes partly with Cd and Zn accumulation in *N. caerulea*,  $\text{NH}_4^+$  causing a stronger effect (Schwartz *et al.* 2001; Monsanto *et al.* 2008, 2010; Xie *et al.* 2009). This hypothesis remains to be mechanically explained and tested in field conditions with different forms of nitrogen. Secondly, the overall negative effect of nitrogen fertilization might also be partly explained by a lower root growth in N fertilized plants – not measured in this study – and hence a smaller soil volume explored (López-Bucio *et al.*, 2003; Morris *et al.*, 2017). The relationship between root mass and individual metal uptake has never been clearly tested with *N. caerulea*, but studies from Monsanto *et al.* (2008, 2010) and Xie *et al.* (2009) – besides showing the effects of various nitrogen forms on accumulation – tend to show a positive trend between root mass and individual metal uptake. This is also in line with Sterckeman *et al.* (2015) who showed that roots are the main driver of Cd accumulation in *N. caerulea*. Moreover, Rees *et al.* (2016) demonstrated that an increase of root surface after biochar addition resulted in an increased metal uptake. This could explain why plants fertilized with nitrogen, with a higher shoot/root ratio, have lower shoot metal concentrations compared to control plants.

The effect of nitrogen fertilization on total plant metal uptake (*i.e.* total metal mass in aboveground tissues) was contrasted between the two sites. At NAV, it globally enhanced Cd and Zn uptake for both populations of *N. caerulea* by about 40% on average. For Cd, the effect was stronger for the subplots with GAN at D100 with high uptake. On the contrary, at MAS, the addition of nitrogen had a slightly negative effect on Cd and Zn uptake (reduction by about 20%). This suggests that the potential benefit of adding N fertilizer mostly depends on the biomass increase: the decrease in shoot Cd and Zn concentrations was rather homogeneous (from 20 to 40%) in both sites while biomass increased from 20% up to 120%. This means that N fertilization is beneficial for phytoextraction efficiency if the biomass gain reaches at least 50%. Under this value, it would not be worth adding nitrogen. Initial fertility should therefore be evaluated to determine if N fertilization is necessary.

To conclude, it appears that N fertilization at environmentally-acceptable doses (100 kg N ha<sup>-1</sup>) can impact either slightly negatively or positively phytoextraction efficiency depending on initial soil N content and plant growth. It remains to be tested on a wider range of soil conditions with varying initial fertility. If growth is limited by other factors, like soil packing, N fertilization might be detrimental due to lower plant metal uptake and increased mortality due to fungal disease.

### 4.3. Effect of planting density

To the best of our knowledge, the present study is the first to test the effect of the planting density (50 and 100 plants/m<sup>2</sup>, D50 and D100) both on biomass production and metal uptake in *N. caerulea*. Studying the effect of planting density on phytoextraction efficiency implies considering different processes: i) Intra- and interspecific competition for light, water and nutrients affecting biomass production; ii) root competition between individuals for metal uptake potentially decreasing individual accumulation at high density. Interspecific competition was reduced in this study because of regular weeding and use of geotextile limiting weed growth. It appears from this trial that maximizing planting density does not necessarily result in a maximal biomass production because of probable intraspecific competition. The total biomass was higher at D100 compared to D50 (+35% on both sites) but was not doubled, which is accounted for by a higher individual biomass at D50 (+50%). This indicates that competition for resources (nutrients, water, light) between plants at D100 does probably occur. However, Cd and Zn concentrations were higher at D100 (by about 15-20%), which shows that there is no competition for metal uptake as it could have been expected. As for the increased biomass of fertilized plants, there might be some diluting effect in the shoots of larger plants at D50, but this diluting pattern is not found for other elements. Closely interacting plants at D100 might be forced to explore a larger volume of soil (Hess and De Kroon, 2007) and would therefore forage more metals. Combined to smaller

individual biomass – hence a lower shoot/root ratio – it may explain the higher metal concentrations in *N. caerulescens* individuals at D100. This hypothesis remains to be tested in a specific soil experiment where root mass, root surface and shoot accumulation would be measured. On the whole, individual Cd and Zn uptake is highest at D50 because of the larger plant biomass, while total uptake is still higher by about 50% at D100 because of the larger number of plants. We built a simple model with the assumption of a linear relationship of individual biomass and shoot Cd and Zn concentrations with planting density (between 50 and 150 plants m<sup>-2</sup>) (Figure S1). According to that model, a planting density of 100 plants m<sup>-2</sup> would maximize biomass production, while metal uptake would be highest at slightly higher density around 110 plants m<sup>-2</sup>. Since early ground cover is important to minimize weed competition, initial planting density could be high (at least 100 plants.m<sup>-2</sup>) with partial harvest at mid-season (*e.g.* one plant out of three or four harvested). A partial thinning could be done when plants reach sufficient size to compete, hence taking advantage of the positive competition in root foraging beforehand but also lowering competition for nutrients at the end of the season. This option could be beneficial since, according to Perronnet *et al.* (2003), Cd accumulation in *N. caerulescens* seems to be constant over three months of growth, while shoot Zn concentrations even decrease.

#### 4.4. Effect of plant metal uptake on soil metal concentrations

When measuring exchangeable soil concentrations (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> Ac. - EDTA) right after harvest of *N. caerulescens* we recorded average decreases as high as 18% for Cd and 15% for Zn. These results clearly overestimated metal uptake by plants which would lead to average decreases in soil concentrations of around 10% (Cd) and 5% (Zn) respectively (based on calculus taking into account plant uptake and initial exchangeable metal load in the soil). This discrepancy can mostly be explained by temporary immobilization of exchangeable forms by phosphate fertilizers (Kumpiene *et al.*, 2008; Thawornchaisit and Polprasert, 2009). There might also be some Zn and Cd sequestration in the remaining *N. caerulescens* roots later released with root decay but this effect was proven to be negligible (Martínez-Alcalá *et al.*, 2016) compared to the immobilization effect. The decrease of soil Cu and Pb concentrations – most sensitive to phosphate fertilizers (Cao *et al.*, 2003) – by on average 15% are consistent with the first hypothesis, especially knowing that Cu and Pb uptake by *N. caerulescens* is very low. Furthermore, 6 months after harvest, a second soil sampling was done on the trial plots. Decrease of soil exchangeable concentrations recorded at that time are much closer to plant uptake, on average -11% Cd and -9% Zn. As neither Cu nor Pb concentrations at that time were significantly different from initial measures, we can be rather confident that 6 months after harvest the initial equilibrium of metal forms was reached again. Based on our results, relevant estimation of phytoextraction efficiency would need to measure exchangeable



concentrations on a long term after phytoextraction (e.g. 6 months after the end of the culture). Moreover P fertilisation – if necessary – should be limited to moderate doses to prevent unwanted metal immobilisation. Considering the plant metal uptake obtained on the best treatment on each site (i.e. D100 control plots at MAS, and D100 fertilized plots at NAV), one harvest of *N. caerulea* could lower exchangeable Cd concentrations by 20% (MAS) up to 27% (NAV) with GAN ecotype, and Zn concentrations by 9% with NMET ecotype. In comparison, a long term experiment of Zn phytoextraction using tobacco and sunflower resulted in stronger decreases in labile soil Zn (0.1 M NaNO<sub>3</sub> extraction) of about 15-30% in one-year and 45-69% after 5 years (Herzig *et al.* 2014). However, Zn uptake in their experiment (4-9 kg Zn ha<sup>-1</sup> with sunflower, and 11-20 kg Zn ha<sup>-1</sup> with tobacco) was rather similar to this study (12 and 22 kg Zn ha<sup>-1</sup> with NMET on the best treatment of each site). Based on our results, we could multiply the extraction rates by the number of successive croppings in the case of a moderately contaminated soil (i.e. less than 2 and 200 ppm of exchangeable Cd and Zn). Bioavailable contaminant stripping (BCS) of Cd could in that case be achieved within realistic timeframes (within 5 years) which appears quite promising, while for Zn it would take about 10 to 15 years. As already concluded previously, BCS of Cd with *N. caerulea* seems more feasible than for Zn (Koopmans *et al.*, 2008; Sterckeman *et al.*, 2017). This relies however on the assumption of constant biomass production and extraction rates in successive croppings (linear extrapolation) which could be compromised by enhanced pathogen development in the absence of rotation. It would therefore be essential to test different scenarios of succession and rotation of phytoextraction crops in field conditions.

## 5. Conclusion

We demonstrated in field trials that N fertilization can be an efficient way of increasing phytoextraction efficiency (x 1.5) when applied on a soil with a low-N status at high planting density. This can be achieved with the condition of a sufficient gain of biomass caused by N fertilization. Yields appear to be highly variable depending on the site, and adequate soil conditions for cultivation remain undefined. The negative effect of nitrogen fertilization on Cd and Zn accumulation remains to be further studied. High planting density (100 pl. / m<sup>2</sup>) is the best way to maximize metal uptake, despite some competition effect, which could be avoided by performing thinning during the cultivation when plants grow well. Based on yields obtained in the best conditions – and once these would be maintained in successive croppings – phytoextraction with *N. caerulea* could be a feasible option for Cd – and to a lesser extent Zn – remediation of moderately contaminated soils.

## **Acknowledgments**

A.J. is a research fellow of the Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (FRIA, Belgium). The authors gratefully acknowledge the regional administration (Bruxelles Environnement) and Simon Rosillon (ICTFF) for site access, and the Centre d'Ecologie Urbaine for project coordination and help in the field. We are also grateful to Alexandre Van Baekel for his technical help in laboratory analyses and to Alvaro Poisson and David Bauman for their help on the field and fruitful discussions. We are grateful to two anonymous reviewers for constructive comments.

---

# Chapitre 3

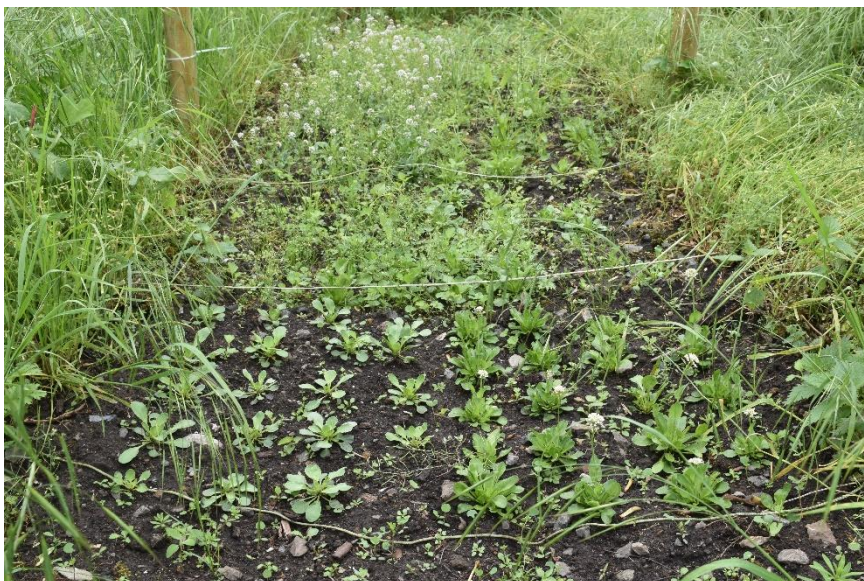
---

## Evaluation en champ de cycles de culture de *Noccaea caerulescens* pour l'amélioration de la phytoextraction du cadmium et du zinc

-

### Field evaluation of cultural cycles for improved cadmium and zinc phytoextraction with *Noccaea caerulescens*

Des différences certaines entre les populations NMET et Ganges en termes de production de biomasse et d'accumulation ont pu être mises en évidence sur le terrain dans les deux premiers chapitres de ce travail. Cependant, les cycles de vie et de culture de la plante n'ont encore jamais été considérés dans le cadre de la phytoextraction, alors même que : 1) de claires différences de stratégies de vie entre populations existent dans les sites naturels, 2) plusieurs études soulignent l'intérêt de développer des cultivars à haut rendement d'extraction, 3) il n'y a pas de consensus sur le cycle et la conduite de culture optimale pour *Noccaea caerulescens* (saison et mode d'installation, date et stade de récolte). Ce chapitre compare donc plusieurs saisons d'installation en semis et en repiquage, ainsi que deux durées de croissance pour les deux populations contrastées. L'importance de la variabilité de cycles de vie entre populations y est également discutée.



## Field evaluation of cultural cycles for improved cadmium and zinc phytoextraction with *Noccaea caerulescens*

Arnaud Jacobs, Thomas Drouet, Nausicaa Noret

*Published in Plant and Soil, 2018, 430: 381–394*

### Abstract

**Background and Aims** Adequate cultural cycles for phytoextraction with *Noccaea caerulescens* have never been investigated, whereas they directly influence biomass production. The aim of this study was to investigate the effects of the season of establishment, the seeding strategy (sowing *vs* transplantation) and the length of the growing season on biomass production and metal accumulation of *N. caerulescens*.

**Methods** A field trial was conducted on an urban wasteland contaminated with trace metals. Two populations with contrasted natural life cycles, one Cd-accumulating metalicolous (Ganges, GAN) and one non-metallicolous from Luxemburg (LUX), were compared in 6 cultural cycles.

**Results** Direct sowing in the fall yielded satisfying metal uptake (260 g Cd ha<sup>-1</sup> with GAN and 25 kg Zn ha<sup>-1</sup> with LUX), though lower than those obtained with transplantation (320 g Cd ha<sup>-1</sup> with GAN and 45 kg Zn ha<sup>-1</sup> with LUX) due to less biomass production (1.6 *vs* 3.2 t ha<sup>-1</sup>). Extending the growing period from 6 to 12 months was mostly beneficial for biennial LUX plants (with 3 times higher Zn uptake), than for annual GAN plants (with 1.5 times higher Cd uptake).

**Conclusions** The natural variation in life cycles – annual or biennial – of *N. caerulescens* should be taken into account when selecting cultivars for phytoextraction.

**Keywords:** Growth cycles, Hyperaccumulation, Life Cycles, Phytoremediation, Trace metals

## 1. Introduction

Phytoextraction with hyperaccumulating plants has long been described as a promising method for remediation of soils contaminated with trace metals (Chaney *et al.* 1997, McGrath *et al.* 2006, Robinson *et al.* 1998, Zhao *et al.* 2003). Among the various hyperaccumulator species, *Noccaea caerulescens* (formerly *Thlaspi caerulescens*, Brassicaceae) is the species which has the highest ability to uptake Cd, Zn and Ni, which makes it almost unique (Lombi *et al.* 2000, McGrath *et al.* 2006). After first promising results in the field more than 10 years ago (Hammer and Keller 2003, McGrath *et al.* 2006), the number of field trials using *N. caerulescens* has, however, been surprisingly very scarce. The main reason likely lies in the somehow deceiving results obtained in field compared to laboratory trials (Li *et al.* 2012), which is due to the difficulties to reach sufficient biomass in the field because of the sensitivity of this species to fungal pathogens and herbivores on the one hand, and to the lack of knowledge on adequate cultural practices on the other hand (McGrath *et al.* 2006, Maxted *et al.* 2007). Recently, phytoextraction field trials with *N. caerulescens* have been implemented to address the numerous uncertainties that remain, such as the long-term variation of metal extraction (Tlustoš *et al.* 2016), the potential of non-metallicolous populations for phytoextraction (Jacobs *et al.* 2017) and the effects of mineral fertilization (Jacobs *et al.* 2018).

The goal of phytoextraction research is to optimize extraction efficiency by maximizing the product of biomass and metal concentration in plants. With hyperaccumulating plants like *N. caerulescens*, the accumulation level is already very high as they can reach more than 100  $\mu\text{g Cd g}^{-1}$ , 1000  $\mu\text{g Ni g}^{-1}$  and 10 000  $\mu\text{g Zn g}^{-1}$  in dry shoots. Even if significant variations in metal accumulation exist among populations and ecotypes (Gonneau *et al.* 2014, Sterckeman *et al.* 2017), shoot concentrations tend to be limited to a physiological maximum (Escarré *et al.* 2013) and hence this factor cannot be greatly improved. There is, however, a large potential of improvement for the biomass factor (Schwartz *et al.* 2001, Sterckeman *et al.* 2017). The selection of high growth rate cultivars and the development of adequate cultural practices are the two main approaches to achieve this goal. The effects of fertilization and planting density were previously tested in Sirguy *et al.* (2006) and Jacobs *et al.* (2018). *N. caerulescens* being a wild undomesticated species, it is not clear how to maximize the biomass in terms of optimal length of growth and time of planting. Moreover, there is no evidence on which growth stage – or vegetative/reproductive biomass ratio – maximizes biomass and metal extraction for field-grown plants.

In Europe, *N. caerulescens* belong to three main edaphic groups or ecotypes: the calamine group (CAL) growing on soils highly enriched in Zn, Cd and Pb, the serpentine group (SER) found on Ni-rich soils derived from ultramafic rocks and the non-metallicolous (NMET)

populations growing on non-metalliferous sites (Escarré *et al.* 2000, Molitor *et al.* 2005, Reeves *et al.* 2001). In natural populations of Belgium, Luxemburg and South of France, two germination cohorts of *N. caerulescens* exist: a principal in the fall (or late summer) and a second in the spring (Dubois 2005, Dechamps *et al.* 2011). Vegetative growth then either takes place over the winter (fall cohort) or over the summer, fall and winter (spring cohort). Flowering occurs during the spring with fructification in May-June. Most individuals are monocarpic (semelparous) but their life cycle is variable from annual to short lived perennial; some individuals can even flower two consecutive years (iteroparous). In Belgium and Luxemburg, CAL plants are mostly winter annuals, while NMET populations tend to be semelparous (monocarpic) biennials (Dechamps *et al.* 2011). Interestingly, life cycle plasticity was demonstrated for CAL populations while it seems to be fixed for NMET (Dechamps *et al.* 2007, 2008). Moreover, there is a clear North-South division as in Mediterranean climate most individuals (CAL and NMET) are annuals, which underlines the importance of summer drought as a determinant of the life cycle strategy in this species (Jiménez-Ambriz *et al.* 2007). Natural life cycle greatly influences the time of flowering and the length of the pre-reproductive period, hence the reproductive status of plants at harvest in an annual crop. According to Assunção *et al.* (2003a), *N. caerulescens* requires a vernalisation of at least one month to induce flowering in greenhouse conditions. The threshold size for flowering is however unknown. Moreover, based on personal observations, flowering can also be induced after various stresses (drought, cold, transplantation, herbivory). It has been shown in both natural and controlled conditions that the length of the pre-reproductive period is longer for NMET than for CAL (Dechamps *et al.* 2011, Sterckeman *et al.* 2017). However, the full maturation of silicles is faster for NMET compared to CAL, and CAL populations have a much higher number of inflorescences (Sterckeman *et al.* 2017).

Two strategies can be implemented for plant establishment in the field: transplantation or direct sowing. For the phytoremediation of large surfaces it might be costly to grow transplants that would require an important workload for growing and transplanting. There is therefore a high interest for directly sowing seeds. Direct sowing of *N. caerulescens* was tested previously in the field with relatively low yield at harvest, on average half that when growing transplants (“Ganges” population; 0.8 t ha<sup>-1</sup> vs 1.5 t ha<sup>-1</sup> in Hammer and Keller 2003; 0.38 t ha<sup>-1</sup> vs 0.79 t ha<sup>-1</sup>, McGrath *et al.* 2006). There was no difference in shoot metal concentrations of sown plants compared to transplanted ones in the study of Hammer and Keller (2003). In the study of McGrath *et al.* (2006), higher Cd and Zn concentrations were measured in sown compared to transplanted individuals but these data were not obtained in the same season of growth which does not allow to explain these differences solely by different seeding strategies.

In the only trial testing how the length of the growing season influences biomass of CAL individuals of *N. caerulescens*, McGrath *et al.* (2006) highlighted significant effects of a longer growth (4 months *vs* 14 months) both on biomass (0.4 *vs* 2.1 t ha<sup>-1</sup>) and shoot Zn concentration (4900 *vs* 7670 mg kg<sup>-1</sup>) but not on Cd concentration. They did not, however, discuss the observed life cycle nor the reproductive status of the plants during their experiment. Moreover, little is known about the kinetics of accumulation during a phytoextraction culture. Lovy (2012) studied metal accumulation in *N. caerulescens* during three consecutive seasons, using the sum of temperatures (°C days) as a reference time unit. Cadmium concentrations in aerial parts of plants grown in soil tend to decrease gradually from the onset of flowering to the fruit maturity as leaves are ageing (Lovy 2012). Maximum biomass and Cd content was observed around 2100 °C days at the stage of mature fruits (Lovy 2012). Zn concentrations in *N. caerulescens* (Viviez, MET) leaves decreased gradually over three months of growth while Cd concentrations were constant (Perronnet *et al.* 2003). Metal concentrations in reproductive parts of *N. caerulescens* grown in soil have almost never been measured, apart from in Lovy (2012) who found no significant differences in Cd concentrations between aerial parts (basal leaves, bracts, stalks and silicles) at harvest.

Overall it is still required to design adapted cultural cycles that would maximize phytoextraction efficiency with *N. caerulescens* in a temperate climate. The objectives of the present study were to find the most adequate i) season of establishment (fall *vs* spring), ii) seeding strategy (direct sowing *vs* seedling transplantation) and iii) length of the growing season for efficient Cd and Zn phytoextraction with two contrasted populations of *N. caerulescens*, a high-Cd accumulating CAL and a NMET.

**Table 1.** Soil characteristics of the experimental site (20 cm depth, OM = Organic Matter, CEC = Cation-Exchange Capacity). Data are mean  $\pm$  standard error (n = 12 to 32 unless specifically mentioned), after Jacobs *et al.* 2017.

variable	unit	value
General parameters		
OM	%	19.6 $\pm$ 1.2
pH	/	7.3 $\pm$ 0.05
CEC	cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>	28 $\pm$ 1.4
Clay	%	15 $\pm$ 0.9
Silt	%	30 $\pm$ 1.7
Sand	%	54 $\pm$ 2.3
Soil density <sup>a</sup>	g cm <sup>-3</sup>	0.80 $\pm$ 0.03
Gravel charge <sup>b</sup>	g/g %	33 $\pm$ 9
Nitrogen (mineral forms – KCl extract)		
NO <sub>3</sub>	mg kg <sup>-1</sup>	27.5 $\pm$ 2.5
NH <sub>4</sub>	mg kg <sup>-1</sup>	1.1 $\pm$ 0.2
Macroelements (exchangeable forms - EDTA-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> acetate)		
Ca	mg kg <sup>-1</sup>	5880 $\pm$ 120
K	mg kg <sup>-1</sup>	430 $\pm$ 12
Mg	mg kg <sup>-1</sup>	210 $\pm$ 8
P	mg kg <sup>-1</sup>	20 $\pm$ 1
Total metal concentrations		
Cd	mg kg <sup>-1</sup>	1.9 $\pm$ 0.4
Cu	mg kg <sup>-1</sup>	190 $\pm$ 40
Pb	mg kg <sup>-1</sup>	1360 $\pm$ 730
Zn	mg kg <sup>-1</sup>	520 $\pm$ 70
Exchangeable metal concentrations (EDTA-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> acetate)		
Cd	mg kg <sup>-1</sup>	1 $\pm$ 0.05
Cu	mg kg <sup>-1</sup>	48 $\pm$ 3
Pb	mg kg <sup>-1</sup>	290 $\pm$ 50
Zn	mg kg <sup>-1</sup>	160 $\pm$ 8

<sup>a</sup> Measured on undisturbed soil cores with the cylinder method (10 cm depth), n = 10

<sup>b</sup> Mass percentage of gravel (> 2 mm) in a soil sample taken down to 20 cm, n = 5



## 2. Material and Methods

### 2.1. Site description and growth conditions

The field trial was conducted in an urban wasteland, Gare Royale (GR), located in Brussels, Belgium, on the remnants of an old train track. The topsoil is contaminated with trace metals (Cd, Pb and Zn) due to the origin of the embankment material, and to the railway activity. Total soil Pb concentrations are relatively high and heterogeneous, ranging from about 300 up to 3000 mg Pb kg<sup>-1</sup>. Characteristics of the topsoil are described in Table 1 (see detailed analytical methods in Jacobs *et al.* 2017). Meteorological conditions in Brussels during growing season from September 2015 to November 2016 (recorded in Uccle, Royal Meteorological Institute) were the following: mean monthly temperature of 11.1 °C (ranging from 4.5 °C in February to 18.3 °C in July), mean monthly rainfall of 78 mm (ranging from 18 mm in September 2016 to 175 mm in June) and total of 1177 mm. Additionally to regional data, on-site temperatures were recorded every hour 5 cm above soil surface between November 2015 and July 2016 with a temperature data-logger (RC30B, Blue Jay Technology Co. Ltd). Sum of temperatures (degree days) were calculated based on temperatures measured on-site for each cultural cycle, and based on regional data for seedling growth before transplantation. Degree days are calculated as the sum of the arithmetic means between the minimum and maximum temperature for each day of growth, with a base temperature of 0 °C as used for Brassicaceae crops (Lovy 2012). Missing on-site values were extrapolated based on regional data which had very good correlation with degree days measured on site ( $R^2 = 0.93$ ).

### 2.2. Plant origin and field experimental design

*Noccaea caerulea* seeds came from two populations: one non-metallicolous from The Grand Duchy of Luxemburg, *Wilwerwiltz* (hereafter LUX) (Molitor *et al.* 2005) whose seeds were produced in our botanical garden, and one metallicolous *Ganges* or 'Avinières' (hereafter GAN) from St-Laurent-le-Minier, France, identified for its great potential for Cd phytoextraction (Escarré *et al.* 2000).

Four blocks were set up (1×3 m), excavated to 30 cm depth and the topsoil was thoroughly homogenised before being replaced to avoid large spatial variations in soil metal contamination among plots and subplots. The blocks were split into six plots (0.5×1 m) corresponding to 6 different cultural cycles and each plot was again subdivided into two subplots (0.5×0.5 m) to compare the two populations (Fig. S1). A fifth block (1×1.5 m) containing only three plots for practical reasons was set up in the same way. The different cultural cycles are described in Table 2. They encompass different seasons of establishment

(late summer, fall, spring) and seeding strategy (SS) (direct sowing and transplantation), and length of growth. Plants were either sown (~300 seeds m<sup>-2</sup> to ensure a density of around 100 plants m<sup>-2</sup>) or transplanted (100 plants m<sup>-2</sup>) the first week of September 2015, the last week of November 2015 and the last week of April 2016. Seedlings were grown outdoors in unheated shelters in garden compost plugs for 2 months before transplantation in the field. Plots were watered after sowing and transplantation, and during summer when it had not rained.

**Table 2.** Description of the cultural cycles of *Noccaea caerulea* tested on Gare Royale site (a) and of the three main analyses of variance performed to compare the cultural practices (b).

a.	Name of the cycle	Seeding strategy	Start	Harvest	Length of growth (months)	Avg T° (°C)	Degree Days (°C.d)	Total Rainfall (mm)	Number of blocks
A	Late summer Sowing	Sowing	September	August	12	11.1	4372	1015	4
B	Fall Transplantation (short)	Transplantation	November	June	6 (+2)*	7.8	1841 (+692)*	528	5
C	Fall Transplantation (long)	Transplantation	November	November	12 (+2)*	11.1	4546 (+692)*	974	5
D	Fall Sowing	Sowing	November	November	12	11.1	4546	974	4
E	Spring Transplantation	Transplantation	April	November	7 (+2)*	14.3	3413 (+602)*	524	5
F	Spring Sowing	Sowing	April	November	7	14.3	3413	524	4

### b. Evaluation of various cultural practices through the comparison of different cultural cycles

1. Test of the **seeding strategy** and **season of establishment** - Comparison of cycles **C, D, E** and **F** (4 blocks)
2. Test of the **sowing time** - Comparison of cycles **A, D** and **F** (4 blocks)
3. Test of the **length of the growing season** - Comparison of cycles **B, C** and **E** (5 blocks)

\* Growth after transplantation (+ greenhouse growth of transplants before field transplantation)

The number of individuals in reproductive stage was counted in March and June. In June and July, all reproductive parts were systematically harvested (inflorescences including bracts, flowers and/or silicles) for all cultural cycles, to avoid losing metal-rich biomass when silicles would be mature and dehiscent and stimulate a longer vegetative growth even though it does not necessarily prevent all individuals to enter senescence after fructification. The timing of the final harvest was variable between plots and was done maximum one year after establishment, during the fall, excepted plot B which was harvested at fructification (Table 2). At the final harvest, vegetative and reproductive biomasses of 65 °C-dried plants (all aerial

parts) were measured separately for every subplot while roots were left in the ground, and the number of individuals was counted to determine the survival rate. Mean individual biomass was calculated by dividing total biomass by the number of surviving individuals at harvest.

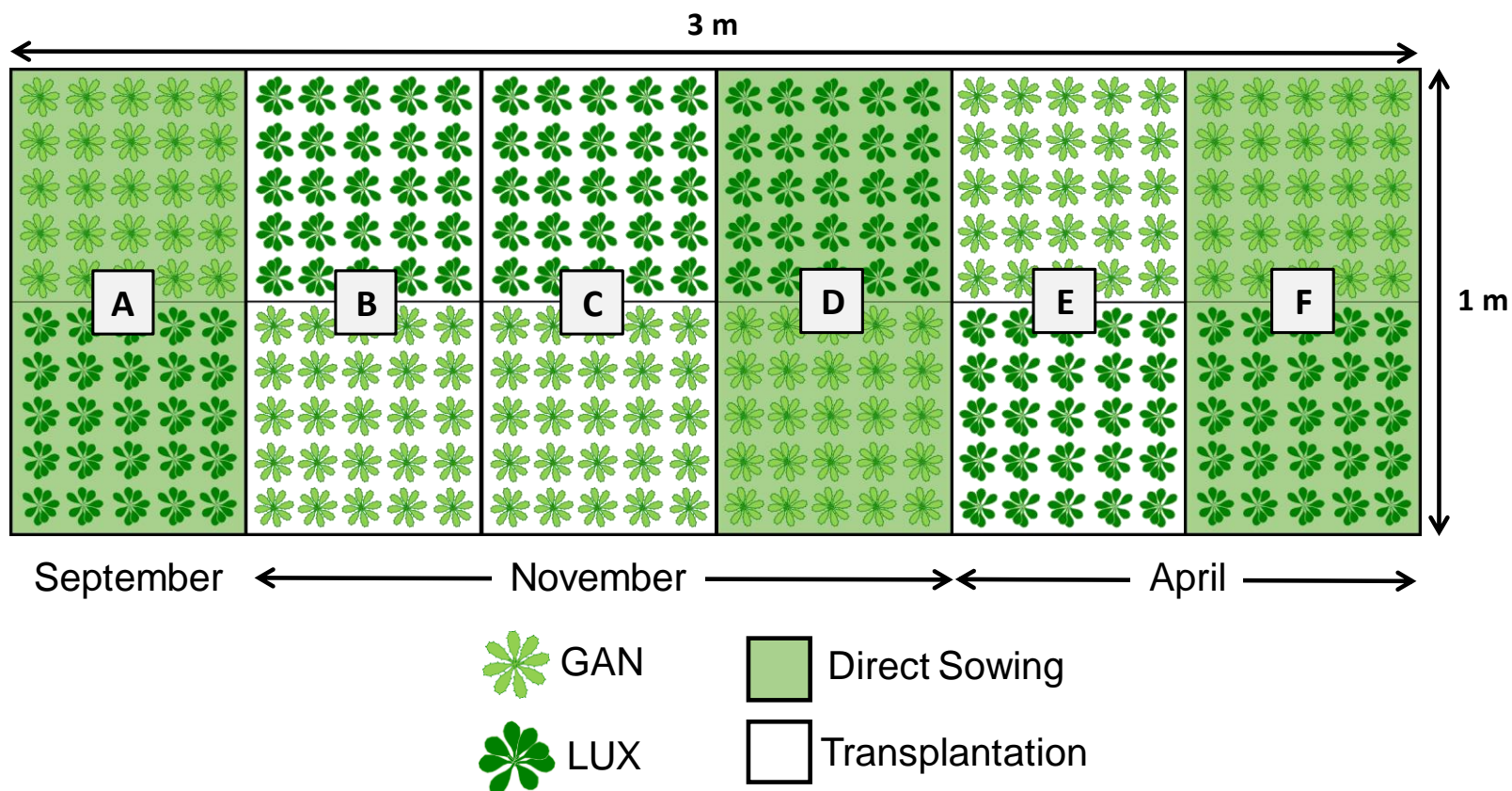
### 2.3. Plant analyses

Plant aerial parts (vegetative and/or reproductive) were thoroughly washed with deionized water, dried at 65 °C for 48 hours and then ground with a Retsch ZM100 mill. Subsamples of 0.5 g were dry-ashed during 12 h at 450 °C and dissolved with concentrated HNO<sub>3</sub> (65%). Concentrations of Zn, Cd, Cu, Ni, Pb and major elements (Ca, K, Mg, P, S) (expressed as µg g<sup>-1</sup> of 105 °C-dried plant) were determined on triplicates with ICP-OES (Varian, Vista MPX). NIST standard reference (SRM 1547, Peach leaves) and an in-house standard were used to check for method accuracy. Cadmium and Zn uptake were calculated as the product of total dry biomass and shoot Cd and Zn concentrations and expressed in **g Cd ha<sup>-1</sup>** and **kg Zn ha<sup>-1</sup>** respectively. For 4 samples of each population, seeds were separated from the rest of the inflorescence (bracts, stalks and empty silicles) and their respective metal concentrations were measured separately.

### 2.4. Data treatment and Statistical analysis

Data were normalized with Box-Cox transformations. The effects of 1) planting season and sowing strategy, 2) sowing time and 3) length of growth on survival, biomass production and metal accumulation were tested by three different two or three-way ANOVAs with population and block as common factors (Table 2). Post-hoc comparisons were performed using Tukey HSD test. Covariance analysis was used to test the effect of degree days on biomass production. Differences of metal concentrations between vegetative and reproductive parts on selected plots were tested by means of a paired *t*-test. All statistical analyses were carried out with the R statistical software v. 3.1.2 (R Development Core Team, 2014). Estimations of the relative diminutions in soil total and exchangeable (EDTA-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> acetate) Cd and Zn concentrations after one phytoextraction crop were calculated as a mass balance based on plant metal uptake of each cycle (in g Cd ha<sup>-1</sup> or kg Zn ha<sup>-1</sup>) and on the initial topsoil Cd and Zn concentrations. It is assumed in the calculation that the metal extracted by the plants entirely comes from the exchangeable fraction (Hammer *et al.* 2006), which has been confirmed in previous field studies with *N. caerulea* (Jacobs *et al.* 2017, 2018).

**Figure S1.** Scheme of one experimental block set up at Gare Royale site to compare different cultural cycles of phytoextraction with *Noccaea caerulea*. The block is split into six plots (0.5×1 m) corresponding to 6 different cultural cycles: direct sowing in September (A), November (D) or April (F); transplantation in November with 6-month growth (B) or with 12-month growth (C), in April with 7-month growth (E). Each plot is subdivided into two subplots (0.5×0.5 m) to compare the two populations, Ganges (GAN) and Luxemburg (LUX), which were randomly assigned in the subplots of each cycle. Four blocks made of these six plots were set up on the site, while for practical reasons the fifth block (1.5×1 m) contained only three plots (B, C and E).



### 3. Results

#### 3.1. Seeding strategy and season of establishment

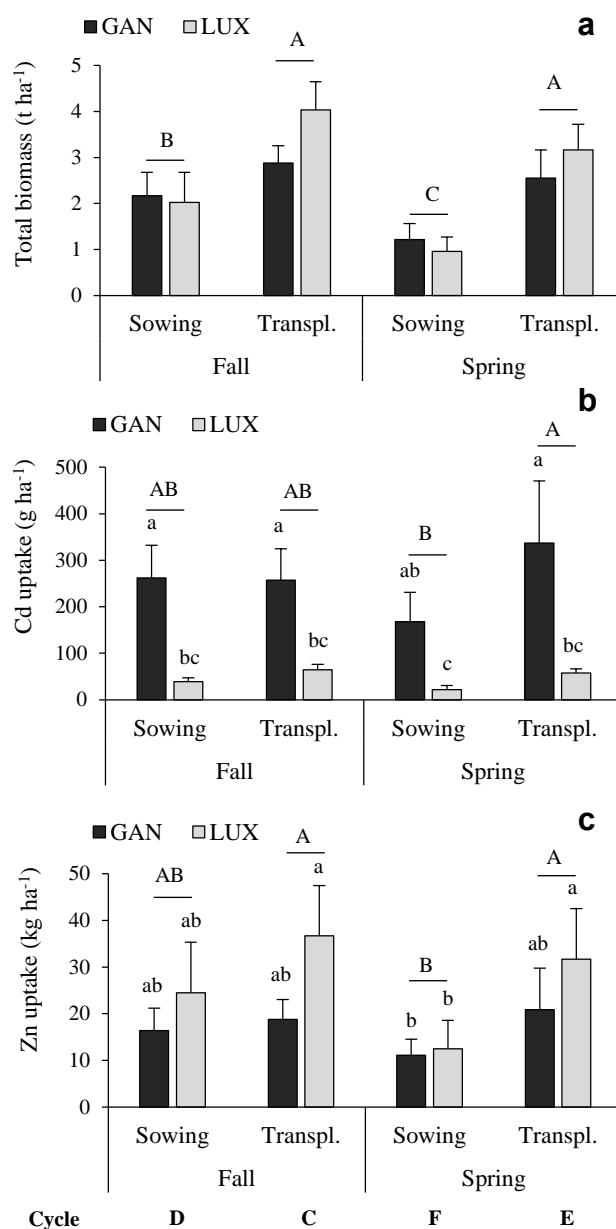
To determine which cultural cycle optimizes metal uptake, we compared two seeding strategies (SS) (direct sowing and seedling transplantation) each set up in two seasons (fall and spring). The SS and season factors, along with the block factor, were the main factors of variation of individual and total biomass (Table S1.a). The average individual and total biomass, for both seasons and populations, were 2 times higher with transplantation ( $3.6 \pm 0.3$  g plant<sup>-1</sup>,  $3.2 \pm 0.3$  t ha<sup>-1</sup>) than with direct sowing ( $1.7 \pm 0.3$  g plant<sup>-1</sup>,  $1.6 \pm 0.3$  t ha<sup>-1</sup>) (comparison of cycle C to D and E to F; Table 2, Fig. 1a and Table S1.a). Despite a lower number of surviving individuals at harvest for both SS ( $84 \pm 8$  in the fall *vs*  $98 \pm 7$  in the spring; plants m<sup>-2</sup>), fall establishment yielded a significantly higher total biomass than spring establishment due to a longer growing season ( $2.8 \pm 0.3$  t ha<sup>-1</sup> *vs*  $2.0 \pm 0.3$  t ha<sup>-1</sup>) (comparison of cycles C to E and D to F; Fig. 1a).

The population was the only factor affecting Cd concentrations as GAN plants have much higher shoot Cd concentrations than LUX ( $p < 0.001$ ), while block, population and SS factors significantly influenced shoot Zn concentrations, which were higher for LUX ( $p < 0.001$ ) (Table 3 and Table S1.a). Shoot Cd and Zn concentrations were slightly higher with direct sowing (by about 15-20%) but it was only significant in the case of Zn ( $p < 0.05$ ), and they were slightly lower – but not significantly – with fall establishment compared to spring establishment. Hence total metal uptake was on the whole higher with transplants ( $180 \pm 50$  *vs*  $120 \pm 30$  g Cd ha<sup>-1</sup>,  $27 \pm 5$  *vs*  $16 \pm 3$  kg Zn ha<sup>-1</sup>; Fig. 1b,c). Only in the fall with GAN plants, Cd uptake was similar between both SS. However, Zn uptake was significantly higher with fall establishment, especially with LUX plants ( $31 \pm 7$  *vs*  $22 \pm 7$  kg Zn ha<sup>-1</sup> for spring establishment).

#### 3.2. Sowing time

We compared three different dates of direct sowing (beginning of September, end of November and end of April) to determine which timing maximizes establishment rate and biomass production. The analysis of variance on cycles A, D and F showed that the sowing season and the block were the major factors influencing individual and total biomass production whereas population had little or no effect (Table S1.b). Considering an annual crop, direct sowing led to higher biomass when done in the fall (November) or late summer (September) than in the spring (comparison of cycles A, D and F; Table 4 and Table S1.b). There was no difference of biomass production between September and November sowings but the establishment (germination and survival rates combined) was much better in

November for GAN plants. In contrast, the number of surviving LUX plants was rather stable independently of the sowing season. There was no difference in shoot Cd and Zn concentrations among sowing seasons while both Cd and Zn uptake were significantly higher in November and September than in April when considering both populations due to higher biomass. On the whole, Cd uptake was maximal in plots sown in November with GAN (about 260 g Cd ha<sup>-1</sup>) while Zn uptake was the highest on plots sown in September or November with LUX plants (about 25 kg Zn ha<sup>-1</sup>).



**Figure 1.** Biomass (a) and metal uptake (b,c) of *N. caerulea* plants (Ganges and Luxemburg populations), established at two different seasons of the year, Fall (November) and Spring (April), grown for 12 and 7 months respectively, with two seeding strategies, direct sowing (cycles **D** and **F**) and transplantation (cycles **C** and **E**) (n = 4 blocks). Data are means + SE. Different letters indicate significant differences at the P < 0.05 level among groups Season × SS (upper case), and Season × SS × Population (lower case).

**Table 3.** Percentage of flowering individuals in June, Cd and Zn concentrations in vegetative parts (leaves at harvest) and reproductive parts (inflorescences with bracts, flowers, silicles and/or seeds) of *N. caerulea*, Ganges (GAN) and Luxemburg (LUX) populations. Data are mean  $\pm$  SE (n = 4 blocks for cycles A, D, F and 5 blocks for cycles B, C, E ; each measure of metal concentration is based on analytical triplicates). General characteristics of the cycles are as follows: direct sowing in September (A), November (D) or April (F); transplantation in November with 6-month growth (B) or with 12-month growth (C), in April with 7-month growth (E). No reproductive concentrations could be measured for cycles D and F since none of the plants flowered on these plots. Results of the analyses of variance of flowering percentage and metal concentrations in vegetative parts are presented in Table S1.

Pop	Cycle	Flowering (%)	Cd ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )		Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	
			Vegetative	Reproductive	Vegetative	Reproductive
GAN	A	17 $\pm$ 3	109 $\pm$ 28	107 $\pm$ 33	7580 $\pm$ 1030	5620 $\pm$ 800
	B	65 $\pm$ 7	190 $\pm$ 34	113 $\pm$ 22	13670 $\pm$ 1910	7120 $\pm$ 710
	C	74 $\pm$ 9	81 $\pm$ 7	119 $\pm$ 22	6990 $\pm$ 740	6860 $\pm$ 720
	D	0	134 $\pm$ 23	/	8060 $\pm$ 1470	/
	E	56 $\pm$ 5	141 $\pm$ 21	74 $\pm$ 13	8450 $\pm$ 1550	4990 $\pm$ 800
	F	0	145 $\pm$ 39	/	9320 $\pm$ 1710	/
LUX	A	6 $\pm$ 3	34 $\pm$ 10	26 $\pm$ 5	11800 $\pm$ 2510	7230 $\pm$ 580
	B	24 $\pm$ 3	40 $\pm$ 9	26 $\pm$ 6	16540 $\pm$ 2000	8700 $\pm$ 1000
	C	35 $\pm$ 6	23 $\pm$ 6	17 $\pm$ 3	10370 $\pm$ 1850	5840 $\pm$ 900
	D	0	24 $\pm$ 6	/	11510 $\pm$ 1600	/
	E	88 $\pm$ 4	21 $\pm$ 2	15 $\pm$ 3	10340 $\pm$ 1770	6040 $\pm$ 570
	F	0	23 $\pm$ 4	/	12080 $\pm$ 2300	/

**Table 4.** Comparison of three sowing times of *N. caerulea* (lengths of growing season), Ganges and Luxemburg populations (cycles A, D, F). Data are mean  $\pm$  SE (n = 4 blocks). Different superscript letters indicate significant differences at the P < 0.05 level among sowing seasons and populations.

		A - September (12 months)	D - November (12 months)	F - April (7 months)
Surviving individuals (nb ind m <sup>-2</sup> )	GAN	44 $\pm$ 18 <sup>a</sup>	119 $\pm$ 19 <sup>b</sup>	129 $\pm$ 18 <sup>b</sup>
	LUX	79 $\pm$ 21 <sup>ab</sup>	71 $\pm$ 10 <sup>ab</sup>	80 $\pm$ 15 <sup>ab</sup>
Flowering (%)	GAN	17 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
	LUX	6 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
Individual biomass (g)	GAN	3.7 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	2 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	0.9 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>
	LUX	2.5 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	2.9 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	1.1 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>
Total biomass (t ha <sup>-1</sup> )	GAN	1.5 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	2.2 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	1.2 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>
	LUX	2.1 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	2 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	1 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>
Cd uptake (g ha <sup>-1</sup> )	GAN	171 $\pm$ 74 <sup>a</sup>	262 $\pm$ 70 <sup>a</sup>	168 $\pm$ 63 <sup>a</sup>
	LUX	67 $\pm$ 21 <sup>b</sup>	39 $\pm$ 8 <sup>bc</sup>	22 $\pm$ 9 <sup>c</sup>
Zn uptake (kg ha <sup>-1</sup> )	GAN	11 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	16 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	11 $\pm$ 3 <sup>a</sup>
	LUX	25 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	24 $\pm$ 11 <sup>a</sup>	12 $\pm$ 6 <sup>a</sup>

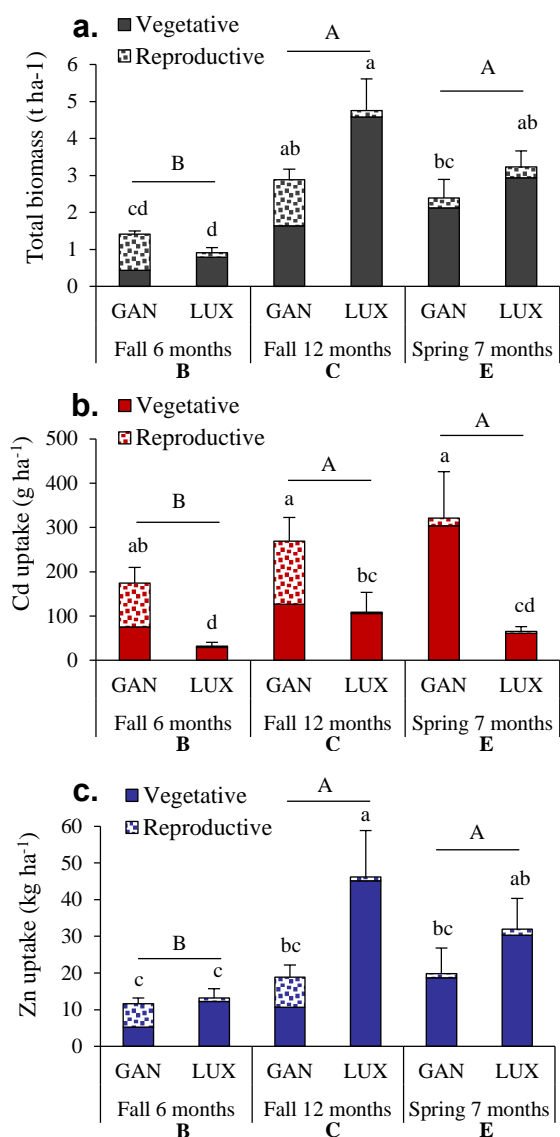
### 3.3. Length of the growing season

To determine if an extension of the growing season can increase metal uptake, we compared a 6-month cycle (harvest in June) with a 12-month cycle (harvest in November), both with a fall transplantation. A third cycle, 7 months with spring transplantation, was also compared to study the effect of degree days. On average, biomass production of plants transplanted in November was more than three times lower when harvested in June ( $1.2 \pm 0.1 \text{ t ha}^{-1}$ , 6 months of growth) – normal fructification time – than when it was extended for 6 more months ( $3.8 \pm 0.5 \text{ t ha}^{-1}$ , 12 months) (comparison of cycles B to C, Table 2, Fig. 2 and Table S1.c). In comparison, plants transplanted in the spring and grown for 7 months (cycle E) had an intermediate biomass production ( $2.8 \pm 0.3 \text{ t ha}^{-1}$ ). There were marked differences between GAN and LUX populations, as total biomass of plants established in the fall was multiplied by 5 for LUX plants and only by 2 for GAN with 6 additional months of growth (Fig. 2 and Fig. 3). Only about 62% of GAN plants survived after 12 months (compared to 93% for LUX), while about 74% had flowered (compared to 35% for LUX) (Table 3). This indicates that about one out of two GAN individuals died after flowering. Furthermore, the ratio of vegetative/reproductive biomass increased from 6 to 12 months of growth. This ratio was in addition extremely different between GAN (0.45 and 1.3, for 6 and 12 months of growth, respectively) and LUX (6.7 and 26) (Fig. 2a).

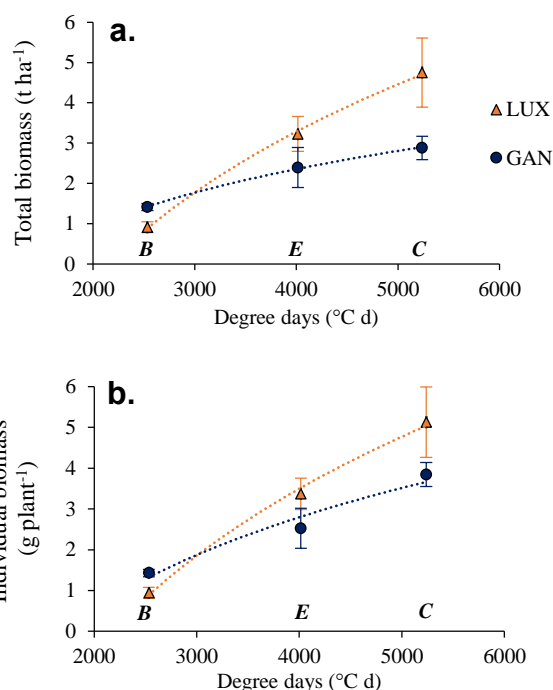
Degree-days (DD) were calculated for each cultural cycle to test their influence on plant growth. DD associated with cycles B, C and E were used as a continuous covariable (in replacement of the categorical variable of the cycle) in an analysis of covariance combined with the population factor. They appear to be good predictors of total biomass production (DD:  $F_{1,18} = 83$ ,  $p < 0.001$ , where  $F_{x,y}$  is the F value of the DD factor in the analysis, x is the degree of freedom of the factor (or the interaction) considered and y is that of the denominator used to calculate the F statistics) and individual biomass of remaining plants at harvest (DD:  $F_{1,18} = 122$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 3). The two populations however showed different responses, assessed by a significant interaction between the factors DD and population (DD  $\times$  Pop.: Total biomass,  $F_{1,18} = 13.5$ ,  $p < 0.01$ ; Individual biomass,  $F_{1,18} = 7.9$ ,  $p < 0.05$ ). With a slightly faster initial growth, GAN population reached however a plateau in total biomass production, due to the mortality of half of the individuals which flowered in cycle C as mentioned above. On the opposite, LUX had a slower initial growth but kept producing biomass steadily throughout the whole growing season. Concerning individual biomass of remaining individuals, the difference between GAN and LUX was less pronounced but still significant (Fig. 3b).



Shoot metal concentrations in vegetative parts were about twice as high with 6 months of growth (cycle B) ( $115 \pm 30 \mu\text{g Cd g}^{-1}$ ,  $15100 \pm 1390 \mu\text{g Zn g}^{-1}$ ) as with 12 months (cycle C) ( $52 \pm 11 \mu\text{g Cd g}^{-1}$ ,  $8680 \pm 1090 \mu\text{g Zn g}^{-1}$ ) for fall transplantation ( $p < 0.001$ ). With the spring cycle E, Cd concentrations were intermediate between cycles B and C while Zn concentrations were not different than in the 12-month cycle C. In the analysis of variance of metal uptake, the three main factors – length of growth, population and block – were significant; for Cd the population effect was the strongest and for Zn the interaction between length of growth and population was also significant (Table S1.c). Cadmium uptake was maximal with GAN in the spring cycle E ( $321 \pm 105 \text{ g ha}^{-1}$ ) though not significantly higher than the 12-month fall cycle C ( $269 \pm 54 \text{ g ha}^{-1}$ ) (Fig. 2b). On the other hand, Zn uptake was highest with LUX in the long fall cycle C ( $46 \pm 13 \text{ kg ha}^{-1}$ ) compared to the spring cycle E ( $32 \pm 8 \text{ kg ha}^{-1}$ ) and short fall cycle B ( $13 \pm 3 \text{ kg ha}^{-1}$ ) (Fig. 2c).



**Figure 2.** Biomass (a), Cd (b) and Zn (c) uptake of *N. caerulescens* (Ganges and Luxemburg populations) depending on the length of growth (6, 12 and 7 months; cycles **B**, **C** and **E** respectively) and season of transplantation (Fall/Spring) (n = 5 blocks). Data are means + SE. Different letters indicate significant differences at the P < 0.05 level among lengths of growth (upper case), and Length of growth × Population (lower case).

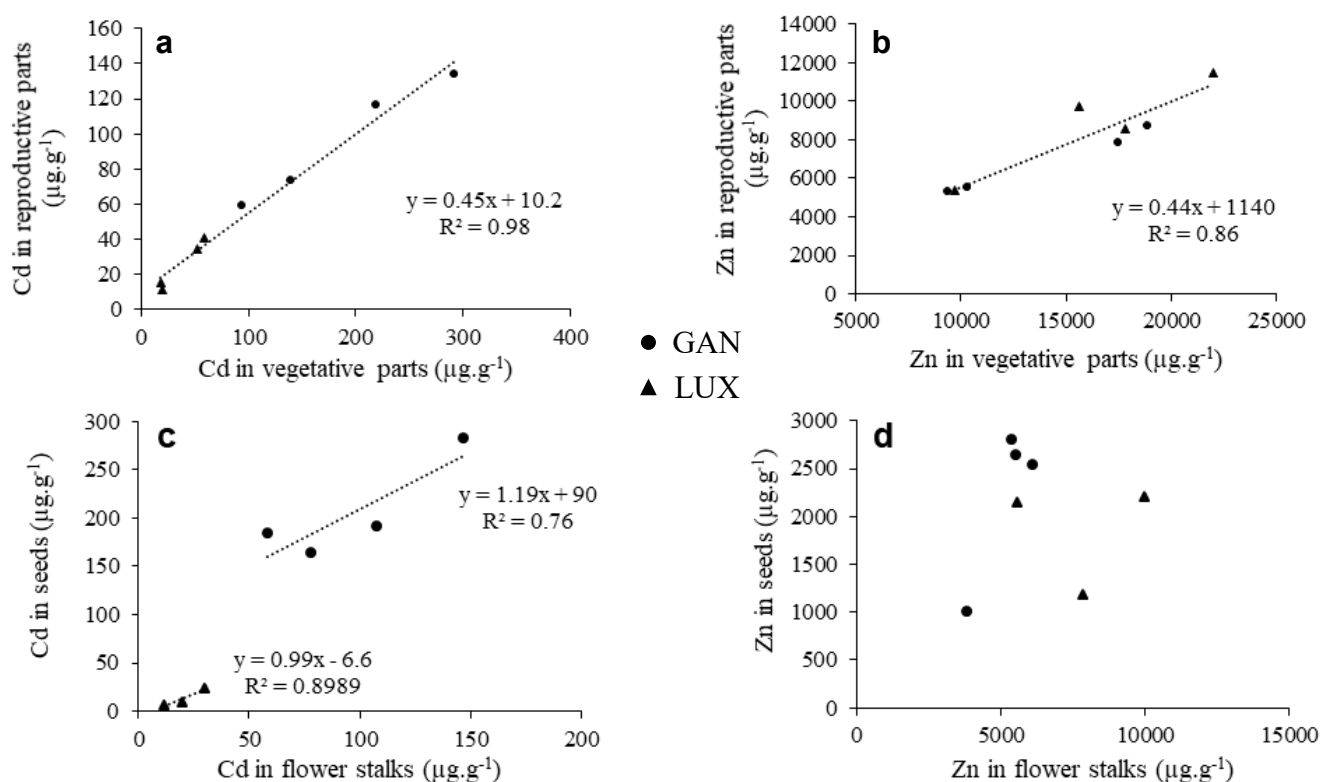


**Figure 3.** Biomass of *N. caerulescens*, Ganges (GAN) and Luxemburg (LUX) populations, as a function of the sum of degree days (before and after transplantation) of 3 different growth cycles (Cycle **B**: Fall transplantation, 6-month growth; Cycle **C**: Fall transplantation, 12-month growth; Cycle **E**: Spring transplantation, 7-month growth). **Total biomass (a)** is the total yield produced throughout the growing season (including reproductive parts, mortality and final harvest) and **individual biomass (b)** is the mean biomass of surviving individuals at harvest (including reproductive parts harvested at fructification). Data are means ± SE (n = 5 blocks).

### 3.4. Reproductive growth and concentrations

The reproductive status (presence or absence of flower stalks) was determined for all plants in June to study the differences in life cycles among populations and cultural cycles. In June, there was a significant difference in percentage of flowering between seeding strategies (SS) with almost no flowering among directly sown plants (4%) compared to transplanted individuals (about 60% on average)( $p < 0.001$ ). The only plants that flowered after direct sowing were those sown in September (Table 4). Flowering percentage was higher for GAN plants transplanted in the fall ( $74 \pm 9$ ) than in the spring ( $56 \pm 5$ ) while for LUX much more plants transplanted in the spring flowered ( $88 \pm 4$ ) compared to those transplanted in the fall ( $35 \pm 6$ )(Table 3).

Metal concentrations in vegetative (basal rosette leaves) and reproductive parts (inflorescences with bracts, flowers, silicles and/or seeds) (Table 3) were compared for cycle B only because it is the sole cycle where both vegetative and reproductive parts were harvested simultaneously (Fig. 4a,b). For both Cd and Zn, reproductive concentrations were about half those in vegetative parts (paired  $t$ -test; Cd:  $p < 0.05$ , Zn:  $p < 0.001$ ). Interestingly, Cd concentrations in GAN seeds were about twice as high as in the rest of the reproductive parts (paired  $t$ -test,  $p < 0.01$ ), while Zn concentrations were lower in seeds for both populations (paired  $t$ -test,  $p < 0.01$ ) (Fig. 4c,d).



**Figure 4.** Cadmium and Zinc concentrations in 1) vegetative parts (leaves at harvest) and reproductive parts (inflorescences with bracts, flowers and/or silicles) (**a,b**), and 2) flower stalks (bracts, stalks, silicles without seeds) and seeds (**c,d**) of *N. caerulea* (Ganges (GAN) and Luxemburg (LUX) populations) plants transplanted in November and harvested at fructification in June (cycle B).

### 3.5. Phytoextraction efficiency

To give a rough estimate of the extraction efficiency after one harvest, we calculated the expected diminution of soil total and exchangeable Cd and Zn concentrations in the top 20 cm of the site based on plant uptake for each cycle and on the average contamination of the site (Table 5). For Cd extraction, the diminutions are higher with GAN plants and range from 6 to 12% of the total content and from 12 up to 23% of the exchangeable fraction. Maximum diminutions in Zn concentrations are obtained with LUX: from 2 to 6.5% of the total content and from 6 up to 21% of the exchangeable fraction.

**Table 5.** Cadmium and Zinc extraction efficiency expected after cultivation of *N. caerulea*, Ganges (GAN) and Luxemburg (LUX) populations, at GR site with 6 different cycles. Values are estimations of the relative diminutions in soil total and exchangeable (EDTA-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>acetate) Cd and Zn concentrations in the top 20 cm of the site after harvest, based on plant metal uptake of each cycle (in g ha<sup>-1</sup>) and on the following average initial topsoil characteristics of the site: soil density 0.8 g cm<sup>-3</sup>, gravel charge 33 g/g %, Cd: Tot. 1.9 mg kg<sup>-1</sup> - Exch. 1 mg kg<sup>-1</sup>, Zn: Tot. 520 mg kg<sup>-1</sup> - Exch. 160 mg kg<sup>-1</sup>. General characteristics of the cycles are as follows: direct sowing in September (A), November (D) or April (F); transplantation in November with 6-month growth (B) or with 12-month growth (C), in April with 7-month growth (E).

Pop	Cycle	Relative decrease in soil metal concentration (%)			
		Total Cd	Exch. Cd	Total Zn	Exch. Zn
GAN	A	6.6	12.5	1.5	4.9
	B	6.7	12.7	1.6	5.3
	C	10.3	19.6	2.6	8.6
	D	10.0	19.1	2.3	7.4
	E	<b>12.3</b>	<b>23.4</b>	2.8	9.0
	F	6.4	12.2	1.6	5.0
LUX	A	2.6	4.9	3.5	11.5
	B	1.2	2.3	1.8	6.0
	C	4.2	7.9	<b>6.5</b>	<b>21.0</b>
	D	1.5	2.8	3.4	11.1
	E	2.5	4.8	4.5	14.6
	F	0.8	1.6	1.7	5.7

## 4. Discussion

With yields as high as 3.2 to 4.8 t ha<sup>-1</sup> for LUX plants (7 and 12-month growth), and 2.4 to 2.9 t ha<sup>-1</sup> for GAN plants, the results obtained in this experiment are quite remarkable for a small plant like *N. caerulescens*. Soil characteristics seem particularly adequate for this species growth (high OM content and good drainage, low soil density and a high proportion of silt and sand) in this site where yields of 3 to 5 t ha<sup>-1</sup> were obtained in a previous study (Jacobs *et al.* 2017). Despite the potentially negative effect of Pb on growth suggested in a previous study (Jacobs *et al.* 2017), the plants did not seem to suffer from the relatively high Pb levels in the soil (from 300 up to 3000 mg Pb kg<sup>-1</sup>). With the yields obtained in the present study, the percentage of metal extracted from the soil was as high as 12% of total Cd with GAN ecotype, and 6.5% of total Zn content with LUX population (Table 5). These values compare relatively well to extraction rates calculated by McGrath *et al.* (2006) in field trials across 9 plots where on average 8.7% and 2.2% of the total Cd and Zn, respectively, were extracted after 14 months of *N. caerulescens* (GAN ecotype) growth. The slightly higher values obtained in our study can be explained by the higher biomass production and by the higher Zn concentrations in LUX population compared to the GAN population. When converted into percentages of the bioavailable fraction of soil metals, the best extraction rates obtained in the present study represent about 23% and 21% of the exchangeable Cd and Zn, respectively (Table 5). However, potential replenishment of the exchangeable metal fraction on the long term should not be excluded, in particular with the decay of roots remaining in the soil. Nevertheless, metals in the roots would represent only a small fraction (about 10%) of the total metals extracted by *N. caerulescens* (Martínez-Alcalá *et al.* 2016, Perronnet *et al.* 2003).

### 4.1. Effect of seeding strategy - sowing vs transplantation

Unsurprisingly, direct sowing yields on average half as much total biomass (1.6 t ha<sup>-1</sup>) as transplantation (3.2 t ha<sup>-1</sup>; Fig. 1a). This result is quite similar to previous trials with *N. caerulescens* where biomass production with direct sowing was about half of that obtained with transplantation, with average biomass under 1 t ha<sup>-1</sup> with short growing seasons (4 to 6 months; Hammer and Keller 2003, McGrath *et al.* 2006). However, growing sown plants longer (e.g. 12 to 14 months; present study and McGrath *et al.* 2006) give higher yields (1.8 and 2.1 t ha<sup>-1</sup> with September and November sowings respectively; 2.1 t ha<sup>-1</sup> in McGrath *et al.* 2006). Our results show however that the difference between direct sowing and transplantation is less pronounced after 12 months of growth (fall establishment) than after 7 months (spring establishment). The initial advantage of using transplants over direct sowing seems therefore to decrease with time.

The difficulty of establishment could partly explain the poorer performance of direct sowing. Good conditions for germination and survival of young *N. caerulea* seedlings in the field are a high humidity for at least 7 to 10 days, and also a low herbivore pressure (personal observations). These conditions are obviously more difficult to control in the field than in a greenhouse and more generally met in the fall than in the spring in temperate regions. GAN plants had a better establishment rate in November than in September, while there was no difference for LUX. This suggests that the higher sensitivity of GAN to herbivory – already shown in field conditions (Jacobs *et al.* 2017) – was more pronounced with the higher prevalence of gastropods in late summer. However, even with successful establishment and similar planting density, growth after direct sowing did not perform as well as with transplanted individuals. So, for similar amounts of degree days (which include the initial 2-month greenhouse growth advantage of transplants), transplanted plants produced higher biomass than sown plants did (sown cycles A, D, F *vs* transplanted cycles B,C, E; analysis of covariance).

Transplantation induces however more flowering than direct sowing (60% *vs* 4% on average for both seasons and populations). It is most likely explained by the fact that many more transplanted individuals reached the minimum size for flowering. Reproductive growth is not a desired trait for maximal extraction since Cd and Zn concentrations in reproductive parts are twice lower than in basal leaves of the rosette, at least when harvested at fructification at the same time (Fig. 4a,b). Another drawback of flowering is that metal-rich leaves of semelparous (monocarpic) individuals enter senescence in fructifying, and must therefore be harvested before senescence to prevent accumulated metals to return to the soil (Perronnet *et al.* 2000).

Finally, SS also influenced metal accumulation. Shoot Zn concentrations were slightly higher – about 15% – with direct sowing for the two seasons of establishment. Average Cd concentrations in GAN plants were higher with direct sowing only with fall establishment (by about 22%). Sown plants being two months younger and therefore smaller, metals could therefore be slightly less diluted in shoots. In comparison, Hammer and Keller (2003) found no significant difference in metal accumulation between the two SS after three harvests whereas McGrath *et al.* (2006) obtained Cd and Zn concentrations about 2 to 3 times higher in sown plants. Overall, the dilution effect was much smaller in our experiment and it did not compensate for the lower biomass of sown plants; total metal uptake was higher with transplants, except for Cd with GAN plants in the fall.

## 4.2. Life cycle and growing season

The most striking result shown in this study is the obvious difference of life cycle between the two populations GAN (CAL population from South of France) and LUX (NMET population from Luxemburg), assessed here in field conditions. About 70% of GAN individuals transplanted in the fall flowered in May-June, compared to around 30% for LUX. Among GAN individuals left to grow for 6 more months after flowering and fructification, about half of them died before the end of the summer, which strongly impacted survival rate at harvest in November (62% for GAN and 93% for LUX). The increase in vegetative biomass with the extended growth season (from 6 to 12 month-growth) was therefore different between the two populations compared: by a factor of 4 for GAN and almost 6 for LUX plants. Similarly, McGrath *et al.* (2006) measured a 5-6 fold increase in biomass when growing CAL plants ten more months over winter (4 vs 14 months with spring sowing).

In natural populations, CAL plants from South of France mostly follow an annual life cycle, with percentages of flowering between 80 and 95% during the first spring after germination, and a survival of flowering individuals close to zero (no polycarpy/iteroparous) (Dubois, 2005). Summer drought and intense heat are major drivers of the low survival of plants in South of France (Dubois, 2005), but our results suggest that this trait is also probably genetically fixed since GAN plants did not experience intense drought in this experiment. With transplantation in April, flowering was a bit lower among GAN plants (56%), while it was very high for LUX (88%). This latter value remains unexplained but could potentially have been caused by the transplantation stress. Overall, the dominant life cycle observed with fall transplantation is annual for GAN plants and biennial for LUX plants as observed in natural populations (Dechamps *et al.* 2011, Jiménez-Ambriz *et al.* 2007).

With fall transplantation, the proportion of reproductive parts in the total biomass was much larger for GAN (52%) than for LUX plants (5%). Such result was already shown in controlled conditions with a comparison of a large number of CAL (30) and NMET (26) populations (Sterckeman *et al.* 2017). With spring transplantation reproductive biomass accounted only for about 11% of the total biomass and was not different between populations. Finally, a minimum plant size is clearly required for flowering induction by vernalisation, since only plants sown in September flowered (about 17%) while there was no flowering among the plants sown in November.

## 4.3. Variation of metal uptake

There was a clear effect of the growing season length on shoot Cd and Zn concentrations, but no difference between seasons of establishment. Cadmium and Zn concentrations in rosette

leaves with a 12-month growth were about half those with a 6-month growth. This suggests that Cd and Zn concentrations reach a maximum concentration during growth and then decrease, most probably limited by the pool of available metal in soil solution. This hypothesis is supported by the fact that no decrease of shoot metal concentrations over time is recorded when *N. caerulescens* is grown in controlled conditions with a constant metal supply (Escarré *et al.* 2013, Lovy *et al.* 2013).

Total metal uptake is influenced by both biomass and metal concentrations in aerial parts, which vary in opposite directions with increased length of growth period. For fall establishment, Cd and Zn uptake were always higher with 12 than with 6-month growth because of the biomass increase (x2 for GAN and x5 for LUX). The season that maximizes extraction efficiency is however different between populations. Zinc uptake is maximal with LUX plants transplanted in the fall with a 12-month growth (46 kg Zn ha<sup>-1</sup>, mean of 5 plots, Fig. 2.c, Table 5) compared to a maximum of 19 kg Zn ha<sup>-1</sup> extracted with GAN plants. Conversely, GAN plants yielded the best Cd uptake with spring transplantation (320 g Cd ha<sup>-1</sup>, mean of 5 plots, Fig. 2.b, Table 5).

Metal concentrations in reproductive organs of *N. caerulescens* have rarely been documented. In aeroponics, a homogenous repartition of Cd among different aerial parts is suggested (Lovy *et al.* 2013). In the present experiment, metal uptake was influenced by the ratio of reproductive/vegetative biomass as Cd and Zn concentrations in reproductive organs were shown to be about half of those in the basal leaves. Nevertheless, in spite of the overall lower concentrations in reproductive parts, the analysis of a limited sample of seeds of GAN plants shows that they show Cd concentrations (150-280 µg g<sup>-1</sup>) two times higher than in the rest of the flower stalk. The GAN seed metal content obtained in this study (0.08-0.14 µg seed<sup>-1</sup>) reaches similar levels as in plants from natural metalliferous sites in South of France (0.13-0.21 µg seed<sup>-1</sup>) where the soil is highly contaminated (30-300 mg Cd kg<sup>-1</sup>) (Schwartz *et al.* 2006). This shows the genetic basis of Cd accumulation in seeds and suggests a physiological need of Cd for seedlings of the GAN ecotype.

#### 4.4. Implications for Cd and Zn phytoextraction strategies

Transplantation is clearly the best SS for phytoextraction in order to maximize the biomass of *N. caerulescens* plants (Hammer and Keller 2003; this study). Life-history traits have been neglected so far in designing cropping systems for phytoextraction with hyperaccumulator plants, but we show here that they markedly influence biomass production and hence extraction efficiency. The best season for transplantation was different according to the dominant life cycle of each population: fall for plants with a dominantly biennial cycle (LUX), and spring for annuals (GAN). Maximizing the length of growth across one season – despite



lower shoot concentrations – is the best strategy for a maximum uptake due to the increased biomass. This is especially true if it is not planned to make successive croppings but instead to follow rotational cropping to prevent disease development as suggested in Jacobs *et al.* (2018). Cultivars with biennial life cycle should be selected to maximize vegetative growth, especially for GAN which has the highest potential for Cd phytoextraction. NMET from Luxemburg with the best potential for Zn uptake are already mostly biennials. Selection should therefore focus more on biomass production and total metal uptake rather than on shoot metal concentrations (Schwartz *et al.* 2001). If biennial individuals are cultivated no matter the population, transplantation in the fall would then be the best option.

Nevertheless, direct sowing did not appear less efficient for metal uptake in all cases. Cadmium extraction was for example similar between SS when GAN plants were established in the fall, but still lower than with spring transplantation. One disadvantage of transplantation is the higher induction of flowering due to unwanted stress (*e.g.* 86% of LUX plants transplanted in the spring) which far exceeded the percentage of flowering observed in nature the first spring (about 4%) (Dechamps *et al.* 2011). The biggest limitation of transplantation so far would be the high cost in greenhouse space expected with upscaling of the technique, especially given the high planting densities required (about 100 plants m<sup>-2</sup> or 1 000 000 seedlings per ha) (Jacobs *et al.* 2018), and the difficulty to find commercial seed-producers and plant nurseries to produce the seedlings. The challenge with direct sowing is to ensure an efficient establishment and a rapid initial growth. Direct sowing is best performed in the fall with high humidity conditions and a lower prevalence of herbivory on seedlings than in the spring; late fall sowing prevents flowering as the minimum reproductive size is not yet reached after the winter. It would be interesting to test the effect of plastic tunnels (*e.g.* as used in market gardening) which maintain high humidity conditions and slightly increase temperature on seedling development.

Despite the large number of articles devoted to phytoextraction with *N. caerulescens* for more than 20 years, its use in actual remediation projects is obviously lacking due to some remaining uncertainties regarding the best use of hyperaccumulators in phytoextraction. As *N. caerulescens* has been shown to deplete the pool of phytoavailable metals (Gérard *et al.* 2000), it would seem sensible to grow this species just before, or nearby crops that tend to accumulate Cd. However, the clear-cut efficiency of hyperaccumulators in such use has not unequivocally be demonstrated (reviewed in Tang *et al.* 2012), notably because of uncertainties regarding the fate of metals remaining in the soil (desorption of metals by hyperaccumulators, replenishment of bioavailable metal pool,...). Removing these uncertainties and showing the usefulness of hyperaccumulators for agronomical purposes would undoubtedly arouse interest of remediation practitioners.

## 5. Conclusion

This study highlighted striking differences in life strategies between two contrasted populations of *N. caerulea* with important implications for the implementation of phytoextraction. Maximizing vegetative biomass production requires preventing reproduction, which is currently harder to get with CAL populations such as GAN (Ganges) that mostly have a winter annual life cycle but easy with the biennial or short-lived perennial cycle of NMET populations. Phytoextraction with direct sowing was overall less efficient than transplantation due to lower biomass production, but could be equivalent in some cases for metal uptake and should therefore be further optimized. A long growing season (12 months) was the most efficient for Zn extraction but was not better than a shorter summer cycle (7 months) for Cd extraction. Selection for biomass production and adequate life cycle could allow to obtain plant yields of 5 t ha<sup>-1</sup> in one growing season.

## Acknowledgments

A.J. is a research fellow of the Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (FRRIA, Belgium). The authors gratefully acknowledge the Contrat de Quartier Durable Bockstael for site access, and the Centre d'Ecologie Urbaine for project coordination and help in the field. We are also grateful to Alexandre Van Baekel and Kristel Wart for their technical help in laboratory analyses, field work and seed production.

---

# Chapitre 4

---

## Influence des conditions édaphiques et de la fertilisation azotée sur l'efficacité de phytoextraction du cadmium et du zinc par *Noccaea caerulescens*

-

## Influence of edaphic conditions and nitrogen fertilizers on Cd and Zn phytoextraction efficiency with *Noccaea caerulescens*

Les trois premières expériences de terrain ont notamment mis en évidence la très grande variabilité de rendement entre sites d'étude, sans toutefois pouvoir l'objectiver. Mener des essais sur un grand nombre de sites étant compliqué logistiquement, nous avons donc récolté des sols dans une vingtaine de sites dont les sols étaient potentiellement contaminés afin de réaliser une expérience de phytoextraction en pots. Le premier objectif était de comparer la croissance et l'accumulation des ETM de *N. caerulescens* sur ces différents sols et d'identifier les variables du sol qui influencent ces paramètres. Deuxièmement, en continuité du deuxième chapitre, nous avons évalué l'effet de l'apport d'azote sur cette gamme de sols à la fertilité variable.



# Influence of edaphic conditions and nitrogen fertilizers on Cd and Zn phytoextraction efficiency with *Noccaea caerulescens*

Arnaud Jacobs, Nausicaa Noret, Alexandre Van Baekel, Amandine Liénard, Gilles Colinet, Thomas Drouet

*Submitted to Science of the Total Environment in September 2018*

## Abstract

The success of cadmium phytoextraction operations with *Noccaea caerulescens* varies by a factor of 70 between sites of trials. However, soil factors driving the efficiency of Cd and Zn phytoextraction are still poorly understood, as are the effects of nitrogen fertilizers. We studied biomass production and Cd and Zn uptake by two contrasting populations of *N. caerulescens*, Ganges (metallicolous) and Wilwerwiltz (non-metallicolous) grown in pots on a range of 24 field contaminated soils for 20 weeks. The addition of KNO<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> fertilizers was also tested. Using model averaging of multiple regression models, we show that the major drivers of *N. caerulescens* growth are physical soil factors such as organic matter and soil bulk density while metal accumulation mainly relies on soil Cd and Zn exchangeable concentrations. We confirm the negative effect of soil Cu on growth, even at concentrations below 100 mg kg<sup>-1</sup>, and therefore on uptake efficiency, while increasing soil Pb content was related to increased biomass probably due to a protective effect against soil pathogens. Finally, there is a small positive effect of nitrogen fertilization on biomass production only in soils with low initial N content (under 25 µg g<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), while above this value, the positive impact of natural nitrogen content is offset by lower shoot Cd and Zn concentrations. Our data bring substantial information regarding the physico-chemical properties to ensure *N. caerulescens* growth and show that phytoextraction efficiency is maximal for moderate soil contamination in Cd (2-10 mg kg<sup>-1</sup>) and Zn (300-1000 mg kg<sup>-1</sup>).

**Keywords:** Cadmium, Fertilization, Hyperaccumulation, Phytoremediation, Lead, Zinc

## 1. Introduction

*Noccaea caerulescens* is a Cd, Zn and Ni hyperaccumulator, well known to be a model species for the study of metal tolerance, homeostasis and hyperaccumulation (Assunção *et al.* 2003a, Krämer 2010). It is also considered as a good candidate for Cd and/or Zn phytoextraction of soils with moderate contamination and has been tested numerous times on the field (Hammer and Keller 2003, Jacobs *et al.* 2017, 2018a, 2018b, Maxted *et al.* 2007, McGrath *et al.* 2006, Schwartz *et al.* 2003). In field trials large differences in biomass production of *N. caerulescens* were recorded between sites and plots within and among studies, sometimes by a factor of 5 (from 0.74 to 3.65 t ha<sup>-1</sup> in McGrath *et al.* 2006, from 1.5 to 4 t ha<sup>-1</sup> in Maxted *et al.* 2007 and from 1 up to 5 t ha<sup>-1</sup> in Jacobs *et al.* 2017, 2018a). This results from differences of populations used, cultural practices, meteorological conditions and length of growth between studies, but also to large differences in soil characteristics. Edaphic factors are also well-known to influence soil metal bioavailability (Alloway 2013), and therefore accumulation levels in hyperaccumulator plants (Keller and Hammer 2004, Yanai *et al.* 2006). This overall variability makes phytoextraction efficiency poorly predictable.

Efficiency of metal extraction depends on both shoot metal concentrations and plant biomass, the second being often neglected. Most of our knowledge on the influence of the natural variation of soil parameters on *N. caerulescens* biomass production is restricted to the influence of pH, and soil Cd and Zn to a minor extent (Maxted *et al.* 2007, Wang *et al.* 2006, Yanai *et al.* 2006). Yanai *et al.* (2006) found that at very acidic pH (4.4), *N. caerulescens* (Ganges population) showed a strong reduction of growth. In a second study, Wang *et al.* (2006) showed that *N. caerulescens* growth was highest at the low soil pH (4.7) with high soil contamination (25.4 and 1500 mg kg<sup>-1</sup>, of Cd and Zn), and at intermediate soil pH (6.1) with lower soil contamination (5 and 450 mg kg<sup>-1</sup>). *N. caerulescens* growth is stimulated by the presence of metals as a certain physiological need in Cd and/or Zn has been demonstrated previously for metallicolous (MET) populations, mostly Ganges (Escarré *et al.* 2000, Pongrac *et al.* 2009, Yanai *et al.* 2006), and in one case for non-metallicolous (NMET) populations (Jacobs *et al.* 2017). It has been shown that *N. caerulescens* has an elevated Zn deficiency threshold due to enhanced vacuolar sequestration which could explain a higher physiological need (Shen *et al.* 1997). It is also known that an excess in soil Cu can reduce *N. caerulescens* growth, probably due to an inhibition of Fe transport (Lombi *et al.* 2001b, McGrath *et al.* 2006, Walker and Bernal 2004). Finally, *N. caerulescens* mostly grows on rocky shallow soils with good drainage in its sites of origin in Belgium and Luxemburg (Dechamps *et al.* 2008, Meerts and Grommesch 2001, Molitor *et al.* 2005) and in the Swiss Jura (Basic *et al.* 2006) which suggests some preference for an aerated soil structure.

Metal uptake by *N. caerulescens* has been more studied than its biomass production but most studies have so far also mostly concentrated on the soil metal load and variation in pH (Maxted *et al.* 2007, McGrath *et al.* 2001, 2006, Wang *et al.* 2006, Yanai *et al.* 2006, Zhao *et al.* 2003). Two studies found that Cd and Zn uptake were maximum at pH between 5 and 6 (Wang *et al.* 2006, Yanai *et al.* 2006). With the “Ganges” population, Yanai *et al.* (2006) showed that total Cd and Zn and pH were the best predictors of Cd and Zn concentrations and uptake on a large range of soil Cd concentrations while clay and organic carbon also explained some of the variation. Based on pot and field trials with *Ganges* plants, Maxted *et al.* (2007) presented a model of Cd uptake depending on Cd free ion activity in the soil solution calculated with total soil Cd, pH and soil organic carbon. Rosenfeld *et al.* (2018) recently highlighted the impact of soil geochemical factors (such as Fe oxide or sulfur solid phases) in addition to soil Cd and pH on *N. caerulescens* Cd uptake in four contaminated soils. Furthermore, multiple positive and negative interactions between soil trace metals of interest (Cd, Zn) and others (Cu, Fe) influence *N. caerulescens* uptake (Lombi *et al.* 2002, Tolrà *et al.* 1996, Walker and Bernal 2004) but little is known on the overall effect on phytoextraction efficiency. There is therefore a high interest in understanding the influence of other major chemical and physical properties of the soil on *N. caerulescens* growth and to rank the relative importance of soil properties in the influence of total metal uptake, *i.e.* phytoextraction efficiency.

It is commonly accepted that one easy way to enhance aerial biomass production of plants is through nitrogen fertilization. All pot and field studies have shown a positive effect of N fertilization on *N. caerulescens* growth (Bennett *et al.* 1998, Schwartz *et al.* 2003, Sirguy *et al.* 2006, Monsant *et al.* 2008, Xie *et al.* 2009, Jacobs *et al.* 2018a). Nevertheless, N fertilization also results in lower Cd and Zn shoot concentrations due to metal dilution in leaves and/or competition with the nitrogen fertilizers in the rhizosphere, with a stronger effect with  $\text{NH}_4^+$  than  $\text{NO}_3^-$  (Monsant *et al.* 2008, Xie *et al.* 2009, Jacobs *et al.* 2018a). All in all, nitrogen input increases metal uptake only at high doses (80–150 mg N  $\text{kg}^{-1}$  dry soil), while at lower doses of nitrogen (30 mg N  $\text{kg}^{-1}$ ) it has no positive effect on metal uptake. In the field, nitrogen addition was either positive in favorable growth conditions, or neutral to slightly negative in unfavorable growth conditions (high pH and high soil density) (Jacobs *et al.* 2018a). We hypothesize that the effect of a reasonable nitrogen fertilization will depend mostly on the initial N content and potentially on other soil fertility parameters.

To improve the predictability of phytoextraction, we conducted a pot trial with two contrasting populations of *N. caerulescens* during 20 weeks on 24 field soils with moderate contamination, representative of the Belgian contaminated soils where phytoextraction could be applicable. Soils were characterized by more than 20 physico-chemical variables and data

were analyzed by means of model averaging of multiple regression models which allows for more robust inference than traditional stepward model selection. We also compared the effect of two different nitrogen treatments,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  and  $\text{KNO}_3$ , as it has been suggested that *N. caerulea* may react more strongly to  $\text{NO}_3^-$  (Schwartz *et al.* 2003, Sirguey *et al.* 2006). The objectives of the present study were 1) to investigate the effects of soil metals and physico-chemical characteristics and 2) to test the effect of moderate nitrogen fertilization, on *N. caerulea* growth and metal uptake, assessed for two contrasting ecotypes on a wide range of field contaminated soils.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Soil sampling and analysis

Soils were collected in 24 sites (urban wastelands, nature reserves, collective and private gardens) in Brussels and Wallonia (Belgium). Sites were chosen based on a recorded metal contamination or one assumed by the users. On each site the soil was sampled up to 30 cm depth as a composite of 5 subsamples. Soils were homogenized with a rotative sieve (Scheppach® RS 400) and the coarse fraction ( $> 5$  mm) was removed. General site and soil characteristics are shown in Table 1 and the first two ordination axes of PCA are presented in Figure 1, while detailed soil physico-chemical properties can be found in Table S1.

Soil characterization was carried out following standard protocols of soil analysis (Pansu and Gautheyrou 2006). Soil samples were air-dried and sieved at 2 mm. The remaining fraction ( $2 < d < 5$  mm) was estimated as the gravel charge of the soil (GC). Soil pH- $\text{H}_2\text{O}$  was measured using glass electrodes in a 1:5 soil:water suspension. Organic matter content (OM, %) was measured by loss on ignition at 500 °C. The cation exchange capacity (CEC,  $\text{cmol}_c \text{kg}^{-1}$ ) was measured on a soil extract with cobaltihexamine trichloride according to ISO 23470:2007. Total trace metal concentrations were measured on a tri-acid (HCl 37%,  $\text{HNO}_3$  65%, HF 40%) dissolution of finely ground soil samples (200  $\mu\text{m}$ ) on a hot plate at 70 °C during 48 h. The dry residue was re-dissolved with 1 mL  $\text{HNO}_3$  65% in a volume of 30 mL and total element concentrations were determined by inductively coupled plasma emission spectrometry (ICP-OES) (Varian Vista-MPX) and checked with a certified reference soil material (SRM 2711a, Montana II Soil). Exchangeable cations (Al, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, Pb, Zn) were extracted with ammonium acetate 0.5 M-EDTA 0.02 M at pH 7 (Cottenie *et al.*, 1979) and their concentrations were measured by ICP-OES (Varian Vista-MPX). Soil texture (percentage of clay, silt and sand) was determined using wet sieving and the pipette method after OM destruction with  $\text{H}_2\text{O}_2$  and Na citrate dispersion of clay. Undisturbed soil cores were taken after cultivation for soil bulk density (BD) measurement (cylinder method). A water permeability index (PI) was measured as the infiltration speed of 50 mL water over 6

hours in undisturbed soil cores previously wetted to field capacity. A carbonate index (CARB) was determined by a simple reaction to 10% HCl with a binary response: 0 (no or very weak reaction) or 1 (strong visual reaction). Mineral  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  exchangeable concentrations were measured on 1 M KCl extract of fresh soil samples collected in pots before the first nitrogen application by the sulphanilamide colorimetric method for  $\text{NO}_3^-$  and indophenol blue method for  $\text{NH}_4^+$ , and expressed in units of nitrogen (N- $\text{NO}_3$  and N- $\text{NH}_4$  in  $\text{mg kg}^{-1}$ ).

## 2.2. Pot experiment and plant analysis

Plastic pots of 500  $\text{cm}^3$  were filled with 400 g of air-dried soil mixed with 150 g of quartz gravel (6-12mm) to maintain aeration and limit compaction. Plants were grown for two months in commercial garden compost in outdoor conditions under shelter and seedlings were transplanted in early April 2017 at the four-to-six leaves stage in 516 pots with contaminated soils (24 soils  $\times$  2 populations  $\times$  3 treatments  $\times$  3-4 replicates). Pots were placed in an unheated plastic greenhouse and gathered in plastic watering trays by soil and treatment. Trays were randomized every two weeks. Two populations of *Noccaea caerulescens*, one metallicolous (MET) from Ganges, hereafter GAN (village of Saint-Laurent-le-Minier, South of France), and one non-metallicolous (NMET) from Luxemburg, hereafter LUX (village of Wilwerwiltz) were used. After two weeks, dead plants were replaced. Nitrogen treatment ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  or  $\text{KNO}_3$ , in solution) was added for the first time one month after transplantation and then every three weeks (each time 10  $\text{mg N kg}^{-1}$  Dry Soil for a total of 40  $\text{mg N kg}^{-1}$  DS) while no nitrogen was added in the control pots. Plants were watered every week. Pychlorex (chlorpyrifos 5%) was applied once in all pots following an invasion of sciarid flies larvae. All flower stalks were cut off the first week of June and August to promote vegetative growth.

After 20 weeks of growth aerial plant parts were harvested. Mortality was estimated as the number of missing or dead plants. Plants were thoroughly washed with tap water and rinsed with deionized water. Reproductive and vegetative biomass of 65 °C oven-dried plants was measured. Plant parts (reproductive and vegetative) were ground together with a Retsch ZM100 mill and subsamples of 0.4 g were dry-ashed during 12 h at 450 °C and dissolved with concentrated  $\text{HNO}_3$  (65%). Concentrations in trace metals (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) and major elements (Ca, Mg, K, P, Fe) – expressed as  $\mu\text{g g}^{-1}$  of 105 °C-dried plant – were measured by ICP-OES (Varian, Vista MPX). Method accuracy was checked with NIST standard reference (SRM 1547, Peach leaves) and an in-house standard. Plant metal uptake (expressed in  $\mu\text{g plant}^{-1}$ ) was calculated as the product of plant biomass and shoot Cd or Zn concentrations.



### 2.3. Statistical analysis

Plant and soil variables were transformed using the Box-Cox function prior to all analyses. The variations in biomass production (vegetative and reproductive) and Cd and Zn concentrations and uptake were analysed by means of three-way analysis of variance to test for the effects of soil, nitrogen treatments ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  or  $\text{KNO}_3$ ) and population (GAN and LUX). We conducted analyses of covariance of biomass production to test the interaction between initial soil nitrogen content (N- $\text{NH}_4$  and N- $\text{NO}_3$  as covariables) and the treatment effect. Data transformation and analysis of variance were performed using the package 'car' (Fox *et al.* 2011).

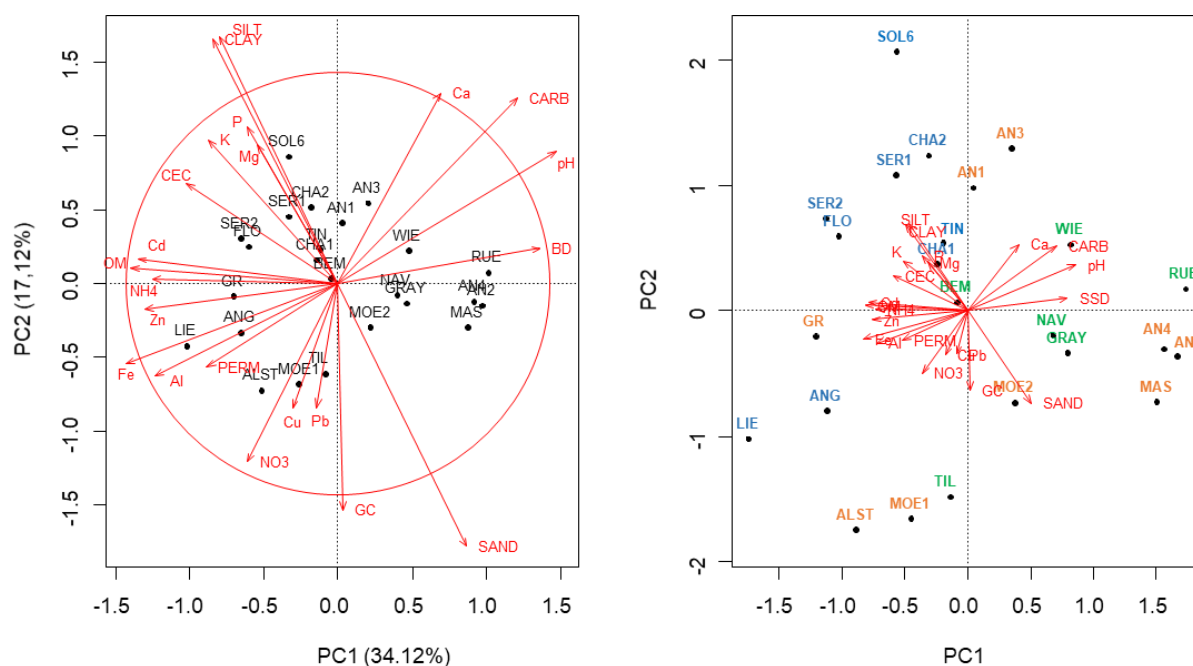
To determine which soil factors influence the most biomass production, shoot metal concentrations and metal uptake, we used a model averaging approach (Burnham and Anderson, 2002) to construct a linear regression model based on data obtained on the control treatment. In this model, we used as predictor variables exchangeable concentrations in trace metals and macroelements instead of total concentrations because: 1) the former are more representative of short term availability and informative for plant-soil interactions, and 2) metal uptake by *N. caerulea* is better explained by labile or exchangeable trace metal concentrations (Hutchinson *et al.* 2000, Knight *et al.* 1997, Sterckeman *et al.* 2004). First, we conducted a selection among the 22 soil variables measured to reduce collinearity to a maximum correlation of 0.7 between two variables using the *vifcor* function in package *usdm* (Naimi *et al.* 2014). One exception was made for soil Cd and Zn concentrations which were both kept for further analysis despite their correlation ( $r = 0.85$ ). We scaled and centred the 16 remaining selected soil variables to allow for comparison between variable estimates. All possible linear models were constructed using a combination of the selected soil variables as explanatory variables (with a maximum of 10 variables in each model), to account for biomass production, shoot Cd and Zn concentrations, and Cd and Zn uptake. The models were first ranked according to their corrected Akaike Information Criterion (AICc). Model averaging was performed with the function *model.select* (for similar use, see Simon-Delso *et al.* 2017) using shrinkage averaging over all possible models to calculate AICc weights of importance, average coefficients and unconditional standard errors for each variable (Burnham and Anderson, 2002). This method shrinks the average coefficients towards 0 for variables mostly present in the poorly supported models. The AICc variable weights (*i.e.* the probability for a given variable to be present in the best model if data is resampled) enable the comparison of relative importance of variables. A reasonable minimum threshold of 0.7 of AICc variable weight was chosen as a criterion to interpret only the most important variables. Results were confirmed by a second method from the *glmulti* package which conducts model averaging over the 100 best models (*i.e.* with the lowest AICc) with an

iterative algorithm (Calcagno and de Mazancourt 2010). All statistical analyses were conducted with the R statistical software v 3.4.4 (R Development Core Team 2018).

**Table 1.** General information on the soils used for experimentation, their locations and major chemical characteristics (other soil variables can be found in Table S1). Soils sampled are located in two regions (Brussels (B) and Wallonia (W)) and are either community gardens (CG), private gardens (PG), urban wastelands (UW) or nature reserves (NR). Values are means of analytical triplicates, and metal concentrations in bold are above legal thresholds in Brussels or Wallonia (for each element, the lowest threshold is chosen).

Soil	Location (Region, type of site)	pH	OM (%)	N-NO <sub>3</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	N-NH <sub>4</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	Total concentrations <sup>1</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )				Exchangeable <sup>2</sup> concentrations (mg kg <sup>-1</sup> )			
						Cd	Cu	Pb	Zn	Cd	Cu	Pb	Zn
ALST	Laeken (B, CG)	6.61	20.2	187	0.72	1.4	<b>141</b>	<b>222</b>	<b>334</b>	0.70	42	70	151
AN1	Anderlecht (B, UW)	7.24	8.0	420	0.77	0.6	26	103	126	0.46	7	48	44
AN2	Anderlecht (B, UW)	7.68	4.1	0.9	0.13	1.0	49	<b>572</b>	217	0.36	14	290	40
AN3	Anderlecht (B, UW)	7.69	5.4	0.8	0.85	1.0	73	<b>301</b>	228	0.89	52	295	91
AN4	Anderlecht (B, UW)	7.85	4.5	1.0	0.48	1.2	94	<b>473</b>	226	0.35	29	195	36
ANG	Angleur (W, PG)	6.82	13.6	5.4	9.24	<b>3.7</b>	107	<b>719</b>	<b>1700</b>	3.01	38	209	730
BEM	Forest (B, CG)	7.13	6.0	66	1.63	1.2	49	182	227	0.91	18	72	104
CHA1	Châtelet (W, PG)	7.00	16.6	7.5	1.75	1.7	86	<b>247</b>	<b>592</b>	0.76	19	66	177
CHA2	Châtelet (W, PG)	7.24	19.9	2.0	0.67	1.2	84	<b>419</b>	<b>479</b>	0.58	13	103	164
FLO	Flône (W, PG)	6.96	9.4	13.5	28.6	<b>6.2</b>	32	198	<b>1460</b>	5.41	10	121	730
GR	Laeken (B, UW)	6.76	19.9	858	1.07	1.3	94	<b>279</b>	<b>315</b>	0.87	33	113	127
GRAY	Ixelles (B, CG)	7.63	5.6	27.4	0.76	1.3	<b>172</b>	<b>262</b>	<b>2390</b>	0.61	80	120	830
LIE	Liège (W, PG)	6.24	16.9	6.2	28.9	<b>20.0</b>	<b>240</b>	<b>841</b>	<b>5320</b>	13.86	101	383	3200
MAS	Brussels (B, UW)	8.01	5.0	39.1	0.52	1.6	<b>205</b>	<b>287</b>	<b>427</b>	0.67	39	94	51
MOE1	Evere (B, NR)	6.84	10.5	174	0.43	<b>2.0</b>	70	<b>1480</b>	<b>2650</b>	1.37	24	580	850
MOE2	Evere (B, NR)	7.18	8.7	750	2.29	1.0	26	<b>1410</b>	209	0.37	7	710	75
NAV	Schaerbeek (B, CG)	7.47	7.0	3.2	0.40	1.3	110	<b>263</b>	278	0.50	46	102	76
RUE	Molenbeek (B, CG)	7.93	4.3	0.8	0.38	1.1	28	152	188	0.17	7	47	30
SER1	Seraing (W, PG)	7.20	13.5	2.1	1.03	<b>2.8</b>	88	<b>412</b>	<b>735</b>	1.52	23	114	232
SER2	Seraing (W, PG)	6.95	13.3	19.7	1.33	<b>2.6</b>	69	181	<b>597</b>	1.64	16	72	235
SOL6	Vaux-sous- Chèvremont (W, PG)	7.35	9.8	1.3	0.93	<b>3.0</b>	53	154	<b>584</b>	1.91	16	59	180
TIL	Uccle (B, CG)	6.26	4.4	83	1.44	0.6	29	92	75	0.29	17	68	48
TIN	Tinlot (W, PG)	7.01	7.5	1.2	4.12	1.6	40	<b>525</b>	<b>593</b>	0.82	13	175	247
WIE	Forest (B, CG)	7.82	8.1	0.9	0.46	0.9	84	<b>301</b>	<b>307</b>	0.21	18	56	51
	MIN	6.24	4.1	0.8	0.13	0.6	26	92	75	0.17	7	47	30
	MAX	8.01	20.2	858	28.9	20	240	1480	5320	13.86	101	710	3200
<b>Legal intervention thresholds for agricultural soils <sup>3</sup></b>					<b>Brussels</b>	<b>2</b>	<b>120</b>	<b>200</b>	<b>333</b>				
					<b>Wallonia</b>	<b>10</b>	<b>145</b>	<b>400</b>	<b>300</b>				

<sup>1</sup> Tri-acid dissolution; <sup>2</sup> EDTA-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> acetate extraction; <sup>3</sup> Based on aqua regia dissolution



**Figure 1** Biplots (left: scaling 1 - distance, right: scaling 2 - correlations) of the first two ordination axes of the principal component analysis of the 22 soils variables measured in the 24 soils used in the pot experiment. Colors of the soils indicate the type and/or origin: private gardens in Wallonia (blue), collective gardens (green), urban wastelands and nature reserves in Brussels (orange).

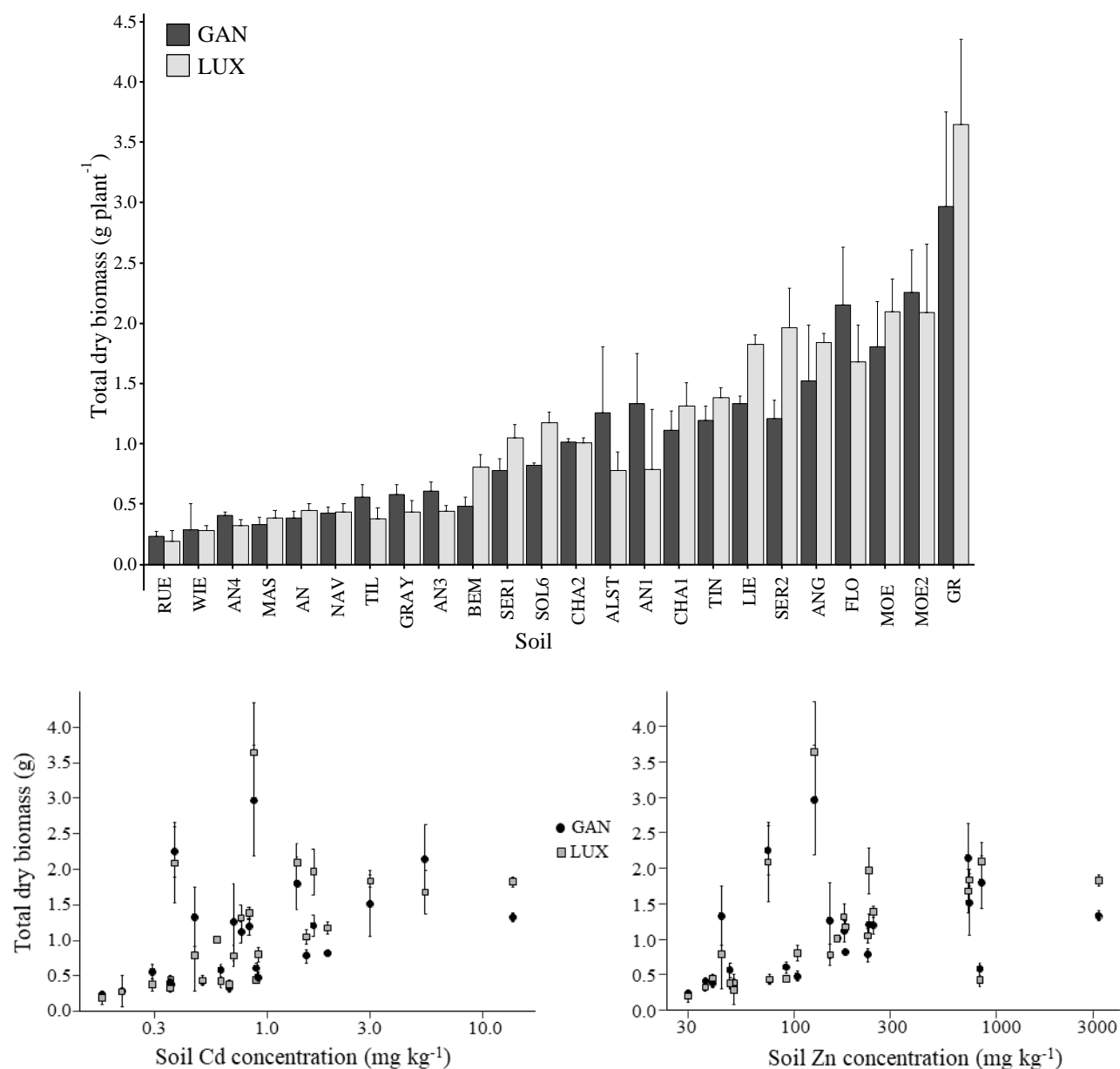
### 3. Results

#### 3.1. Growth and metal accumulation on 24 unfertilized soils: differences between populations

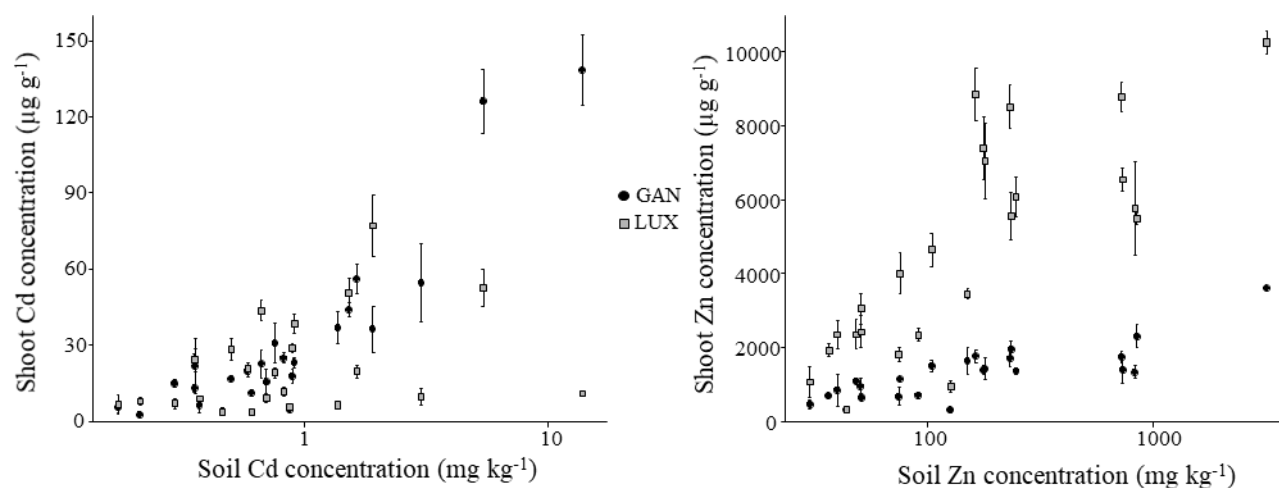
The average survival rate on the 24 control soils was 89%, most of the mortality being probably due to pests (sciarid flies larvae, *personal observation*). Average biomass production, shoot macronutrients and metal concentrations on the 24 control soils can be found in Table S2. After 20 weeks, average aerial plant biomass on the control soil (without N fertilization) was 1.08 g (LUX 1.12 g and GAN 1.04 g,  $p > 0.05$ ) and ranged across soils from 0.21 g (RUE) to 3.3 g (GR) (Fig. 2). GAN plants produced on average more reproductive biomass (0.37 g) than LUX (0.13 g) ( $p < 0.001$ ), whereas vegetative biomass of GAN plants (0.68 g) was lower than LUX (0.99 g) ( $p < 0.001$ ) (Table S3).

As expected, shoot Cd concentrations were overall higher in GAN plants ( $31 \mu\text{g g}^{-1}$ , ranging from 3 to  $138 \mu\text{g g}^{-1}$ ) than in LUX plants ( $22 \mu\text{g g}^{-1}$ , ranging from 4 to  $77 \mu\text{g g}^{-1}$ ) ( $p < 0.001$ ), the difference being more pronounced on soils with higher contamination (Fig. 3). Conversely shoot Zn concentrations were significantly higher in LUX plants ( $4290 \mu\text{g g}^{-1}$ , from 320 to  $10250 \mu\text{g g}^{-1}$ ) than in GAN plants ( $1250 \mu\text{g g}^{-1}$ , from 300 to  $3600 \mu\text{g g}^{-1}$ ) on all soils ( $p < 0.001$ ) (Fig. 3).

Correlations between macronutrient and metal concentrations in shoots were calculated at the species and population levels on the control (only significant correlations with  $|r| > 0.3$  are indicated). For shoot macronutrients there was a significant correlation between Ca and Mg ( $r = 0.36$ ) and K and P ( $r = 0.40$ ) at the species level. For trace elements, Cd, Zn and Ni were correlated (Cd-Zn:  $r = 0.40$ , Cd-Ni:  $r = 0.45$ , Zn-Ni:  $r = 0.43$ ). Correlations were stronger and not always of the same nature when considering populations separately: for GAN, Ca and Mg ( $r = 0.55$ ), K and P ( $r = 0.65$ ), Cd and Zn ( $r = 0.80$ ), Cd and Mn ( $r = 0.50$ ) and Ni and Cu ( $r = 0.44$ ); for LUX, K and P ( $r = 0.50$ ), Cd and Zn ( $r = 0.51$ ), Cd and Ni ( $r = 0.74$ ), Ni and Cu ( $r = 0.48$ ), Zn and Mn ( $r = 0.56$ ).



**Figure 2** Shoot biomass (vegetative plus reproductive) of *N. caerulescens* plants (GAN and LUX populations) grown on 24 different soils during 20 weeks (control treatment). Data are means + SE ( $n = 2-4$  plants per population  $\times$  soil), ranked by increasing mean values of both populations (top), or as a function of soil exchangeable Cd and Zn concentrations (bottom).

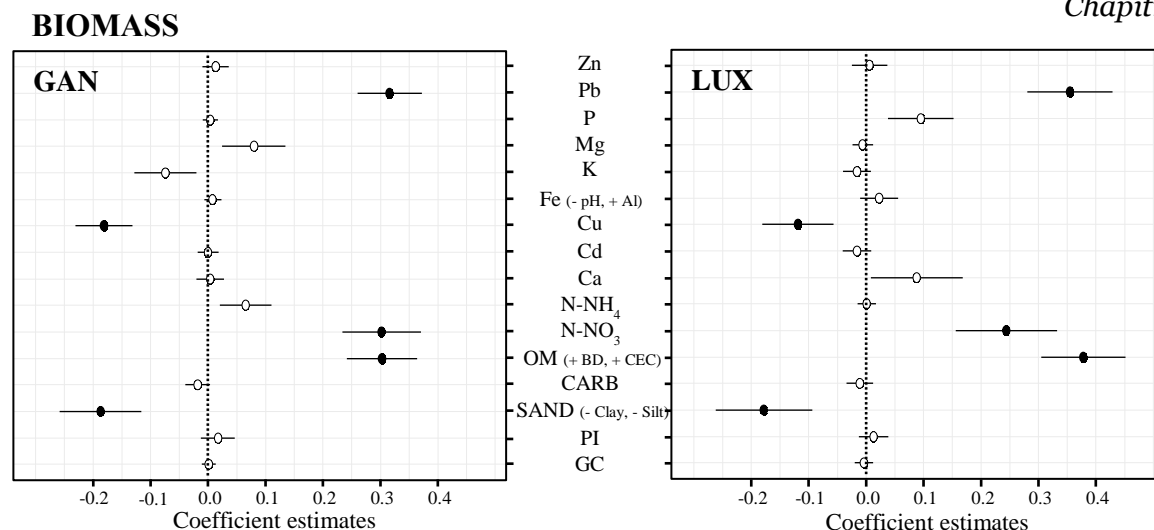


**Figure 3** Shoot Cd and Zn concentrations in *N. caerulea* plants (GAN and LUX populations) grown on 24 different soils during 20 weeks (control treatment), as a function of soil Cd and Zn exchangeable concentrations (EDTA-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> acetate) (logarithmic scale). Data are means  $\pm$  SE (n = 2-4 plants per population  $\times$  soil).

### 3.2. Influence of soil parameters

The influence of soil parameters on biomass production and metal accumulation was assessed by means of a selection of linear models with model averaging performed on the two populations separately. Three groups of collinear soil variables (correlation  $r > 0.7$ ) were identified in the dataset, and only one variable per group was kept as explanatory variable for model selection and chosen to minimize collinearity with other variables: **OM** which was correlated with CEC and BD was kept, **Sand** with Silt and Clay, **Fe** with pH and Al. A threshold of AICc variable weight of importance  $w > 0.7$  was set to identify the most important explanatory variables significantly supported by the models; for instance, a factor with a  $w = 0.95$  was kept in 95% of the 100 best regression models.

For biomass production, selected explanatory variables are the same for both populations. Coefficient estimates (in parentheses) indicate the magnitude and the sign of the effect on the response variable. OM content (GAN 0.3, LUX 0.38), Pb (GAN 0.32, LUX 0.36) and initial N-NO<sub>3</sub> (GAN 0.3, LUX 0.24) positively influenced biomass production while Cu (GAN -0.18, LUX -0.12) and Sand (GAN -0.19, LUX -0.18) had a negative influence (Fig. 4). In order to rule out potential effects of outliers and interpret with confidence the effect of Pb, we performed new model selection without three soils with extreme Pb and Zn values (LIE, MOE1 and MOE2) and the results were mostly similar (Table S4). Effect curves of the selected variables enable to show that the effect of some variables occurs mostly in a specific range – between 0 and 50 mg kg<sup>-1</sup> for N-NO<sub>3</sub>, 0 and 300 mg Pb kg<sup>-1</sup> and 0 and 30 mg Cu kg<sup>-1</sup> – while for OM and Sand the effect is almost linear (Fig. S1).



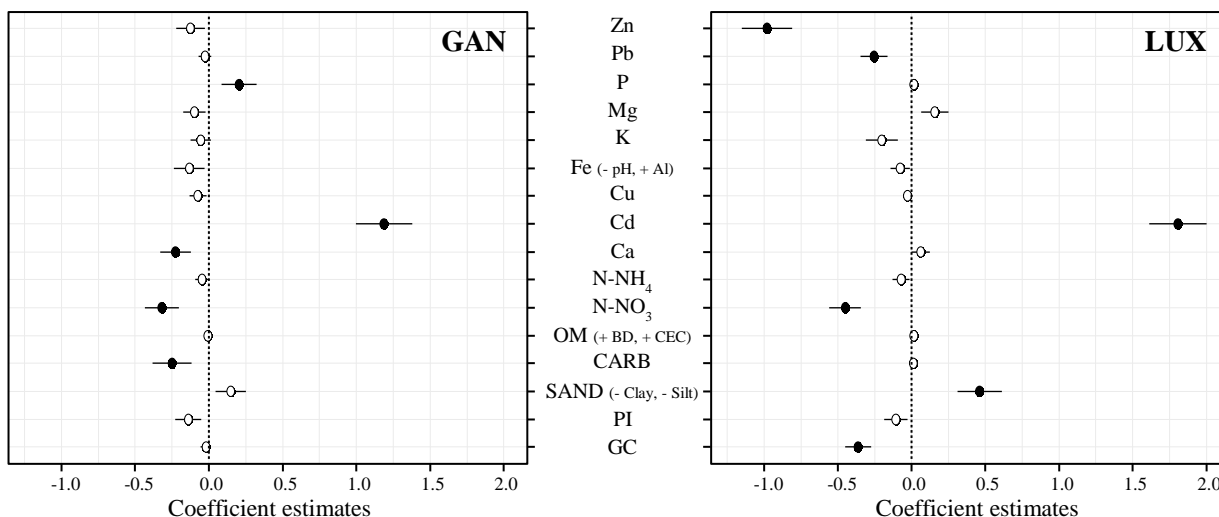
**Figure 4** Results of model averaging of linear regression models aiming at explaining the variation of biomass production of *N. caeruleus* as a function of 16 soil variables (lines). Coefficient estimates are the averaged coefficients for each standardized soil variable ( $\pm$  unconditional standard error), solid circles for the variables significantly supported by the models (AICc weight  $w > 0.7$ ), empty circles for the variables with AICc weight  $w < 0.7$ . Variables between brackets are positively (+) or negatively (-) correlated ( $|r| > 0.7$ ) to the variable retained in model selection. CARB = Carbonate index, PI = Permeability index, GC = Gravel charge.

Shoot Cd concentration is mainly explained by soil Cd for both populations (GAN 1.19, LUX 1.81) (Fig. 5). A negative influence of initial N-NO<sub>3</sub> on shoot Cd concentrations is highlighted for both populations (GAN -0.32, LUX -0.45). In LUX plants, shoot Cd concentration is also negatively influenced by soil Zn (-0.98), and to a minor extent by Gravel Charge (GC; -0.36) and Pb (-0.26). In GAN plants the CARB index (-0.25) and Ca (-0.23) have a small negative influence on Cd accumulation.

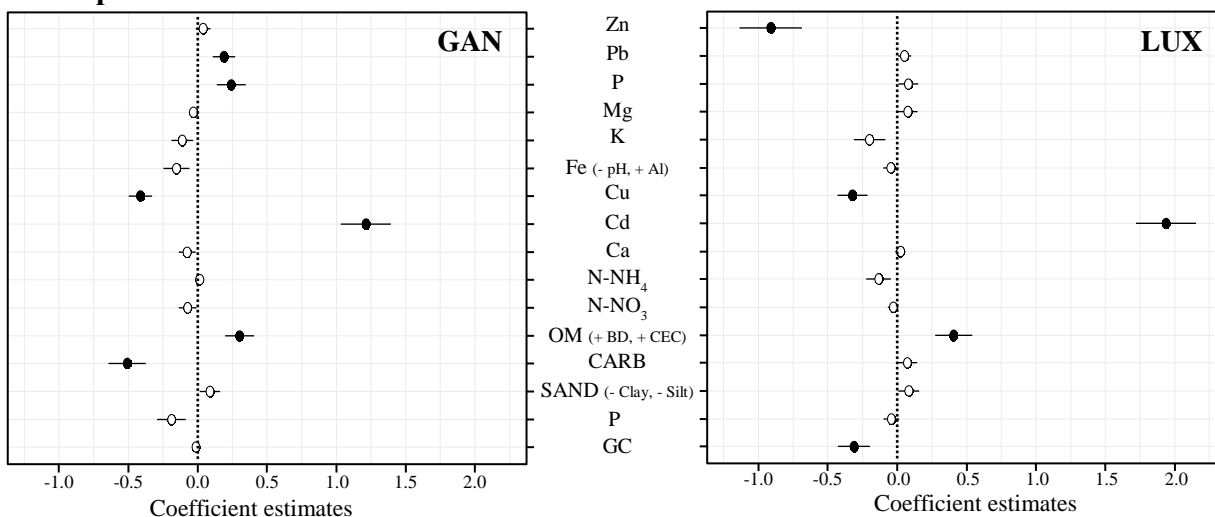
Shoot Zn concentrations are also mainly influenced by soil Zn (GAN 0.43, LUX 0.75) but also by soil Cd (GAN 0.36, LUX 0.61) (Fig. 6). In LUX plants, shoot Zn concentration is also negatively influenced by N-NO<sub>3</sub> (-0.62) and GC (-0.31), and positively by Sand (0.54), while in GAN plants it is by NH<sub>4</sub> (-0.17) and Ca (-0.28).

On the whole, Cd and Zn uptake (*i.e.* product of biomass and shoot Cd or Zn concentrations) are explained by a combination of the above mentioned variables, with however trade-off for variables who had opposed effects on the two components of the uptake. Cadmium uptake is mostly dependent of soil Cd (1.94), Zn (-0.91), and secondarily OM (0.41), Cu (-0.32) and GC (-0.31) for LUX, while for GAN population soil Cd (1.21), CARB (-0.51), Cu (-0.41) and OM (0.3) are the main explanatory variables (Fig. 5). Zinc uptake depends mostly on soil Cd (or Zn) (0.91) and OM (0.92) but also P (0.5) and Pb (0.38) for LUX, and on Zn (0.71), OM (0.49) and Cu (-0.31) for GAN (Fig. 6). Effect curves of the selected variables on Cd uptake show that soil Cd is by far the most influential variable and that the negative effect of soil Zn on LUX uptake occurs mostly between 0 and 300 mg Zn kg<sup>-1</sup> (Fig. S2). For Zn uptake, the effect curves highlight the larger influence of soil determinants other than soil Zn compared to Cd uptake (Fig. S3).

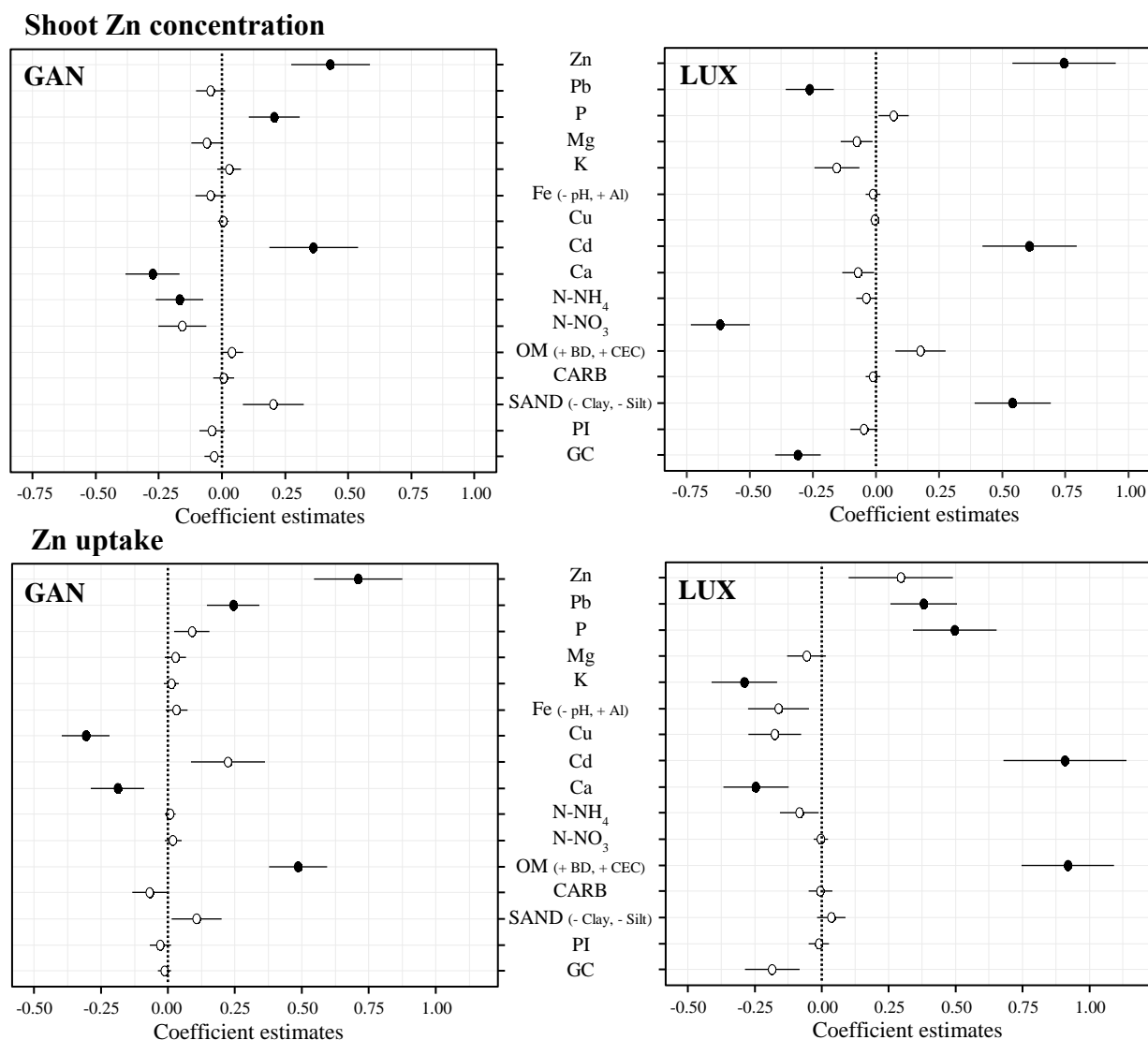
Shoot Cd concentration



Cd uptake



**Figure 5** Results of model averaging of linear regression models aiming at explaining the variation of shoot Cd concentration and Cd uptake of *N. caerulea* as a function of 16 soil variables (lines). Coefficient estimates are the averaged coefficients for each standardized soil variable ( $\pm$  unconditional standard error), solid circles for the variables significantly supported by the models (AICc weight  $w > 0.7$ ), empty circles for the variables with AICc weight  $w < 0.7$ . Variables between brackets are positively (+) or negatively (-) correlated ( $|r| > 0.7$ ) to the variable retained in model selection. CARB = Carbonate index, PI = Permeability index, GC = Gravel charge.



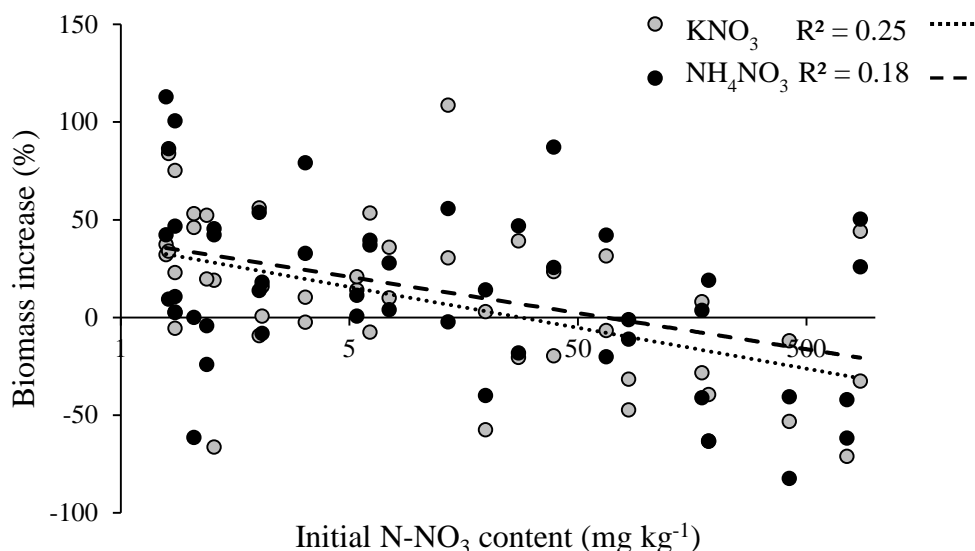
**Figure 6** Results of model averaging of linear regression models aiming at explaining the variation of shoot Zn concentration and Zn uptake of *N. caerulea* as a function of 16 soil variables (lines). Coefficient estimates are the averaged coefficients for each standardized soil variable ( $\pm$  unconditional standard error), solid circles for the variables significantly supported by the models (AICc weight  $w > 0.7$ ), empty circles for the variables with AICc weight  $w < 0.7$ . Variables between brackets are positively (+) or negatively (-) correlated ( $|r| > 0.7$ ) to the variable retained in model selection. CARB = Carbonate index, PI = Permeability index, GC = Gravel charge.



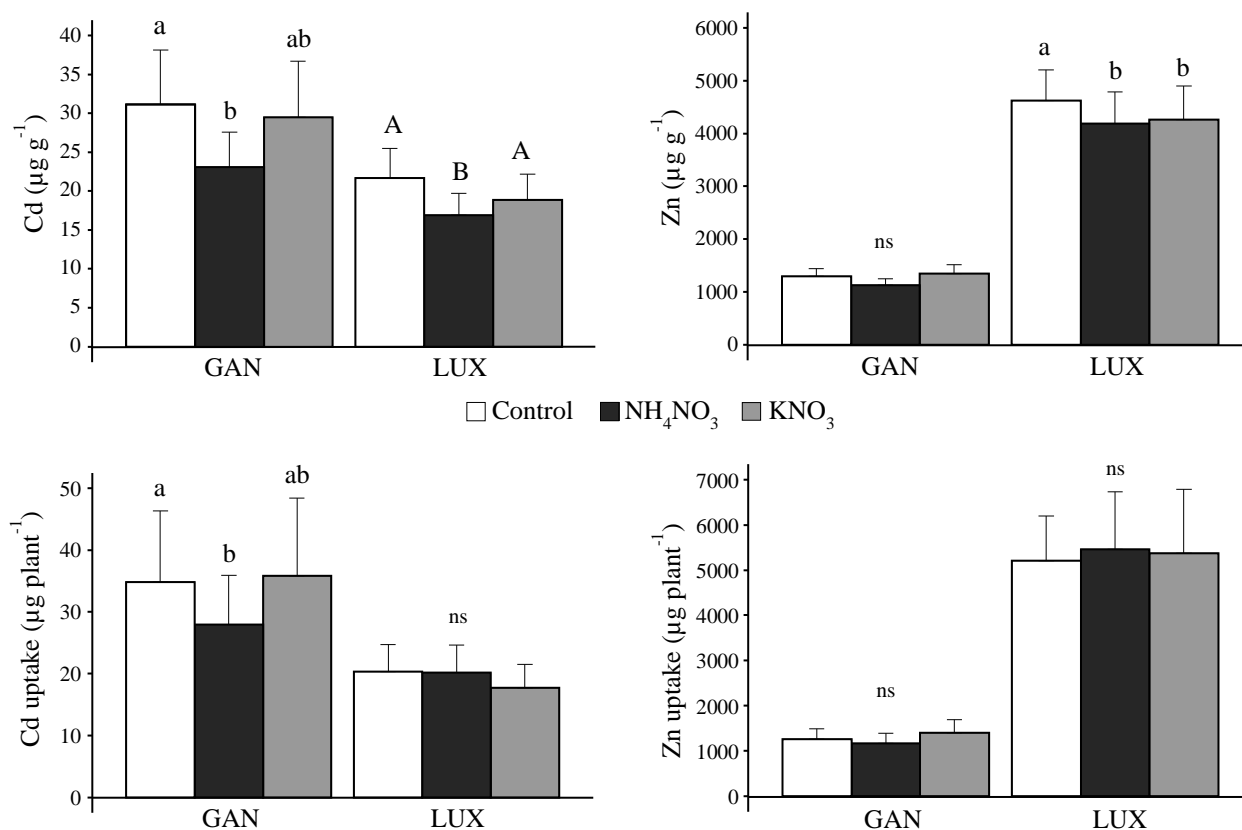
### 3.3. Effect of nitrogen fertilization

The nitrogen treatments alone did not consistently increase biomass production over all soils, but the interaction between treatment and soil factor was highly significant ( $p < 0.001$ ) (Table S3), suggesting that nitrogen input had different effects on biomass depending on soil properties. To elucidate the soil  $\times$  treatment interaction, we performed an analysis of covariance using both initial soil concentrations in  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  as covariables, with both populations pooled since there was no population effect on biomass production. Both  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  were significant covariables of the biomass production ( $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ , respectively) but only  $\text{NO}_3^-$  had a significant interaction with the treatment effect ( $p < 0.01$ ) (Table S5). This indicates that there was no positive effect of the treatment (but rather a negative one) on biomass production at the highest initial soil  $\text{NO}_3^-$  content (Fig. 6). We then performed a second analysis of variance of biomass production including only the soils with N content under  $25 \text{ mg N-NO}_3 \text{ kg}^{-1}$  Dry Soil (17 out of 24) because it corresponds approximately to the threshold value (Fig. 6), and the treatment effect was then significant ( $F_{2,234} = 4.83$ ,  $p < 0.01$ , where  $F_{x,y}$  is the F value of the treatment factor, x and y are the degrees of freedom of the treatment and the residuals, respectively). Considering only those soils, the average total biomass was higher on  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  and  $\text{KNO}_3$  treatments compared to the control, by 15 % for GAN and 22% for LUX.

Nitrogen addition significantly influenced both Cd ( $p < 0.001$ ) and Zn ( $p < 0.001$ ) shoot concentrations, but differently depending on the nitrate salt. Ammonium nitrate addition had a negative effect on metal concentrations (Fig. 7). Shoot Cd concentration was higher in plants of both populations grown on the control ( $26 \mu\text{g g}^{-1}$ ) and on the  $\text{KNO}_3$  treatment ( $24 \mu\text{g g}^{-1}$ ) than on the  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  treatment ( $20 \mu\text{g g}^{-1}$ ) (Table S3). Shoot Zn concentrations for the LUX population were lower on  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ( $4190 \mu\text{g g}^{-1}$ ) and  $\text{KNO}_3$  ( $4260 \mu\text{g g}^{-1}$ ) treatment than on the control ( $4630 \mu\text{g g}^{-1}$ ) while there was no effect for GAN population (Table S3). Overall, the treatment effect on Cd uptake (product of biomass and shoot Cd concentration) was significant, as Cd uptake was about 15% lower with the  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  treatment compared to the control ( $p < 0.001$ ) while there was no significant effect of the  $\text{KNO}_3$  treatment but there was however a significant interaction between soil and treatment. The treatment had no pure effect on Zn uptake, but once again soil  $\times$  treatment interaction was significant. When considering only the 15 soils with less than  $25 \text{ mg N-NO}_3 \text{ kg}^{-1}$  Dry Soil, there was no significant treatment effect on Cd and Zn uptake which shows that the biomass gain was offset by reduced shoot Cd and Zn concentrations.



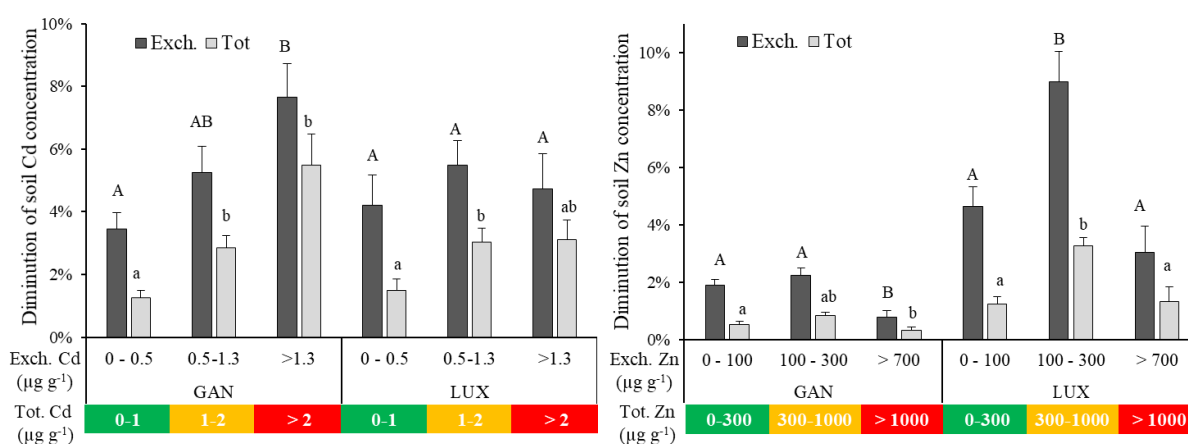
**Figure 6.** Effect of the two nitrogen treatments ( $\text{KNO}_3$  and  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) on biomass production of *N. caeruleus* plants (GAN and LUX populations pooled) depending on the initial  $\text{N-NO}_3$  content in the 24 different soils (logarithmic scale). Treatment effect is calculated as  $(\text{MB}_T - \text{MB}_C) / \text{MB}_C$  where MB is the mean biomass for one population on one soil either on one of the two treatments ( $\text{MB}_T$ ) or on the control ( $\text{MB}_C$ ).



**Figure 7.** Effect of the two nitrogen treatments ( $\text{KNO}_3$  and  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) on Cd and Zn concentrations and uptake of *N. caeruleus* plants (GAN and LUX populations) across all 24 soils. Data are mean + SE ( $n = 68-80$  plants). Different letters indicate significant differences among N treatments for each population separately.

### 3.4. Metal removal

Average metal uptake was calculated as the proportion of the metal mass initially present in the pot that was harvested in the aerial biomass (metal mass in the plant/metal mass in the soil). Mean Cd uptake across all soils and treatments is about 5% of the exchangeable Cd content (ranging from 2 to 10%) and 3% of the total Cd content (ranging from 0.3% to 6%) with GAN population (Fig. 8). Cadmium uptake with LUX population is not significantly different from GAN except on highly contaminated soils, where it is smaller. On the contrary, LUX population yielded a higher Zn uptake, on average 6% of the exchangeable content (ranging from 1 to 14%) and 2% of the total content (ranging from 0.3% to 4.4%) compared to 2% of the exchangeable content (ranging from 0.2 to 4%) and 0.6% of the total content (ranging from 0.1% to 1.6%) with GAN population (Fig. 8). Cd extraction efficiency with GAN increases with soil contamination, being maximal for total concentrations between 2 and 10 mg Cd kg<sup>-1</sup> (7.6% and 5.5% of exchangeable and total content), while on the only soil with higher contamination (LIE 20 mg Cd kg<sup>-1</sup>) the extraction rate was much lower (2 and 1.4%). Zn extraction with LUX is also more efficient at intermediate contamination level (300 and 1000 mg Zn kg<sup>-1</sup>) than at low (< 300 mg Zn kg<sup>-1</sup>) or very high (1000 mg Zn kg<sup>-1</sup>) levels of contamination.



**Figure 8.** Average Cd and Zn removal by *N. caerulescens* on all treatments pooled, expressed as the diminution of exchangeable (EDTA-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>acetate extraction) and total Cd and Zn concentrations in pots, on 23 soils (LIE soil was here removed because of its extreme Cd and Zn concentrations). For each metal (Cd and Zn), soils were grouped in three classes according to their exchangeable concentrations in Cd and Zn (which more-or-less correspond to the total concentrations indicated): no or very low contamination (green, n = 7 (Cd) or 10 (Zn)), moderately low contamination (orange n = 10 (Cd) or 9 (Zn)), moderate to high contamination (red n = 6 (Cd) or 4 (Zn)). For each population, different letters indicate significant difference between classes of soil contamination at the p < 0.05 level (t-tests with Šidák correction).

## 4. Discussion

In this study we have compared for the first time two contrasting populations of *N. caerulescens* on a wide range of moderately contaminated soils to assess the influence of natural soil variation on phytoextraction efficiency. We also investigated the effect of a common agricultural practice, nitrogen fertilization, on phytoextraction. The originality of this work was to study the effect of more than 16 soil variables on both biomass and metal concentrations –the former often being neglected when considering extraction efficiency– with a realistic growth length (20 weeks).

### 4.1. Influence of soil factors on biomass production

Plant biomass production varied by more than tenfold among soils, which indicates a strong influence of soil properties. Sterckeman and Puschenreiter (2018) pointed out that Cd phytoextraction efficiency varies by a factor of 70 between sites.

Interestingly, GAN and LUX populations showed similar growth responses to soil variables. First, *N. caerulescens* growth was clearly stimulated by higher organic matter (OM) content and lower bulk density (BD). This positive influence could be interpreted by the benefits of soil OM on chemical and physical properties: higher fertility and a greater soil macroporosity. Nevertheless, since none of the major nutrients (K, P, and Mg) and N forms are correlated with OM ( $r < 0.5$ , Table S6), the effect on fertility seems less important. This rather supports the field observation of a high sensitivity of the species to soil compaction, and that natural populations mostly grow on shallow and coarse substrates (Basic *et al.* 2006, Molitor *et al.* 2005, Sirguy *et al.* 2018). Our results suggest that *N. caerulescens* grows best in soils with OM > 7% and soil bulk density < 1.05 kg/dm<sup>3</sup>. Positive correlations between soil OM and *N. caerulescens* biomass production were already shown, yet not demonstrated formally, in a pot experiment on 7 soils (Knight *et al.* 1997). In a field trial on 10 soils, Maxted *et al.* (2007) found no significant correlation between OM and biomass but the best yield was obtained on a soil with high OM content (22%) while the lowest was on a clayey soil with lower OM (5-10%). In this context, the negative influence of sand content (varying from 30 to 80%) in the same model (and hence positive of clay and silt) on growth may seem counterintuitive, but it could be interpreted as a positive effect of increasing clay and silt content for water retention in these relatively sandy soils. *N. caerulescens* could have a preference for soils with good drainage but with a minimum water retention capacity to prevent excessive drying.

A second variable that positively influences biomass is nitrogen as available nitrate (N-NO<sub>3</sub>). The dominant N form in most soils was NO<sub>3</sub><sup>-</sup> which could explain why NO<sub>3</sub><sup>-</sup> rather than NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

was selected as a predictor of biomass production. We here confirm the positive impact of increasing nitrogen on *N. caerulea* growth on a large range of field soil concentrations in N-NO<sub>3</sub> (from 1 to 858 mg kg<sup>-1</sup> DS, median 7 mg kg<sup>-1</sup> DS) which had already been demonstrated earlier with synthetic fertilizers (Schwartz *et al.* 2003, Xie *et al.* 2009).

Our models also highlighted that two trace metals, Cu and Pb, influence biomass production, positively for Pb and negatively for Cu. Cu concentrations in the four most contaminated soil range from 140 and 240 mg kg<sup>-1</sup>, and appear to inhibit *N. caerulea* growth. Such growth inhibition had already been demonstrated in previous works but at higher concentrations (1200 mg kg<sup>-1</sup>) (Lombi *et al.* 2001b, Walker and Bernal 2004). The positive influence of Pb on both populations is more unexpected and less straightforward to explain. Growth stimulation of *N. caerulea* by trace metals has already been shown for Cd and Zn (Escarré *et al.* 2000, Pongrac *et al.* 2009) – the two hyperaccumulated elements – but never in the case of Pb. We know that *N. caerulea* can grow on sites with very high Pb contamination (frequently between 10 000 and 20 000 mg kg<sup>-1</sup>; Escarré *et al.* 2011) and therefore it makes sense that no negative effect of Pb is found here. A potential covariation with other trace metals (Cd, Cu and Zn) or OM can be ruled out since Pb is not strongly correlated ( $r < 0.5$ ) to any other soil variable. Furthermore, models without Pb explain less variation in biomass and had a higher AICc value. The most convincing explanation would be a direct effect of Pb on soil pathogens and pests, which could therefore lead to an indirect effect on plant growth by decreasing the negative impact of soil enemies. The main pest and pathogens of *N. caerulea* previously identified are sciarid flies larvae (in controlled conditions, personal observation), and fungal diseases causing damping off and root rot (*Phytophthora* sp., *Fusarium* sp. or *Pythium* sp.) (Maxted *et al.* 2007, Simmons *et al.* 2015). The inhibition of soil pathogen development by elevated soil Pb content has already been demonstrated (Harris and Birch 1988, Ngu *et al.* 1998). This hypothesis is also supported by the significant correlation between survival rate and soil Pb concentration (binomial generalized linear model,  $p < 0.05$ , Table S7).

It has to be underlined that Fe and pH (highly correlated:  $r = -0.83$ ) did not significantly influence *N. caerulea* growth in the models in the pH range of urban soils used in this study (6.2-8), which is narrower than previous studies (Maxted *et al.* 2007, Wang *et al.* 2006, Yanai *et al.* 2006) that highlighted a significant effect of pH on growth (from pH 4.4 to 7.8). Finally, none of the soil major nutrients (Ca, K, Mg and P) were selected to explain the variation in biomass production.

The two populations used in this study had similar total biomass production, but had a very different ratio of reproductive/vegetative biomass (R/V): GAN having a higher proportion of reproductive parts (R/V 0.54) than LUX (R/V 0.13). This is explained by the difference of

dominant life cycles (annual for GAN, biennial for LUX), already shown in phytoextraction field trials (Jacobs *et al.* 2018b).

#### 4.2. Soil influence on metal uptake

Accumulation levels were low compared to what is obtained in field trials on some of the same soils of origin (2 to 10 times less)(Jacobs *et al.* 2017, 2018a, 2018b) but it can be explained by a shorter growth and a smaller soil volume in this pot experiment. The two populations showed the expected contrasting patterns of shoot Cd and Zn concentrations (Escarré *et al.* 2000, Jacobs *et al.* 2017, Meerts and Van Isacker 1997): higher shoot Zn in LUX plants and higher shoot Cd in GAN plants. The difference in Cd concentrations between populations was however not present on all soils and was less pronounced than expected considering the high potential for Cd accumulation of GAN (31  $\mu\text{g g}^{-1}$  in GAN *vs* 22  $\mu\text{g g}^{-1}$  in LUX). Soil factors limiting Cd bioavailability could be an explanation.

Exchangeable soil Cd and Zn were the main explanatory variables of Cd and Zn concentrations, respectively, in aerial parts of *N. caerulea*, as already highlighted in numerous studies (McGrath *et al.* 2006, Macted *et al.* 2007, Yanai *et al.* 2006). This was expected considering the large variation in soil contamination (0.2-14 mg Cd  $\text{kg}^{-1}$  and 30-3200 mg Zn  $\text{kg}^{-1}$  as exchangeable forms). However, other soil variables also influenced shoot metal concentrations. We confirm the negative effect of available  $\text{NO}_3^-$  (or  $\text{NH}_4^+$  for Zn concentrations in GAN) on shoot concentrations of Cd and Zn in both populations shown by previous studies (Xie *et al.* 2009, Jacobs *et al.* 2018a). This effect can be linked to a dilution of metals absorbed in larger plants ( $\text{NO}_3^-$  has a positive influence on shoot growth) but it could also be due to an increased shoot-root ratio (Roosens *et al.* 2003) in the presence of high N concentrations and hence to a reduced soil exploration by roots (Morris *et al.* 2017).

There was a negative effect of soil Zn and Pb on shoot Cd concentrations in LUX population but not in GAN. This is coherent with the difference of Cd accumulation mechanisms between ecotypes, GAN ecotype having higher gene copy number and level of expression of specific cadmium transporters (HMA4 and HMA3) than other MET or NMET populations (Craciun *et al.* 2012, Halimaa *et al.* 2014, Lombi *et al.* 2001a, Roosens *et al.* 2003). Cd uptake by NMET is therefore more sensitive to competition with Zn.

Increasing gravel charge of soils had a negative impact on shoot Cd and Zn concentrations and uptake in LUX plants, which can easily be interpreted as the loss of all available metal mass in the pot when the gravel charge is high. The negative effect of the carbonate index (CARB, separating soils below and above pH 7) on Cd concentrations and uptake with GAN population can be linked to a lower Cd bioavailability with the higher carbonate content. This highlights that pH 7 is the threshold determining Cd bioavailability for *N. caerulea* in

these soils, as Maxted *et al.* (2007) also observed, and also explains why GAN did not accumulate more Cd than LUX on seven soils with pH > 7 (AN3, AN4, BEM, MAS, NAV, SOL6, WIE). Finally the slight negative effect of Ca on Cd concentrations and uptake suggests a competition for uptake between Ca and Cd as already observed in the Prayon population, which has however a very different genetic background than GAN (Dechamps *et al.* 2005, Roosens *et al.* 2003, Zhao *et al.* 2002). Rees *et al.* (2015) suggested that the lower bioavailability of Ca induced by the addition of biochar could explain the simultaneous increase in Cd and Zn uptake by the population of Ganges.

### 4.3. Effect of nitrogen fertilization on biomass, concentrations and uptake

We tested the effect of adding environmentally reasonable inputs of two nitrogen fertilizers (40 mg N kg<sup>-1</sup> as KNO<sub>3</sub> or NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) because it is among the easiest ways to improve soil fertility and enhance shoot biomass. Previously, two tests of reasonable N fertilization with NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (about 100 kg N ha<sup>-1</sup> or 30 mg N kg<sup>-1</sup>) on *N. caerulescens* yielded highly variable biomass gains (+15-80%) depending on the soil (Sirguy *et al.* 2006, Jacobs *et al.* 2018). Other studies also suggest that there might be some preference of *N. caerulescens* for NO<sub>3</sub><sup>-</sup> rather than NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Monsant *et al.* 2008, Schwartz *et al.* 2003, Xie *et al.* 2009). We therefore compared two sources of nitrogen.

N fertilization had a positive impact on *N. caerulescens* biomass production only in soils with low initial N content (< 25 mg N-NO<sub>3</sub> kg<sup>-1</sup>) but the growth stimulation for these soils was rather limited (+15 and 23% on average for GAN and LUX populations, respectively). The two N fertilizers (KNO<sub>3</sub> or NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) gave the same biomass increase. On soils with high initial N content (> 100 mg N kg<sup>-1</sup>), nitrogen addition had a negative effect on biomass. We could hypothesize that nitrogen fertilization enhance fungal development as already observed in the field (Jacobs *et al.* 2018a), and supported by the slightly lower survival rate on the N treatments (82.5%) compared to the control (89%) ( $\chi^2$  test,  $p < 0.05$ ). This would explain why beyond a certain threshold of initial N in the soil, the negative impact of adding synthetic fertilizers on plant disease is stronger than growth stimulation. Furthermore, the negative effect of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> on Cd and Zn concentrations offset the small biomass gain obtained with fertilization, which is coherent with the results of Sirguy *et al.* (2006) with similar levels of fertilization. Overall, nitrogen fertilization had a neutral effect on the wide range of garden and wasteland soils used in this study. It can be concluded that there is no added value of fertilizing for phytoextraction except on soils with very low N content.

## 5. Conclusion

This study shows that soil exchangeable Cd and Zn are the major soil drivers of Cd and Zn uptake by *N. caerulescens*. Beyond soil Cd and Zn concentrations, the secondary drivers of metal uptake are organic matter content and bulk density which stimulate plant growth (for a high OM content and low bulk density), and soil Cu concentrations which influence biomass production negatively. This confirms the low tolerance of *N. caerulescens* to Cu at even lower Cu concentrations (50-240 mg kg<sup>-1</sup>) than previously demonstrated. The negative effect of high soil Zn content on Cd uptake in NMET population (LUX), but not in GAN, is also highlighted on field contaminated soils, while Cd uptake by GAN is negatively impacted by the carbonate content of the soil. Finally, we show that nitrogen fertilization at environmentally acceptable doses is not an efficient way of improving phytoextraction efficiency. This stresses the need to characterize extensively soil determinants for a better predictability of phytoextraction, as excessive Cu concentrations, low OM content or high carbonate content can clearly impact negatively the extraction efficiency. Our study shows that extraction efficiency is best for moderate soil contamination in Cd (2-10 mg kg<sup>-1</sup>) and Zn (300-1000 mg kg<sup>-1</sup>).

## Acknowledgments

Arnaud Jacobs is a research fellow of the Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (FRIA, Belgium). We are grateful to Kristel Wart, Luc Dekelver, Sophie Lorent and Dirfy-Eleni Giatzouzaki for their technical help during the experiment, and to David Bauman for his advice on statistical analysis.



---

# Chapitre 5

---

## Sélection massale de cultivars de *Noccaea caerulescens* à haut rendement

-

### Mass selection of high-biomass *Noccaea caerulescens* cultivars for phytoextraction

Au-delà des pratiques de culture et du choix de populations performantes pour l'accumulation, l'amélioration du rendement de phytoextraction nécessite aussi probablement une augmentation de la biomasse moyenne des plantes de *N. caerulescens* via la sélection de cultivars à haut rendement. Les essais de terrain menés dans le cadre de ce travail ainsi que dans d'autres études montrent une importante variation de production de biomasse entre individus cultivés dans des conditions identiques, ce qui témoigne d'un potentiel de sélection. A la fin des essais de terrain menés en 2016 sur deux sites, nous avons donc décidé de sélectionner au sein de chaque parcelle les plus grands et les plus petits individus de *N. caerulescens*, afin de comparer leur descendance respective avec celle d'un pool de graines non sélectionnées. Ce chapitre vise donc à évaluer le potentiel et la faisabilité de la sélection massale pour produire des cultivars à plus haut rendement.



## Mass selection of high-biomass *Noccaea caerulescens* cultivars for phytoextraction

Arnaud Jacobs, Thomas Drouet, Nausicaa Noret

### Abstract

A necessary step towards efficient and reliable phytoextraction with the Cd-Zn hyperaccumulator *N. caerulescens* is the development of cultivars highly productive and stress resistant. Little is known however about the heritability of desired traits for phytoextraction. We assessed the potential of mass selection for biomass production with a preliminary test. Mass selection of high-yielding individuals of two populations (GAN, Cd accumulator and LUX, Zn accumulator) was performed on two experimental sites where phytoextraction trials were conducted. The progeny of the largest and smallest plants were compared together with a control from the initial unselected pool of seeds. Surprisingly, we did not find a coherent pattern of higher biomass in the progeny from larger plants. For GAN plants, differences of biomass observed between groups could be linked to the lifecycle (annual *vs* biennial) since annual plants had a higher biomass. Nevertheless, the progeny of small plants from both populations were on average less resistant to fungal pathogens and had higher mortality rates than the progeny of large plants. We also show that selection for large individuals involuntarily led to selection of annual GAN plants from one site. Moreover, the high variation in biomass of the progeny of single mother plants also shows that maternal and environmental effects can compromise the process of cultivar selection. Our results suggest that selection for traits such as disease resistance and lifecycles seems feasible for *N. caerulescens*, while the potential of selection of high-biomass cultivars should be tested with a larger number of mother plants with a longer growth cycle.

**Keywords:** Mass selection, *Noccaea caerulescens*, Pathogen resistance, Plant breeding, Phytoremediation

## 1. Introduction

The main challenge of phytoextraction with hyperaccumulating plants such as *Noccaea caerulescens* is to increase the production of biomass of this undomesticated species, to ensure yields of at least 5 t ha<sup>-1</sup> for efficient extraction (Koopmans *et al.* 2008, Zhao *et al.* 2003). To do so, a strategy with two main parts can be implemented: develop adequate cultural practices and select high-yielding cultivars. While the other chapters have mostly focused on the first side, this chapter will consider the second one. Some studies have indeed highlighted the high inter-individual variability of metal accumulation and biomass production even within one cultivation plot (Maxted *et al.* 2007, Schwartz 1997, Sterckeman and Puschenreiter 2018).

The first step to assess the potential of cultivar selection is to evaluate the phenotypic variability at the species level. Several populations of the three ecotypes (calamine, serpentinic and non-metallicolous) have been screened and compared under controlled conditions, for their accumulation characteristics (Escarré *et al.* 2013, Gonneau *et al.* 2014, Meerts and Van Isacker 1997) and more recently also for growth, phenology and fertility traits (Sterckeman *et al.* 2017). These studies have enabled to give a large representation of the natural variability of metal accumulation and biomass production. Ultimately, the aim is to improve the phytoextraction potential of the plant by selecting or combining favorable traits.

The second step is to test the response of the plant to multiple years of selection in order to develop phytoextraction cultivars. While some authors have suggested that *N. caerulescens* could answer positively to traditional breeding or selection methods (Schwartz *et al.* 2006), no result of selection for higher accumulation or biomass has been published so far. Ideal cultivars of *N. caerulescens* should have a high level of metal accumulation and biomass production, and be disease-resistant. Here we choose to concentrate only on the selection for higher biomass, making the assumption that it will not negatively affect shoot metal concentrations, and would therefore enhance metal accumulation. This assumption is justified by the fact that in multiple studies no negative correlation between biomass production and trace metal accumulation was found (Gonneau *et al.* 2014, Molitor *et al.* 2005, Pollard and Baker 1996, Sterckeman *et al.* 2017). This suggests that there is no genetic trade-off between metal accumulation capacity and growth.

The objective of this study was to test the potential of field mass selection of high-biomass individuals of two contrasted populations, one calamine (CAL) from Ganges (South of France) and one non-metallicolous (NMET) from Luxemburg. The CAL plants from Ganges are mostly annuals and have a high Cd accumulation ability, while plants from the NMET

population used tend to be monocarpic biennials and accumulate more Zn than CAL plants (Dechamps *et al.* 2011, Escarré *et al.* 2000, Jiménez-Ambriz *et al.* 2007, Meerts and Van Isacker 1997). Mother plants were selected for their high or low biomass in two phytoextraction trial sites (Jacobs *et al.* 2018a, 2018b) and the biomass production of the progeny was measured on the two soils where the mother plants were selected. We aim to answer several questions: 1) Is shoot biomass production of *N. caerulescens* a trait sufficiently heritable that can be selected for enhancing the yield of the crop?; 2) Is it the case for two contrasted populations of *N. caerulescens*?; 3) Are we also selecting for correlated traits when we select for a large biomass of *N. caerulescens*?

## 2. Material and Methods

### 2.1. Selection of mother plants

The procedure followed to select mother plants is described in Fig. 1. In 2016, a field experiment was set up on the sites of Navez (NAV) and Gare Royale (GR) to investigate the effects of fertilization, seeding strategy and length of growing season on Cd and Zn phytoextraction with two *Noccaea caerulescens* populations, Wilwerwiltz and Ganges (Jacobs *et al.* 2018b and unpublished results). The pool of seeds used in the latter study came from i) a garden culture of plants of the NMET population of *Wilwerwiltz* (hereafter LUX; originating from The Grand Duchy of Luxemburg), and ii) field-grown plants of the CAL population of *Ganges* (hereafter GAN) collected in St-Laurent-le-Minier (Southern France) and provided by M. Delmot (Fig. 1A). Plants from these unselected seed pools were cultivated on two experimental sites in Brussels (Navez, NAV and Gare Royale, GR) either 1) during 7 months after transplantation, from April to November 2016, for all NAV plants and half of GR plants, or 2) during 12 months after direct sowing, from November 2015 to November 2016 for half of GR plants (Jacobs *et al.* 2018b). GR soil is characterized by a very high OM content (20%) and a sandy loam texture, while NAV soil has a lower OM content (9%) with a loamy sand texture (detailed soil characteristics can be found in Jacobs *et al.* 2018a, 2018b). On both sites, six couples of plants of each population were selected at harvest in November: the largest LUX (L-LUX) and the smallest LUX (S-LUX) plants, and the largest GAN (L-GAN) and the smallest GAN (S-GAN) plants in each of 6 experimental plots. These small and large mother plants were each selected among 20-50 plants growing in the same plot. Therefore, we had 8 types of mother plants (Fig. 1B): four selected in the GR site (GR-L-LUX, GR-S-LUX, GR-L-GAN, GR-S-GAN) and four selected in the NAV site (NAV-L-LUX, NAV-S-LUX, NAV-L-GAN, NAV-S-GAN). Each type of mother plants therefore consisted of 6 individual plants. Mother plants were collected with their rooting system and surrounding soil, put in pots with a mix of soil from the site and commercial compost and placed to

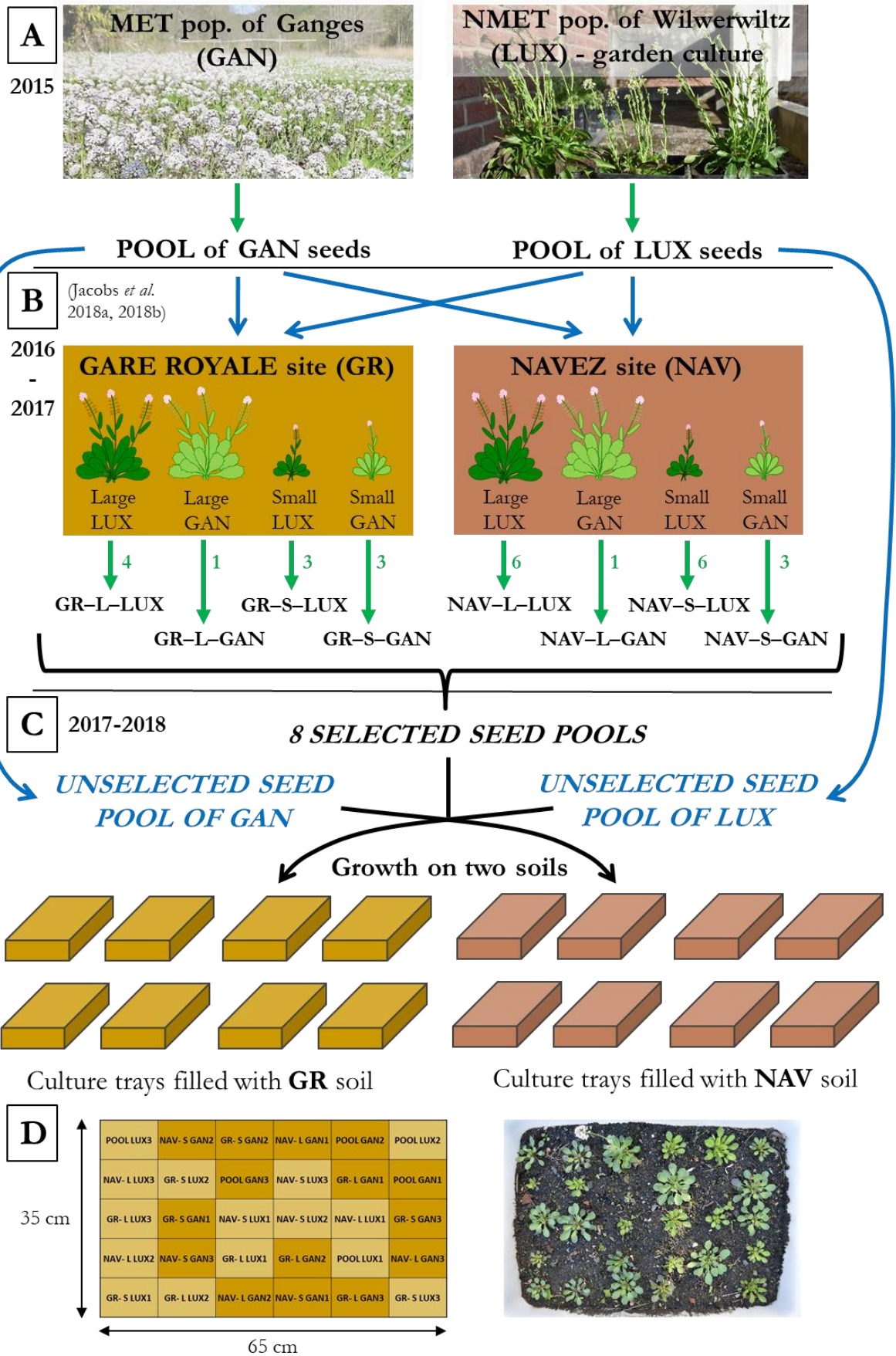
overwinter in an unheated shelter. At the end of the winter, the 8 types of mother plants were separated before onset of flowering to prevent crossings between types but were not protected by bags or insect nets. Plants were manually self- and cross-pollinated within types with a paintbrush. Several plants died before reaching seed maturation due to fungal disease (Fig. 1B, green numbers between brackets next to the green arrows indicate the number of surviving plants). Seeds were collected at maturation in May and June, weighed and stored at room temperature. Mother plants were then harvested, vegetative and reproductive parts were dried at 65°C and weighed separately.

## 2.2. Screening of progeny

The germination rate of each mother plant progeny was assessed in Petri dishes from 50 seeds (one plate per mother plant). Seeds were pooled per mother type for the screening with an equal number of seeds from each surviving mother plant. Hundred seeds of each of 10 types (8 selected types + 2 unselected seed pool (P) used as control) were germinated on commercial compost. After 40 days, seedlings were transplanted on November 22 in 16 cultivation trays (35 × 65 × 20 cm) filled with soil from either of the two sites where mother plants were selected (Fig. 1C). Eight trays were filled with NAV soil and 8 trays were filled with GR soil. In each tray, thirty plants were transplanted (three individuals of each of the 10 types) following a randomly assigned grid of 6 × 5 plants (Fig. 1D). Trays were located outdoor the university greenhouse facility (Brussels). Temperatures were recorded every hour during the experiment with a temperature data-logger (RC30B, Blue Jay Technology Co. Ltd). Pictures of each tray were taken every other week during the first 5 months and then every week. Survival was assessed once after winter at the beginning of April, and a second time at harvest. Plant aerial parts were harvested in June after 7 months of growth. Plants were washed with deionized water and shoot dry (65°C) biomass was measured.

## 2.3. Statistical analysis

Biomass production of progeny plants was normalized with the Box-Cox function prior to statistical analyses. Data were analysed separately in four groups, one for each combination of the two populations and the two sites of origin of mother plant (GAN plants from NAV, GAN plants from GR, LUX plants from NAV, LUX plants from GR), with the unselected pool as a common control. Variation of biomass production, mortality after winter and mortality due to fungal pathogens were analysed by means of Gaussian and binomial globalised linear mixed models (GLMMs), respectively. The significance of fixed (Type of Mother, Soil) and random (Block) effects was tested with likelihood ratios and compared to  $\chi^2$  distribution. Differences between levels of the Type of Mother factor were tested with multiple comparisons using the partial GLMMs models with the Šidák correction of p values.

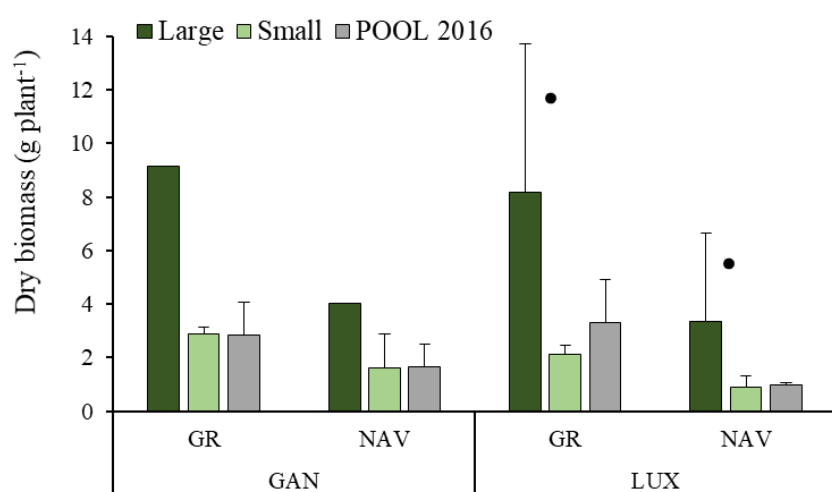


**Figure 1** Diagram of the procedure followed to select mother plants of *N. caerulea* on two field trial sites (**A** and **B**) and to test their progeny on soils from the same two sites in cultivation trays (**C** and **D**). Vegetative plants selected and harvested in the Fall 2016, flowered and set seeds in the Spring 2017 (**B**). Selection of mother plants took place on 6 plots on each site. Selected seed pools are therefore coming from multiple mother plants (the number of surviving mother plants which set seeds is indicated in green) (**B**). The seeds from the eight selected pools and two unselected pools were then sown and transplanted in 16 cultivation trays in the Fall 2017 (**C**), with 30 individuals per tray (3 replicates for each of the 10 types) following a randomly assigned grid (**D**). The picture was taken on May 4<sup>th</sup> 2018. **Green** arrows correspond to seed collection from mother plants. **Blue** arrows indicate the cultivation of unselected seed pools. **Black** arrows indicate the cultivation in trays of the 8 selected types and 2 unselected pools.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Mother plants: biomass production and survival

The average vegetative biomass of surviving L mother plants was 2.5 up to 4 times higher than S plants when seeds were collected in June 2017 (Fig. 2). Biomass of S plants in June 2017 was about the same as the average plant biomass in field plots at harvest in November 2016 (Pool 2016, Fig.2). Unfortunately, a large number of mother plants died before setting seed: two thirds of all GAN plants, and one fifth of LUX plants ( $\chi^2 p < 0.01$ ) (Table 1). This reduces the representativeness of the selected mother plants for the screening of the F1 generation. L-GAN plants from GR and NAV are each the progeny of a single maternal plant. Average germination rate of L seeds from L plants from both populations (53%) was overall smaller than that of S mother plants (80%, *t* test  $p < 0.05$ ) and P (89%). This suggests a potential genetic or environmental maternal effect on seed quality and germination rate (Luzuriaga *et al.* 2006, Roach and Wulff 1987). Dechamps *et al.* (2011) highlighted a size-dependent fecundity of CAL and NMET plants (increasing with the size of the plant), but did not measure the effect of mother plant size on germination rate.



**Figure 2** Vegetative biomass at fruit maturation (without floral stalks, silicles and seeds) in June 2017 of large (L) and small (S) surviving mother plants of *N. caerulea* (GAN and LUX populations) selected on two experimental sites (GR and NAV), and mean individual biomass at harvest in November 2016 (POOL 2016) on the field plots where the mother plants were selected. Data are means + SD (n = 1-6). Significance of the *t*-test between L and S LUX plants is indicated (no test could be done for GAN plants because of the lack of replicates): •  $p < 0.1$ .

**Table 1** Average seed production and germination rate for each type of mother plant (2 unselected seed pools and 8 selected seed pools).

Type of plant	mother	Selection site	Pop.	Number of surviving mother plants	Average seed production (g)	Average germination rate (%)*
Pool of seeds (P)			GAN		/	86
			LUX		/	92
Large (L) plant	mother	GR	GAN	1	0.98	56 (1)
			LUX	4	0.58 ± 0.60	50 ± 41 (2)
		NAV	GAN	1	3.21	48 (1)
			LUX	6	1.01 ± 1.32	59 ± 34 (5)
Small (S) plant	mother	GR	GAN	3	1.07 ± 0.35	87 ± 8 (3)
			LUX	3	1.29 ± 0.92	89 ± 6 (3)
		NAV	GAN	3	0.33 ± 0.52	62 ± 38 (2)
			LUX	6	0.63 ± 0.75	82 ± 13 (6)

\* Between brackets, the number of mother plants with average germination rate of seeds > 30%

### 3.2. Progeny performance: selection for higher biomass?

Despite a faster initial growth on NAV soil (based on pictures taken every other week), progeny plants grown on GR soil had a higher biomass after 7 months (0.66 g) than on NAV soil (0.53 g) (Table 2). The rest of the variation of biomass between blocks could be explained by a gradient of luminosity (personal observation), since no rotation of trays was possible. This environmental heterogeneity between blocks enhances the overall variation (taken into account in the block factor). GAN plants produced at least twice as much biomass as LUX plants on both soils (0.91 vs 0.41 g plant<sup>-1</sup>). All LUX individuals grown on NAV started to have leaves of violet colour after about 6 months of growth, while neither LUX plants on GR soil nor any GAN plants showed that symptom. This violet color is most probably due to nutritive stress (potentially a lack of sulfur) as suggested in previous work (Sirguyey *et al.* 2006).

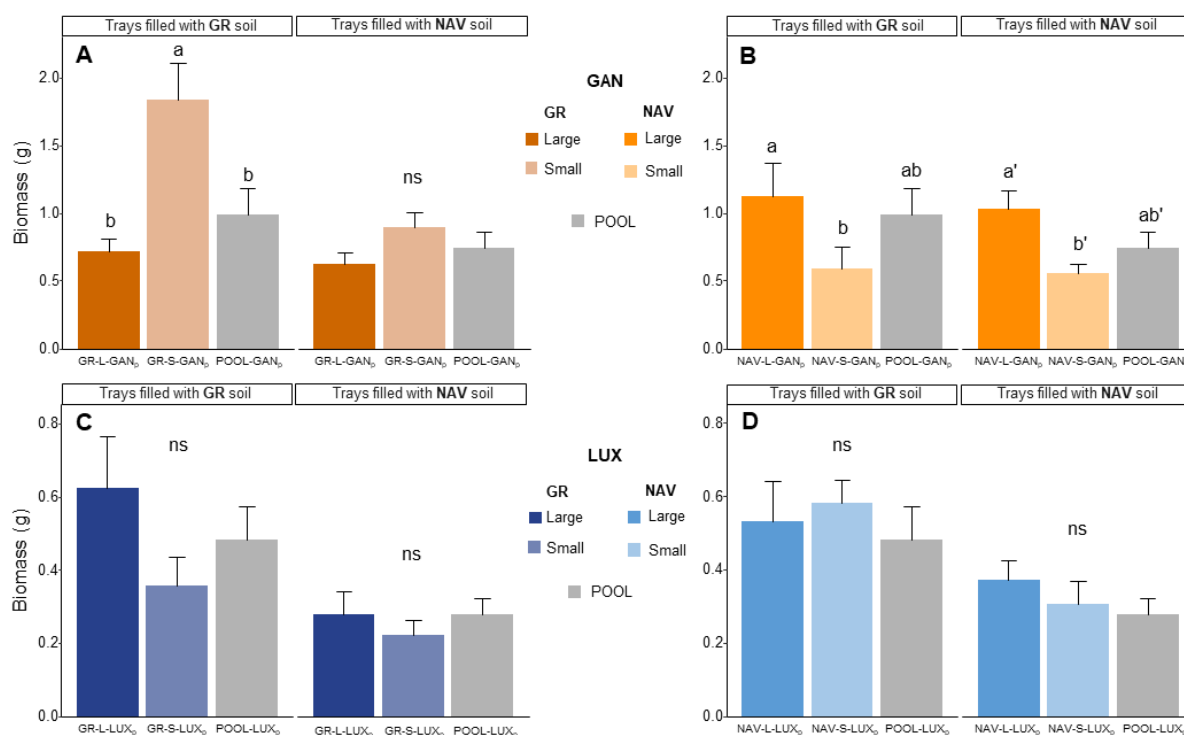
For **GAN progeny plants (GAN<sub>p</sub>)** we obtained two significant but opposite patterns for the types selected at GR and NAV sites (Fig. 3A,B and Table 2). Surprisingly, GR-S-GAN<sub>p</sub> plants had significantly higher mean biomass than GR-L-GAN<sub>p</sub> and POOL-GAN<sub>p</sub> plants on GR soil, but not on NAV soil (Fig. 3A). On the contrary, NAV-L-GAN<sub>p</sub> plants were significantly larger than NAV-S-GAN<sub>p</sub> plants on both soils, but not significantly larger than POOL-GAN<sub>p</sub> plants (Fig. 3B). Both patterns could partly be related to the lifecycle and flowering status of the plants. The percentage of flowering of GAN plants was highly variable between types: almost null for GR-L-GAN<sub>p</sub> (2%) and NAV-S-GAN<sub>p</sub> (3%), intermediate for POOL-GAN<sub>p</sub> (9%) and GR-S-GAN<sub>p</sub> (14%), and high for NAV-L-GAN<sub>p</sub> (49%). Among NAV-L-



GAN<sub>p</sub>, individuals that flowered had on average a twice higher biomass than non-flowering plants (*t* test,  $p < 0.001$ ). It is interesting to notice that among the two types selected from a single mother plant, half the NAV-L-GAN<sub>p</sub> flowered while almost none of GR-L-GAN<sub>p</sub> did, which suggests that one gene with two alleles could control the flowering. The potentially high heritability of the reproductive status and lifecycle, gives interesting insight for the potential selection of biennial cultivars, which should be favoured compared to annual plants (Jacobs *et al.* 2018b). This heritability can also be related to the average seed production of the mother plants, which was the largest for NAV-L-GAN (Table 1). Dechamps *et al.* (2007) showed a negative relationship between the production of seeds the first year and the survival of the plant after the first year (annual plants are more fecund than biennials the first year). For **LUX progeny plants (LUX<sub>p</sub>)**, no significant difference could be detected between types (Fig. 3C,D and Table 2). Only GR-L-LUX<sub>p</sub> plants had slightly larger biomass, yet not significantly different from GR-S-LUX<sub>p</sub> plants (Fig. 3C).

**Table 2** Results of likelihood ratio tests following GLMMs of the variation in biomass production of *N. caerulea* from mother plants selected at GR and NAV sites. Levels of significance associated to  $\chi^2$  test: \*\*\*P < 0.001; \*\*P < 0.01; \*P < 0.05; ● P < 0.1; ns, not significant).

		Plants selected on GR site			Plants selected on NAV site		
		Likelihood ratio	df	p (> $\chi^2$ )	Likelihood ratio	df	p (> $\chi^2$ )
GAN	Type of mother	20.82	2	< 0.001 ***	8.81	2	0.012 *
	Soil	8.95	1	0.003 **	0.34	1	0.56
	Type of mother × Soil	4.7	2	0.095 ●	0.59	2	0.743
LUX	Type of mother	3.45	2	0.178	2.69	2	0.261
	Soil	9.87	1	0.002 **	10.69	1	0.001 **
	Type of mother × Soil	1.57	2	0.457	0.83	2	0.662



**Figure 3** Aerial biomass production of *N. caerulea* plants, GAN (A,B) and LUX populations (C,D), selected from mother plants at GR (A,C) and NAV (B,D) sites, grown on two different soils (GR and NAV soils). Data are means + SE. Different letters indicate significant difference between types of mother at the  $p < 0.05$  level (bilateral glmm with Šidák correction).

The environment of selection of mother plants did not seem to play an important role on progeny performance since the difference of biomass production between GR and NAV soils globally followed the same trend for the selected progeny plants and the unselected POOL<sub>p</sub> (no significant interaction between factors Type of mother and Soil, Table 2). The only exception is the marginally significant interaction in the analysis of GR-GAN<sub>p</sub> which indicates that the GR-S-GAN<sub>p</sub> performed better than GR-L-GAN<sub>p</sub> and POOL-GAN<sub>p</sub> only on GR soil. This might suggest a pre-adaptation of GR-S-GAN<sub>p</sub> plants to the GR substrate. The influence of environment of selection should however be formally tested in a global analysis with both selection sites, but this could not be done due to a lack of replicates and statistical power.

This experiment also highlighted the large variation of biomass production of *N. caerulea* among the progeny of single mother plant within blocks, with a relatively high average coefficient of variation of biomass for the two types of single mother progeny GR-L-GAN<sub>p</sub> (47%, varying by a factor of 10 between the smallest and largest replicates) and NAV-L-GAN<sub>p</sub> (61%, varying by a factor of 6). This variation is similar for the progeny types from multiple mothers: about 50% for GR-S-GAN<sub>p</sub> and NAV-S-GAN<sub>p</sub> (both coming from 3 mothers), and also 50% on average for the four types of LUX<sub>p</sub> (3-6 mothers). According to Schwartz *et al.* (2006), there are three possible explanations for the large variation in the progeny from a single parent plant: 1) outcrossing with other plants, 2) highly heterozygous mother and also 3) non-genetic maternal effects (uneven allocation of resources between seeds). The first

hypothesis is the most probable since cross-pollination within groups has been done in this experiment, while phenotypic plasticity and environmental heterogeneity may also explain the absence of a homogeneous pattern obtained in this experiment.

Some limitations of the experimental setup must also be discussed. First, the low size of the sample selected (max. three mother plants in five of the 10 groups) might not be representative of the large or small plants. Second, for GAN plants there can be a mix of two variables influencing biomass: pure growth traits but also the lifecycle (annual plants have a faster initial growth than biennials). Third, we had to harvest the progeny plants in June due to time limits for data processing, while the most efficient phytoextraction cycle could be extended by 4 to 5 months (with 3 up to 5 times higher biomass, Jacobs *et al.* 2018b). Given the relatively low biomass of LUX plants for example (about 0.4 g) compared to what is obtained with a full growth season (about 3-5 g on average), we could expect that with a longer growth, differences between S-LUX<sub>p</sub> and L-LUX<sub>p</sub> groups may have been more marked. The trends (non-significant) obtained should encourage to further test the potential of mass selection for a longer growth, and with more maternal plants.

Furthermore, the relative lack of knowledge on *N. caerulescens* mating system and reproductive biology should encourage to investigate phenotypic diversity in morphological traits in the progeny of multiple mother plants (families) collected in a large number of sites. This should enable to determine the initial genetic diversity among and within sites and selfing rates. Depending on these results more adequate selection processes could be designed.

### 3.3. Progeny performance: the impact of selection on survival

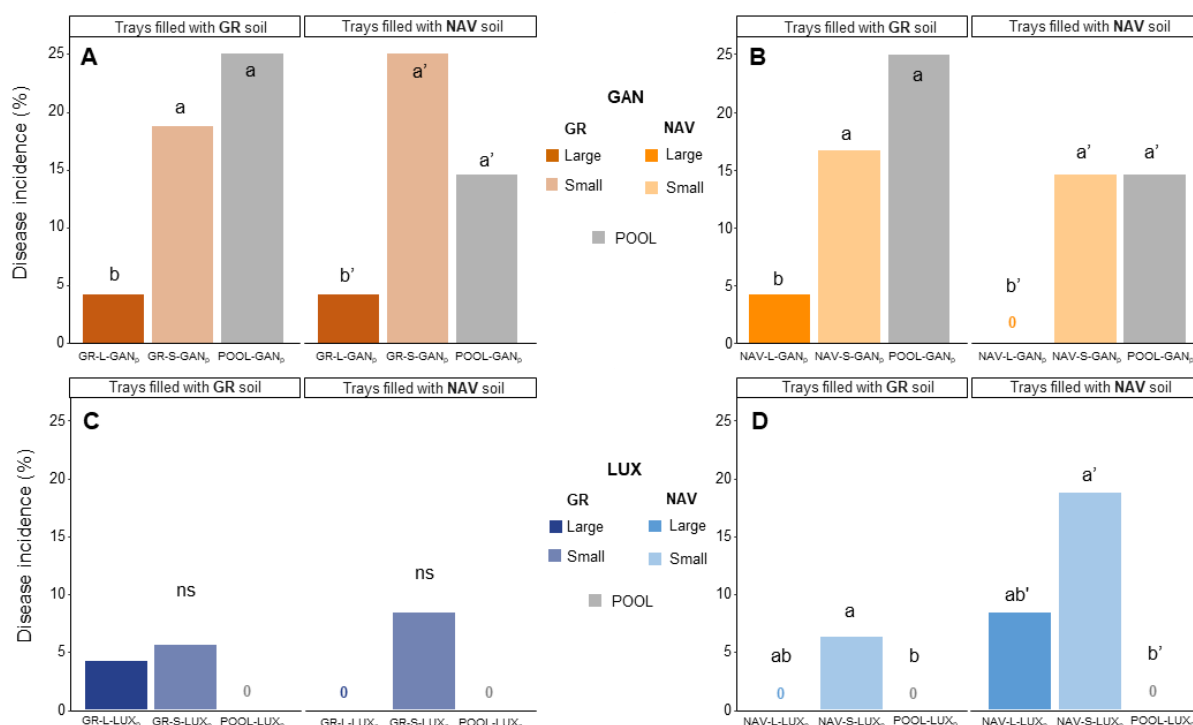
We also tested the influence of selection on the ability of plants to survive winter and to resist to pathogens by counting the number of individuals dead in the beginning of April and individuals with symptoms of white mold and root rot (*Pythium sp.* or *Phytophthora sp.*). These symptoms have already been observed in previous trials on both sites (Jacobs *et al.* 2017, Jacobs *et al.* 2018a) and in other studies (Maxted *et al.* 2007, Simmons *et al.* 2015).

Concerning the resistance of plants to fungal pathogens, GAN plants were more infected than LUX plants overall (13 vs 5%). This slightly lower resistance of GAN had also been shown on the field (Jacobs *et al.* 2018a). POOL-GAN<sub>p</sub> and S-GAN<sub>p</sub> plants selected from both GR and NAV had higher rates of disease (20 and 19% respectively) than L-GAN<sub>p</sub> plants (3 %; Fig. 4A, B and Table 3). This indicates that L-GAN<sub>p</sub> plants were more resistant to infection by fungal pathogens. It can be hypothesized that we involuntarily selected for the most resistant GAN mother plant among GR and NAV plants, especially since only one individual (out of 6) of each site survived to seed maturation. For LUX plants, the trend was a bit different: S-LUX<sub>p</sub>

plants (10%) were less resistant than POOL-LUX<sub>p</sub> individuals (0%), while L-LUX<sub>p</sub> (3%) were not significantly different from the two other types (Fig. 4C, D and Table 3). This could indicate that we rather selected against disease resistance in the set of S-LUX selected mother plants.

**Table 3** Results of likelihood ratio tests following GLMMs of the variation in disease incidence of *N. caerulescens* from mother plants selected at GR and NAV sites. Levels of significance associated to  $\chi^2$  test: \*  $P < 0.05$ ; •  $P < 0.1$ ; ns, not significant).

		GR			NAV		
		Likelihood ratio	df	p ( $> \chi^2$ )	Likelihood ratio	df	p ( $> \chi^2$ )
GAN	Type of mother	7.1	2	*	7.82	2	*
	Soil	0.008	1	ns	0.77	1	ns
	Type of mother × Soil	0.92	2	ns	1.16	2	ns
LUX	Type of mother	4.8	2	•	7.92	2	*
	Soil	0.001	1	ns	2.89	1	•
	Type of mother × Soil	1.53	2	ns	0.61	2	ns



**Figure 4** Percentage of *N. caerulescens* plants (alive after winter) that showed symptoms of fungal disease, GAN (A,B) and LUX populations (C,D), selected from mother plants at GR (A,C) and NAV (B,D) sites, grown on two different soils (GR and NAV soils). Different letters indicate significant difference between types of mother at the  $p < 0.05$  level (bilateral glmm with Šidák correction).

These results are encouraging for the potential of selection for disease resistance in *N. caerulescens* cultivars, in spite of the initially low resistance that seems to prevail in the genetic pool, especially for GAN. The trend of pathogen resistance highlighted here might however be partly biased by the importance of contagion of close neighbours in the process of

infection. The relatively low number of infected individuals prevents however a finer analysis of the resistance to initial infection (not due to contagion by neighbours).

Survival after winter was not significantly influenced by the type of mother plant (Table S1), even if S-GAN<sub>p</sub> and S-LUX<sub>p</sub> had slightly higher rates of mortality (19 and 21 %) compared to L-GAN<sub>p</sub> and L-LUX<sub>p</sub> (14 and 13 %). The average winter survival of 84% was much higher than on their natural CAL (~30%) and NMET sites (~50%) in Belgium and Luxemburg (Dechamps *et al.* 2011).

Total mortality at the end of the experiment was significantly higher for S-GAN<sub>p</sub> and S-LUX<sub>p</sub> (33 and 30 %) than L-GAN<sub>p</sub> and L-LUX<sub>p</sub> (18 and 17 %) ( $\chi^2$  test  $p < 0.05$ ), which indicates a globally higher vulnerability of the progeny of small mother plants to winter survival, disease or other unidentified causes of death.

## 4. Conclusion

Selection of high biomass individuals of *N. caerulea* was expected to ensure a biomass gain in their progeny. Surprisingly, we did not find a coherent pattern of higher biomass in the progeny of promising individuals. In the case of GAN plants we rather suggest that the lifecycle (annual *vs* biennial) had a stronger influence on biomass production. We highlighted that selection for large individuals involuntarily led to selection of annual plants in one case. Nevertheless, the progeny of small plants from both populations were on average less resistant to fungal pathogens and had higher rates of mortality than the progeny of large plants. The high variation in biomass of the progeny of single mother plants also shows that maternal effects can compromise the process of cultivar selection.

## Acknowledgments

We gratefully thank Dirfy-Eleni Giatzouzaki and Kristel Wart for their valuable help in setting up the experiment, harvesting, washing and weighing plants.



---

# Discussion générale

---

## 1. Quelle influence de la variabilité inter- et intra-populationnelle ?

Une première question de ce travail de thèse est de savoir quelle(s) population(s) utiliser pour mettre en place une technique de phytoextraction efficace avec *N. caerulescens*. Initialement, dans les premiers essais de la littérature, des populations facilement accessibles ou connues ont été utilisées comme la population métallicole de Prayon, Belgique (Baker *et al.* 1994, Brown *et al.* 1995, Felix 1997, Hammer and Keller 2003, McGrath *et al.* 1993, 2000, Schwartz 1997). Ensuite, plusieurs travaux ont mis en avant les capacités accrues de la population Ganges pour accumuler le Cd, et la plupart des essais de terrain ont alors utilisé « Ganges » ou d'autres populations apparentées du Sud de la France (Saint Félix de Pallières) (Hammer et Keller 2003, McGrath *et al.* 2006, Maxted *et al.* 2007, Rees 2014, Robinson *et al.* 1998). Le premier problème de l'approche quasi « mono-populationnelle » adoptée jusqu'à présent est qu'elle réduit l'optimisation de la phytoextraction au seul paramètre de concentration maximale de la plante en Cd, en oubliant l'accumulation du Zn, la croissance et d'autres paramètres liés au cycle de vie. Par ailleurs, l'objectif de trouver une seule population idéale, et donc de n'utiliser qu'une faible variabilité initiale, pourrait constituer une erreur agronomique car il pourrait limiter la marge de progression et l'adaptation à la multiplicité des conditions de sol et de contamination et augmenterait le risque de s'exposer à une plus faible résistance aux maladies et aux aléas climatiques. Le screening d'un grand nombre de populations a également été réalisé dans plusieurs études pour développer des bases de connaissance sur la variation populationnelle et phénotypique dans le but de définir les traits favorables d'un cultivar idéal pour la phytoextraction (Escarré *et al.* 2013, Gonneau *et al.* 2014, Sterckeman *et al.* 2017). L'étape d'évaluation de cette variabilité dans des essais de terrain de phytoextraction n'avait encore jamais été réalisée.

### 1.1. Différences entre écotypes Ganges et NMET-Lux

Le premier chapitre de ce travail a permis de lever un premier voile sur l'impact du choix de la population sur l'efficacité de phytoextraction. L'effet se marque non seulement sur l'accumulation du Cd et du Zn (et secondairement du Ni), mais aussi sur la survie et la production de biomasse. Cette première expérience – limitée à la comparaison de 3 populations en raison de la complexité des essais de terrain – a souligné quatre grandes différences entre la population Ganges (GAN) et les populations NMET luxembourgeoises (LUX). La faible variation entre les deux populations luxembourgeoises comparées nous a conduits à n'en conserver qu'une seule dans les autres expériences de cette

thèse (afin de limiter l'ampleur du nombre de parcelles, de plantes, de pots ou d'échantillons). Les quatre tendances de comportement des populations identifiées ont été confirmées dans les essais des autres chapitres et ont été étoffées (voir synthèse dans le Tableau 1):

1) Concentrations foliaires en Cd plus élevées chez GAN

Premièrement, les **concentrations foliaires en Cd** apparaissent à chaque fois nettement plus élevées chez GAN (entre 2 et 5 fois ; chapitres 1, 2 et 3), mais dans l'étude du quatrième chapitre comprenant une vingtaine de sols, on a pu montrer que sur certains sols fortement carbonatés cet avantage n'était plus présent. Cependant, dans les essais de terrain sur les sites de MAS et NAV, dont les sols sont carbonatés avec un pH alcalin (8 et 7,5 respectivement), l'accumulation du Cd était bien plus prononcée chez GAN. On peut donc difficilement énoncer de règle claire quant au comportement de la plante face aux sols carbonatés. En revanche, il apparaît clairement que l'avantage de GAN pour l'extraction du Cd augmente avec la concentration en Cd du sol, étant à son plein potentiel pour des contaminations modérées entre 2 et 10 mg Cd kg<sup>-1</sup> (chapitre 4).

2) Concentrations foliaires en Zn (et Ni) plus élevées chez LUX

Deuxièmement, les **concentrations foliaires en Zn** chez LUX sont bien supérieures à GAN à chaque essai, avec cependant une magnitude variable (1,2 à 2 fois plus sur le terrain, et plus de 3 fois supérieure en pots) probablement dépendante de la croissance et de la biodisponibilité du Zn (chapitres 1, 2, 3 et 4).

3) Meilleur taux de survie de LUX

Troisièmement, la **plus faible survie de GAN par rapport à LUX** s'est à la fois marquée dans les chapitres 1, 2 et 5, par une plus grande sensibilité à l'herbivorie mais également à une plus faible résistance de GAN aux pathogènes (maladies fongiques). Dans le chapitre 3, il n'y avait pas de différence de survie liée à l'herbivorie ou aux pathogènes, probablement expliquée par la très bonne survie générale des plantes.

4) Biomasse individuelle plus élevée des plantes de LUX

Enfin, le troisième chapitre est venu apporter une meilleure compréhension de la **plus haute biomasse** des plantes LUX récoltées en novembre, déjà observée dans les premiers et deuxièmes chapitres sur les sites de GR et NAV. Les deux populations comparées ont deux cycles de vie dominants assez différents : GAN est majoritairement annuelle et LUX est principalement bisannuelle. Ceci se traduit par plusieurs différences majeures : 1) une croissance initiale plus rapide de GAN avec une biomasse au mois de juin plus élevée en cas de semis automnal (chapitres 3 et 5), 2) un plus grand pourcentage de floraison la première année pour GAN ce qui se traduit par une plus grande biomasse reproductive (chapitres 3, 4



et 5) mais aussi 3) si la culture est prolongée durant l'été jusqu'à l'automne, une mortalité plus importante (chapitre 3) et surtout 4) moins de production de biomasse végétative (et totale) (chapitres 2 et 3) au cours du cycle de vie qui est plus court.

Si plusieurs différences mises en évidence dans ce travail sont liées aux caractéristiques « intrinsèques » des populations utilisées, on ne peut cependant pas exclure qu'une partie soit également due à une moins bonne adaptation de la population Ganges – venant d'un climat méditerranéen – au climat de nos latitudes. Idéalement, il aurait fallu comparer des populations d'une même zone géographique, dans notre cas la Belgique, le Luxembourg et le Nord de la France. Cependant, l'absence de populations hyperaccumulatrices de Cd hors de la sous-unité du Sud de la France nous a forcés à choisir la population Ganges.

**Tableau 1.** Moyennes des taux de survie, des biomasses (totales et individuelles) et des concentrations foliaires en Cd et Zn pour les populations GAN et LUX de *N. caerulea*, tous traitements confondus pour chacun des cinq chapitres.

	Pop.	Site	Survie	Biomasse totale (t MS ha <sup>-1</sup> )	Biomasse individuelle (g plante <sup>-1</sup> )	Cd (µg g <sup>-1</sup> )	Zn (µg g <sup>-1</sup> )
CH1 *	GAN	GR	0.52	1.56	2.76	128	11730
		MAS	0.52	0.98	1.76	92	4520
	LUX	GR	0.72	3.05	4.03	45	15920
		MAS	0.68	1.25	1.83	25	6550
CH2 *	GAN	MAS	0.66	1.07	2.08	137	5950
		NAV	0.82	1.31	2.05	166	7020
	LUX	MAS	0.80	1.25	2.03	41	7420
		NAV	0.9	2.06	3.01	23	8330
CH3**	GAN	GR 6 mois	0.99	1.41	1.43	190	13670
		GR 12 mois	0.62	2.88	3.85	81	6990
	LUX	GR 6 mois	0.95	0.91	0.94	40	16540
		GR 12 mois	0.93	4.75	5.13	23	10370
CH4*	GAN		0.81		1.06	28	1250
	LUX		0.88		1.15	19	4290
CH5	GAN		0.73		0.91		
	LUX		0.81		0.41		
<b>Récolte automne</b>	<b>GAN</b>		<b>0.62 ± 0.12</b>	<b>1.56 ± 0.77</b>	<b>2.5 ± 0.84</b>	<b>121 ± 35</b>	<b>7240 ± 2710</b>
	<b>LUX</b>		<b>0.81 ± 0.11</b>	<b>2.47 ± 1.47</b>	<b>3.21 ± 1.39</b>	<b>31 ± 11</b>	<b>9720 ± 3750</b>
<b>Récolte été</b>	<b>GAN</b>		<b>0.84 ± 0.13</b>	<b>1.41</b>	<b>1.13 ± 0.27</b>	<b>109 ± 115</b>	<b>7460 ± 8780</b>
	<b>LUX</b>		<b>0.88 ± 0.07</b>	<b>0.91</b>	<b>0.83 ± 0.38</b>	<b>30 ± 15</b>	<b>10410 ± 8660</b>

\* Tous traitements confondus; \*\*Uniquement données repiquage en novembre ; <sup>1</sup> Moyenne (±SD) CH1, CH2 et CH3 12 mois; <sup>2</sup> Moyenne (±SD) CH3 6 mois, CH4 et CH5.

## 1.2. Sélection

### *Variabilité et hérédité*

La connaissance de la variabilité phénotypique entre populations est l'étape préliminaire à la sélection de cultivars performants pour la phytoextraction (Chaney *et al.* 1997, Schwartz *et al.*

2006, Sterckeman *et al.* 2017). Ce qui complique le processus de sélection est que le nombre de traits à sélectionner est grand. Ce problème apparaît dès le premier chapitre et est confirmé par nos essais de terrain des chapitres 2 et 3 : traits d'accumulation du Cd et du Zn, traits de croissance et d'histoire de vie mais aussi traits de résistance aux stress biotiques et abiotiques sont autant de paramètres à potentiellement prendre en compte lors de la sélection.

La variabilité d'origine génétique des traits est favorable à l'amélioration végétale dans l'optique de trouver une combinaison de traits adéquate. Au niveau de l'espèce, parmi 60 populations, les coefficients de variation de la biomasse aérienne et des concentrations en Cd et Zn chez *N. caerulescens* varient de 60 à 130 %, avec de larges gammes de variation : 1 – 16 g de biomasse aérienne, 10 - 370 µg Cd g<sup>-1</sup>, 1500 - 20 000 µg Zn g<sup>-1</sup> (Sterckeman *et al.* 2017). Cela indique déjà un grand potentiel de sélection parmi les populations. Au sein de chaque population, nous avons pu mettre en évidence une variabilité importante lors des essais de terrain entre individus cultivés sur une même condition (Tableau 2), évaluée pour 4 individus d'une même parcelle (chapitre 1), 3-4 individus sur un même sol (chapitre 4) ou 3 individus d'un même pool de graines dans un même bac (chapitre 5). Pour la biomasse individuelle, les coefficients de variation moyens s'étalent de 32 à 63 %, ou autrement exprimé, la différence moyenne entre la plus petite et la plus grande plante est d'environ un facteur 2.5 (chapitre 4) à 4-5 (chapitres 1 et 5). Les coefficients de variation moyens pour les concentrations en Cd et Zn vont de 23 à 37 %, pour une gamme maximale variant d'un facteur 1.8-2.2. Cela démontre que même au sein d'une population ciblée, il y a un potentiel de sélection au moins aussi grand – voire plus important – pour la production de biomasse que pour l'accumulation du Cd et du Zn.

**Tableau 2.** Coefficients de variation moyens (CV ± SD) de la biomasse individuelle et des concentrations foliaires en Cd et Zn pour les populations GAN et LUX de *N. caerulescens*, au sein de chaque parcelle/bac d'un même traitement et d'un même sol. Pour le chapitre 5, les coefficients de variation sont calculés pour chacun des groupes de 3 plantes issues d'un même pool de graines.

	Pop.	CV (%)		
		Biomasse individuelle	Cd	Zn
Chapitre 1	GAN	63 ± 23	23 ± 10	24 ± 11
	LUX	43 ± 21	25 ± 15	23 ± 14
Chapitre 4	GAN	35 ± 22	37 ± 23	29 ± 17
	LUX	32 ± 22	30 ± 16	23 ± 13
Chapitre 5	GAN	53 ± 29		
	LUX	50 ± 32		

Au-delà de cette variabilité, pour qu'un processus de sélection de cultivars puisse réussir il faut que les traits aient une bonne héritabilité. Dans la perspective d'une sélection les populations NMET ont peut-être ainsi un avantage car elles ont un taux d'autogamie et donc d'homozygotie plus élevé (0,45) que les CAL (0,3) (Dubois *et al.* 2003, Gonneau *et al.* 2016, Mousset *et al.* 2016). Cela implique que leur descendance pourrait être plus rapidement homogène que celle des populations CAL.

Le cinquième chapitre permet d'apporter certains éléments quant au potentiel de sélection pour la biomasse. Le potentiel de sélection pour une plus haute biomasse apparaît mitigé : parmi la descendance de plantes à haute biomasse, nous n'avons pas observé d'avantage significatif et systématique en termes de production de biomasse par rapport à la descendance de plantes à faible biomasse ou à un pool de graines non sélectionnées. La variation importante de biomasse entre individus issus d'une même mère (CV 47-61 %) suggère que les effets maternels ou environnementaux pourraient compliquer le processus de sélection. Néanmoins, la faible survie de certaines plantes mères, combinée à la durée de croissance un peu courte pour tenir dans les temps impartis de la thèse ont cependant peut-être empêché d'obtenir un résultat statistiquement significatif. Enfin, l'essai suggère qu'il existe un potentiel de sélection pour une résistance accrue aux pathogènes.

Il semblerait par ailleurs qu'il y ait une certaine héritabilité du cycle de vie – comme montré sur les sites d'origine (Dechamps *et al.* 2011) – l'un des groupes sélectionnés à partir d'une seule plante-mère présentant un pourcentage de floraison significativement supérieur aux autres groupes sélectionnés et non sélectionnés. L'inconvénient de produire des cultivars bisannuels serait la durée plus longue de production des graines. Par ailleurs, Sterckeman *et al.* (2017) ont mis en évidence une corrélation négative entre le nombre d'inflorescences et le contenu en ETM chez *N. caerulea*, ce qui suggère que les cultivars à plus haute accumulation pourraient produire moins de graines.

### ***Un système de reproduction encore incompris***

La biologie reproductive de *N. caerulea* est cependant encore méconnue. C'est une espèce partiellement autogame, mais à un degré variable en fonction des populations (Mousset *et al.* 2016). On n'a également que peu de connaissances sur son mode de pollinisation. Un préalable à un processus de sélection serait de caractériser en jardin commun un grand nombre (plusieurs dizaines au moins) de lignées issues de plantes mères récoltées sur le terrain (plusieurs par site, sur différents sites). L'objectif serait d'évaluer d'une part la diversité génétique intra- et inter-sites et d'autre part la variation au sein d'une même famille (descendance d'une plante) afin de mieux comprendre le régime reproductif de l'espèce – qui détermine son degré d'hétérozygotie. Le processus de sélection sera différent si

la plante est majoritairement auto- ou allogame. Un tel test permettra également de démêler les trade-offs entre biomasse aérienne, biomasse racinaire et accumulation des ETM, afin de définir un idéotype à sélectionner pour la phytoextraction. Les lignées les plus productives en termes d'extraction pourront alors être sélectionnées en conservant toutefois une diversité génétique suffisante pour développer des variétés résilientes aux aléas climatiques et biotiques.

### ***Environnement de sélection***

La question du **choix de l'environnement de sélection** est un autre déterminant important de la réussite d'un processus de sélection. On peut certainement exclure de l'effectuer en hydroponie car les résultats ne seraient pas représentatifs de la performance sur le terrain (Escarré *et al.* 2013, Li *et al.* 2012). Une autre option serait de sélectionner sur des sols artificiellement enrichis en ETM pour un meilleur contrôle de la contamination et également pour stimuler la croissance. Mais cela comporte deux inconvénients : 1) une contamination excessive peut à la fois stimuler la croissance mais aussi inhiber la présence de pathogènes, d'herbivores ou d'adventices, alors que l'idéal est d'avoir des fourchettes de contamination représentatives des sols candidats à la phytoextraction avec *N. caeruleus* (sols agricoles, de friches ou de jardins contaminés en Cd), et 2) la contamination artificielle n'est pas représentative des formes métalliques réellement disponibles ni de l'hétérogénéité de la contamination sur le terrain, hors certains traits comme la capacité à faire du *root foraging* ne peuvent être testés que dans ces conditions (Whiting *et al.* 2001, Dechamps *et al.* 2008). Enfin, la sélection devrait idéalement se faire sur plusieurs sites et au sein de différentes régions climatiques pour maximiser l'adaptation à différentes conditions environnementales.

### **Recommandations :**

Alors que la tolérance aux métaux n'est pas un trait primordial à sélectionner pour la phytoextraction sur des sols modérément contaminés, les traits majeurs à maximiser sont l'accumulation du Cd et du Zn et la biomasse, à travers la croissance aérienne, le cycle de vie et la résistance aux maladies et aux ravageurs, mais également la croissance racinaire.

L'ensemble des populations CAL-SF (sous-unité SU1 selon Gonneau *et al.* 2017) constitue le réservoir le plus prometteur pour développer un cultivar pour l'extraction du Cd, mais plusieurs possibilités d'amélioration existent pour augmenter leur rendement de biomasse via la **sélection pour une résistance** accrue aux pathogènes et aux herbivores et la **sélection pour un cycle bisannuel** mono- ou polycarpique (dans ce cas une récolte des hampes serait nécessaire lors de la fructification).

Les populations NMET sont supérieures pour l'extraction du Zn et pourraient être envisagées en culture associée avec des CAL-SF en cas de fortes concentrations en Zn dans le sol. Elles peuvent aussi constituer une ressource génétique intéressante pour la résistance aux pathogènes et herbivores et le cycle bisannuel. Les NMET-SF, bien que plus résistantes aux herbivores que les CAL-SF, ne sont *a priori* pas une option favorable pour la phytoextraction car elles ont des capacités d'accumulation du Cd similaires aux autres NMET, des niveaux de Zn plus bas, et un cycle majoritairement annuel (Jimenez-Ambriz *et al.* 2007, Sterckeman *et al.* 2017).

L'évaluation en jardins communs de nombreuses lignées issues de populations CAL et NMET doit être le préalable à la sélection ou au croisement entre les lignées les plus prometteuses.

## 2. Comment mettre en place la phytoextraction ?

### 2.1. Influence des pratiques de cultures

De manière intéressante, nous avons montré à plusieurs reprises dans ce travail que certaines pratiques de culture comme la fertilisation, dont on attendait un effet positif, ont en fait eu un impact négatif ou neutre sur l'efficacité de phytoextraction.

Ainsi, dans le premier chapitre, l'**ajout de compost** a eu un effet de réduction significative de la biodisponibilité des éléments traces dans les sols, et par conséquent une légère baisse des concentrations foliaires en Cd et en Zn chez *N. caerulea*. Cette baisse n'a pas été compensée par un gain de biomasse auquel on aurait pu s'attendre, surtout sur le site plus pauvre en matière organique. Ceci peut éventuellement s'expliquer par certaines limitations du protocole (quantité de compost et timing peut-être inadéquats). Toujours est-il que l'apport de matière organique n'est pas désavantageux dans tous les cas. D'autres études ont ainsi mis en évidence les effets positifs d'un apport de biochar pour une culture de *N. caerulea* sur la croissance racinaire notamment (Rees *et al.* 2015, 2016), et aussi pour l'ensemble de la production de biomasse comme l'a montré l'effet positif d'une teneur élevée en MO dans le quatrième chapitre. Notre étude a permis de confirmer en culture la préférence de l'espèce pour les substrats bien drainants et aérés dans les sites naturels (Basic *et al.* 2006, Dechamps *et al.* 2008, Meerts et Grommesch 2001, Molitor *et al.* 2005, Sirguy *et al.* 2018).

Dans les deuxième et quatrième chapitres, il a été montré que l'apport de **fertilisants azotés** diminue les concentrations en Cd et Zn. Partiellement expliquée par un effet de dilution dans des plus grandes plantes, cette diminution pourrait aussi être liée à des effets de compétition avec les ions nitrate et/ou ammonium (Xie *et al.* 2009), et aussi une

diminution du rapport racines/tige. La diminution est en partie compensée par un gain de biomasse, variable entre sols. Dans l'ensemble, l'apport de fertilisants azotés à des doses raisonnables (100-120 kg ha<sup>-1</sup>) semble avoir un effet neutre sur l'efficacité d'extraction et ne serait bénéfique que dans des sols réellement pauvres en azote. Nous montrons aussi que les études qui évaluent l'effet de l'azote appliqué à des doses trois à cinq fois plus élevées que ce qui est environnementalement acceptable pour des applications en champ ont un intérêt uniquement fondamental mais pas appliqué (Monsant *et al.* 2008, Xie *et al.* 2009). Par ailleurs, l'apport de fertilisants minéraux a aussi montré qu'il stimulait la croissance de champignons pathogènes et l'infection des plantes (chapitre 2).

Dans le troisième chapitre, on a pu observer qu'**allonger la durée de culture** augmentait effectivement la biomasse produite mais engendrait une diminution des concentrations en ETM des plantes. Cela met en évidence que l'accumulation du Cd et du Zn n'est pas constante durant toute la croissance de la plante et que l'approvisionnement de la solution du sol peut devenir limitant en cours de culture sur les sols faiblement contaminés. La baisse des concentrations n'annule cependant pas complètement le fort gain de biomasse d'une longue saison de culture de 12 mois par rapport à une récolte après 6 mois, la minéralomasse totale après 12 mois étant bien supérieure (1.5 fois pour le Cd avec GAN, et 3.5 fois pour le Zn avec LUX) à celle récoltée après 6 mois.

Enfin, ces nombreuses expériences de terrain nous permettent de tirer plusieurs enseignements empiriques sur la culture de *N. caerulea* qui n'ont pas été formellement testés:

- Des conditions d'humidité suffisantes sont déterminantes pour le semis direct sur le terrain et la mise sous abri peut le faciliter. Dans un essai de semis direct sous abris qui n'a pas été mené à terme, on a pu obtenir une densité de récolte de  $170 \pm 30$  plantes par m<sup>2</sup> (pour une densité d'environ 300 graines au m<sup>2</sup>) et un rendement de  $1.9 \pm 0.6$  t ha<sup>-1</sup>. En conditions contrôlées (boîtes de Petri ou multicellules de terreau), le taux de germination est pourtant de l'ordre des 85-90%. La germination et le développement des jeunes plantules sur le terrain sont donc compliqués par plusieurs facteurs potentiels comme les conditions de température et d'humidité et la pression des herbivores.
- L'essai de semis direct mentionné ci-dessus nous a aussi permis de constater qu'il existe un bon potentiel de reprise après une coupe de la biomasse aérienne (en gardant intact les méristèmes végétatifs) comme déjà montré par McGrath *et al.* (2000). Cependant, lors de notre essai, la biomasse récoltée après 4 mois de croissance avec la coupe était de seulement  $0.8 \pm 1$  t ha<sup>-1</sup>.

- La croyance selon laquelle les plantes hyperaccumulatrices ne sont pas appétantes et qu'une gestion des ravageurs ne serait pas nécessaire (Pollard et Baker 1997, Schwartz 1997) a clairement été invalidée lors de nos essais de terrain par les fortes attaques de gastéropodes sur les cultures de *N. caerulescens*. La lutte contre les herbivores au printemps est cruciale pour la survie des jeunes plantules. Mise en place dès la deuxième année d'essai, la lutte chimique contre les herbivores a permis de limiter considérablement la mortalité.
- La lutte contre les adventices est très demandeuse en main d'œuvre sur des parcelles d'essai car *N. caerulescens* est peu compétitive et met du temps à couvrir complètement le sol (observations personnelles). La lutte devrait être mécanisée à plus grande échelle.
- La culture des mêmes sites et même parcelles jusqu'à trois années successives a montré l'apparition de pathogènes, et l'augmentation de la fréquence des attaques, ce qui soulève la question de la nécessité d'une rotation dans un cycle de phytoextraction.

**Recommandations :** Pour l'installation des plantes, le repiquage est nettement supérieur au semis direct pour la production de biomasse (chapitre 3) et devrait être favorisé pour les petites surfaces. La densité de repiquage peut être maximisée (100-120 plantes m<sup>-2</sup>) pour limiter la compétition avec les adventices et potentiellement stimuler l'exploration racinaire (chapitre 2). Cette densité pourra probablement être diminuée si la sélection permet d'améliorer la biomasse individuelle. Pour les plus grandes surfaces – comme les terres agricoles – une optimisation du semis direct est nécessaire. L'installation à l'automne est à favoriser pour des cultivars bisannuels car elle permet de gagner un temps de croissance bénéfique sur le rendement d'extraction et favorise une meilleure installation (moins de pression d'herbivores en début de croissance). A moins d'une réelle carence en azote dans le sol (< 10-20 mg N kg<sup>-1</sup>), nous ne recommandons pas l'apport de fertilisants azotés minéraux, et l'apport de fertilisants phosphatés est également à proscrire car il entraîne une baisse de la biodisponibilité des ETM. Un apport raisonné d'amendement organique incorporé dans le sol à l'avance serait très probablement le plus bénéfique sur des sols pauvres sur base des préférences de l'espèce pour les sols organiques et du moindre risque de déséquilibrer le statut nutritif du sol et de stimuler le développement de pathogènes qu'avec des fertilisants de synthèse.

## 2.2. Conditions édaphiques

Afin de définir les conditions d'application de la phytoextraction, il est nécessaire d'identifier les sols sur lesquels *N. caerulescens* peut facilement être cultivée et, au contraire, les conditions édaphiques qui sont défavorables à sa croissance. Dans son travail de thèse, Schwartz (1997) a montré que *N. caerulescens* peut être cultivée sur une large gamme de substrats : sol agricoles contaminés par des boues d'épuration, boues sédimentaires de cours d'eau, sols de friche industrielle (fonderies de Pb, de Zn, cokeries). Tous les autres essais de terrain se sont faits sur des sols agricoles contaminés par des ajouts d'amendements ou des dépôts atmosphériques. Les expériences menées dans ce travail constituent donc la **première démonstration de phytoextraction avec *N. caerulescens* sur des sols urbains**. Trois sites d'étude ont été cultivés : deux friches, l'une située sur un talus de chemin de fer (Gare Royale GR) et l'autre située sur l'ancien tracé de la Senne entre des bâtiments industriels et résidentiels (Masui, MAS), ainsi qu'un potager communautaire (Navez, NAV). Le succès de ces essais en termes de production de biomasse fut très variable entre sites, avec une gamme de biomasse moyenne variant de 1 à 5 t ha<sup>-1</sup> (MAS < NAV < GR). Ces variations peuvent être expliquées par des facteurs non édaphiques (exposition des parcelles au soleil, abondance d'herbivores,...) et par les caractéristiques contrastées des sols. Pour comprendre la part de variation liée uniquement aux conditions édaphiques, nous avons mené un essai en pots sur une vingtaine de sols différents, à défaut d'une multitude d'essais de terrain compliqués à mettre en place.

L'étude de Yanai *et al.* (2006) était jusque là la seule à avoir utilisé un nombre conséquent de sols différents (une vingtaine) pour faire pousser *N. caerulescens*. Leur étude a permis de développer des modèles prédictifs de l'extraction du Cd et du Zn basés sur les concentrations du sol en Cd et Zn et sur le pH (et secondairement la texture et le carbone organique). Leur étude avait pour limite de considérer peu de variables de sol, et de ne pas traiter séparément la production de biomasse. Notre étude a permis d'identifier – au-delà des concentrations en Cd et Zn – les variables de sol qui influençaient significativement la croissance de *N. caerulescens* et l'efficacité d'extraction, confirmant certaines prédictions ou constatations d'autres études (Hammer et Keller 2003, Keller et Hammer 2004, Maxted *et al.* 2007, Knight *et al.* 1997) :

- des teneurs élevées en **matière organique** et une structure de sol aérée stimulent nettement la croissance de *N. caerulescens* ;
- l'**azote disponible** a un impact positif sur la production de biomasse aérienne, mais a un effet neutre sur l'efficacité d'extraction car il réduit les concentrations foliaires en ETM ;



- le **cuivre** du sol, connu pour être toxique à des hautes concentrations ( $> 1000 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Lombi *et al.* 2001b, Walker et Bernal 2004), peut inhiber partiellement la croissance de *N. caerulescens*, même à des concentrations modérées ( $50 - 200 \text{ mg kg}^{-1}$ );
- on sait que l'extraction est plus efficace sur sols acides (pH 5-6) que sur sols alcalins (Hammer et Keller 2003, Yanai *et al.* 2006) et nos essais sur des sols à pH entre 6.2 et 8 montrent que l'extraction du Cd est un peu moins efficace sur les **sols carbonatés**, la valeur seuil de pH  $> 7$  étant un bon déterminant, comme démontré aussi par Maxted *et al.* (2007).

### 3. La phytoextraction avec *N. caerulescens* comme option de remédiation écologique ?

#### 3.1. Impact sur les concentrations du sol en Cd et Zn

La phytoextraction vise à exporter les contaminants métalliques hors d'un site, en récoltant la biomasse des plantes. La mesure de l'efficacité de la technique se fait donc en mesurant la baisse des concentrations dans l'horizon de surface du sol par des prélèvements de sols avant et après culture de *N. caerulescens*. En parallèle, on peut estimer la baisse attendue des concentrations échangeables et totales dans les 20 premiers cm du sol sur base de la minéralomasse des plantes, c'est-à-dire la quantité de métaux extraits par les plantes, ce qui a été fait le plus souvent dans la littérature (Hammer et Keller 2003, McGrath *et al.* 2006, Zhao *et al.* 2003). Enfin, une troisième voie est celle de la culture de phytomètres – c'est-à-dire de plantes cultivées dont l'accumulation du Cd a déjà été bien étudiée – après la culture d'hyperaccumulatrices. Cela permettrait d'évaluer la biodisponibilité après phytoextraction et constituerait ainsi une mesure directe d'évaluation de risque sanitaire. Keller et Hammer (2004) ont ainsi mis en évidence une réduction significative des concentrations foliaires en Cd et en Zn dans les feuilles de *Lactuca sativa* cultivées après *N. caerulescens* sur un sol acide.

Dans les deux premiers chapitres nous avons mesuré la baisse des concentrations échangeables en Cd et en Zn directement au sein de chaque parcelle et également sur base de la minéralomasse des plantes (Tableau 3). Les deux mesures ont une relativement bonne correspondance, bien que la diminution du Zn échangeable dans le sol surestime légèrement ce qui est extrait par les plantes. La différence peut être liée à une plus grande erreur sur les mesures faites sur le sol et à d'autres pertes ou redistributions comme la lixiviation et la séquestration temporaire des ETM dans les racines.

Dans ce travail, le taux d'extraction moyen après une récolte de GAN (essais de terrain tous traitements confondus) s'élève à **7 % du Cd total** et **14 % du Cd échangeable**, jusqu'à 18 % et 25 % respectivement sur les meilleurs traitements (Tableau 3). Pour le Zn, l'extraction moyenne avec LUX est de **3 % du Zn total** et **11 % du Zn échangeable**, et sur les meilleurs traitements jusque 5 à 10 % du total et 15 à 30 % de l'échangeable. Si on vise à baisser les concentrations échangeables, l'efficacité est relativement similaire entre le Cd et le Zn, mais pour les concentrations totales c'est l'extraction du Cd qui est plus efficace, ce qui s'explique par le fait que la proportion de la fraction échangeable du Zn est généralement plus petite que celle du Cd. L'extraction des formes totales du Cd semble davantage réalisable que celle des formes totales du Zn, comme déjà conclu dans d'autres études (Koopmans *et al.* 2008, McGrath *et al.* 2006, Zhao *et al.* 2003).

Pour pouvoir extrapoler ces taux annuels à plusieurs années de culture, il faut notamment connaître l'évolution à moyen terme de l'approvisionnement de la solution du sol en ETM et des concentrations dans les plantes (Koopmans *et al.* 2008). Initialement, les études ont fait l'hypothèse d'une extraction annuelle constante (McGrath *et al.* 2000, Felix 1997). Hammer et Keller (2003) ont cependant montré que les concentrations en Cd et en Zn diminuaient dans trois récoltes de *N. caerulea* faites la même année. On peut en effet s'attendre en théorie à une baisse des formes labiles dans le sol ce qui pourrait diminuer la minéralomasse d'année en année (Dessureault-Rompré *et al.* 2010). La meilleure façon d'y répondre est de mener des essais sur plusieurs années successives, qui tiendraient non seulement compte de la baisse possible de la biodisponibilité des ETM, mais aussi de l'influence de la variation annuelle de croissance et des potentielles baisses de rendements liées aux pathogènes ou aux ravageurs si on cultive plusieurs années d'affilée. Sur sept saisons successives de culture de *N. caerulea*, Tlustoš *et al.* 2016 ont mis en évidence une très large variabilité de l'extraction du Cd (0.35-5.8 kg Cd ha<sup>-1</sup>, CV 67 %) et du Zn (0.45-11.9 kg Zn ha<sup>-1</sup>, CV 69 %) et n'ont pas constaté de baisse des concentrations foliaires, mais le sol était très contaminé (27 mg Cd kg<sup>-1</sup> et 2700 mg Zn kg<sup>-1</sup>) et donc l'approvisionnement en ETM très probablement non limitant. Avec *Sedum plumbizincicola* cultivé sur un sol agricole contaminé modérément en Cd (3 - 4.5 mg Cd kg<sup>-1</sup>) et fortement en Zn (1500 - 2500 mg Zn kg<sup>-1</sup>), Deng *et al.* (2016) n'ont pas non plus montré de baisse systématique des concentrations foliaires en Cd et en Zn en 8 saisons de culture mais bien une grande variabilité entre saisons (0.1-1 kg Cd ha<sup>-1</sup>, CV 48 % et 9-29 kg Zn ha<sup>-1</sup>, CV 29 %).

Il n'existe donc pas encore de base solide sur laquelle se baser pour extrapoler nos résultats d'extraction à plusieurs années successives. Il apparaît clair que les modèles ne pourront prédire l'efficacité d'extraction avec fiabilité que sur base de suffisamment d'essais de terrain à long terme. Les rendements extrapolés sur base de croissance en pots ou en bacs, voire en multipliant la biomasse d'une plante par une densité théorique (*e.g.* Zhao *et al.* 2003,

Sterckeman *et al.* 2017) sont eux bien trop optimistes et ne devraient pas être considérés (Li *et al.* 2012).

**Tableau 3.** Diminutions relatives des concentrations échangeables (acétate d'ammonium-EDTA) et totales en Cd et en Zn dans les 20 premiers cm du sol après une culture de *N. caerulescens* (populations GAN et LUX), basées sur les mesures des concentrations avant et après culture, ou basées sur la minéralomasse dans les plantes. Les données sont les moyennes  $\pm$  erreur standard tous traitements confondus, ou la valeur moyenne sur le meilleur traitement (MAX).

Site	Pop.	Cd échangeable		Cd total	Zn échangeable		Zn total	
		Diminution (sol) (%)	Diminution (plantes) (%)	Diminution (plantes) (%)	Diminution (sol) (%)	Diminution (plantes) (%)	Diminution (plantes) (%)	
CH 1	GR	GAN	-17 $\pm$ 5.7	-14.8 $\pm$ 2.7	-9.1 $\pm$ 1.7	-8.8 $\pm$ 5.7	-8.8 $\pm$ 1.8	-2.8 $\pm$ 0.5
		LUX	-12 $\pm$ 3.4	-11.9 $\pm$ 2.5	-7.3 $\pm$ 1.3	-23 $\pm$ 3.8	-25.6 $\pm$ 3.1	-8.1 $\pm$ 1
		<b>MAX</b>		<b>-24</b>	<b>-13</b>		<b>-32</b>	<b>-10</b>
	MAS	GAN		-7.1 $\pm$ 1.7	-2.1 $\pm$ 0.5		-2.7 $\pm$ 0.5	-0.4 $\pm$ 0.1
		LUX		-2.4 $\pm$ 0.3	-0.7 $\pm$ 0.1		-4.6 $\pm$ 0.7	-0.6 $\pm$ 0.1
		<b>MAX</b>		<b>-9</b>	<b>-2.6</b>		<b>-8</b>	<b>-1</b>
CH 2	MAS	GAN	-10 $\pm$ 3	-13 $\pm$ 2	-3 $\pm$ 0.4	-8 $\pm$ 3	-5 $\pm$ 1	-0.4 $\pm$ 0.1
		LUX	-9 $\pm$ 3	-4 $\pm$ 1	-1 $\pm$ 0.1	-10 $\pm$ 3	-6 $\pm$ 1	-0.5 $\pm$ 0.1
		<b>MAX</b>		<b>-20</b>	<b>-4</b>		<b>-9</b>	<b>-0.7</b>
	NAV	GAN	-15 $\pm$ 2	-19 $\pm$ 4	-12 $\pm$ 2	-7 $\pm$ 1	-4 $\pm$ 1	-1 $\pm$ 0.2
		LUX	-9 $\pm$ 2	-4 $\pm$ 0.5	-3 $\pm$ 0.3	-9 $\pm$ 1	-7 $\pm$ 1	-1.8 $\pm$ 0.2
		<b>MAX</b>		<b>-27</b>	<b>-18</b>		<b>-9</b>	<b>-2.4</b>
CH 3	GR	GAN		-17 $\pm$ 2	-9 $\pm$ 1		-7 $\pm$ 1	-2 $\pm$ 0.2
		LUX		-4 $\pm$ 1	-2 $\pm$ 0.5		-12 $\pm$ 2	-4 $\pm$ 0.7
	<b>MAX</b>		<b>-23</b>	<b>-12</b>		<b>-21</b>	<b>-6.5</b>	
CH 4	23 sites	GAN		-5.2 $\pm$ 0.6	-3 $\pm$ 0.4		-1.8 $\pm$ 0.2	-0.6 $\pm$ 0.1
		LUX		-4.7 $\pm$ 0.5	-2.5 $\pm$ 0.3		-5.9 $\pm$ 0.7	-2 $\pm$ 0.3
		<b>MAX</b>		<b>-10</b>	<b>-9</b>		<b>-14</b>	<b>-4.4</b>

### 3.2. Quelles applications pour la phytoextraction ?

Deux facteurs qui peuvent déterminer l'adoption de la phytoextraction sont sa prévisibilité ainsi que sa viabilité économique. Annoncée comme bien moins coûteuse que les méthodes traditionnelles (Salt *et al.* 1995, Raskin *et al.* 1997), la phytoextraction souffre cependant d'une absence de réelles estimations de son coût voire de ses bénéfices économiques éventuels (Robinson *et al.* 2015). Nous pensons que ce travail de calcul des coûts ne pourra être fait qu'une fois l'itinéraire technique à grande échelle établi et ne développerons donc pas plus ce point qui sort du cadre de ce travail.

Selon les résultats de ce travail et d'autres études, les premiers terrains qui seraient propices à une mise en place à plus grande échelle de la phytoextraction avec *N. caerulescens* sont les sols agricoles modérément contaminés en Cd (Garbisu et Alkorta 2001, Joimel *et al.* 2016, Sterckeman et Puschenreiter 2018). Ils constituent les sites pour lesquels il y a le plus besoin d'une méthode de remédiation non-intrusive et qui conserve l'intégrité du sol et sa fertilité.

La contamination souvent diffuse et uniforme des sols agricoles constitue également un avantage pour la mise en place de la phytoextraction. La phytoextraction serait alors conçue comme une méthode de ‘*polishing*’ (Dickinson *et al.* 2009), qui pourrait même être envisagée, comme proposé par Maxted *et al.* (2007), en rotation avec les cultures habituelles tous les 5 à 15 ans selon les rendements afin de maintenir la contamination en Cd sous les seuils réglementaires.

Par ailleurs, comme déjà mentionné dans l’introduction de ce travail, le *bioavailable contaminant stripping* (BCS) serait une application de la phytoextraction certainement plus réaliste (Hamon et McLaughlin 1999). L’application du BCS soulève cependant la question de l’évolution de la contamination après la fin de la remédiation ainsi que de la standardisation et de l’uniformisation de critères d’évaluation de l’efficacité d’extraction (Koopmans *et al.* 2008). Le suivi des concentrations échangeables ou labiles devrait se faire à long terme pour évaluer la reconstitution de ces fractions à partir des formes mobilisables à long terme (Keller et Hammer 2004, Li *et al.* 2014, 2016). On a d’ailleurs pu constater dans le deuxième chapitre que la baisse des concentrations dans le sol mesurée juste après la récolte surestimait le prélèvement des plantes à cause d’une immobilisation des ETM par les fertilisants, tandis que la même mesure 6 mois plus tard était cohérente avec le prélèvement des plantes. Un autre aspect lié à la biodisponibilité des ETM, est la prise en compte des ETM qui ne sont pas accumulés par la plante hyperaccumulatrice (*e.g.* Cu, Pb). Il est important d’en faire également un suivi pour vérifier que leur mobilité n’augmente pas avec la phytoextraction comme cela a déjà pu être constaté avec *Sedum plumbizincicola* (Li *et al.* 2018). Par ailleurs, le BCS nécessite d’être accompagné d’une législation adéquate, basée sur des teneurs biodisponibles et non totales (Keller et Hammer 2004, Li *et al.* 2014). Bien que certains pays se basent déjà en partie sur des concentrations extractibles pour définir les normes de contamination, comme la Suisse ( $\text{NaNO}_3$  0,1 M) ou l’Allemagne ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1 M) (Lebourg *et al.* 1996, McLaughlin *et al.* 2000), la plupart des législations, dont celles des trois régions de Belgique, utilisent les concentrations totales.

Enfin, dans la plupart des essais et des synthèses de la littérature (Li *et al.* 2012, Sterckeman et Puschenreiter 2018), l’accent est mis principalement voire exclusivement sur le Cd, et le Zn se trouve souvent au second plan. Cela se justifie par la forte toxicité du Cd, par sa présence dans les sols agricoles européens (suite aux apports de boues d’épuration et d’engrais phosphatés) et dans les sols de rizières en Asie. Cependant, malgré sa faible toxicité, le Zn se trouve en général conjointement avec le Cd dans les sols contaminés et est souvent également au-dessus des normes de contamination des sols. Considérer également la phytoextraction du Zn se justifie notamment par sa phytotoxicité (Mertens et Smolders 2013) et par la compétition pour l’accumulation entre le Cd et le Zn. Ainsi, la plupart des sols contaminés

ont des ratios Zn/Cd supérieurs à 100, ce qui entraîne des réductions importantes de croissance chez beaucoup d'accumulatrices, sauf *N. caerulescens*, et limite aussi l'accumulation du Cd par cette espèce (Chaney *et al.* 2007).

Si on devait imaginer un modèle d'utilisation de la phytoextraction avec *N. caerulescens*, ce serait soit sur des petites surfaces de quelques ares en zone urbaine – des potagers collectifs par exemple – avec du repiquage de plantules ou sur des plus grandes surfaces – des terres agricoles par exemple – avec du semis direct. La technique de phytoextraction pourrait être mise en place par une entreprise spécialisée et contrôlée soit par un bureau d'étude soit par une administration publique. L'option d'une solution technique disponible et applicable par tout un chacun semble par contre moins adéquate, étant donné la nécessité d'un suivi adéquat des cultures, des concentrations en ETM dans le sol et du devenir de la biomasse contaminée (mise en décharge, incinération, recyclage,...). En fonction des utilisateurs du site à décontaminer, une collaboration avec ceux-ci pourrait cependant être envisagée pour l'entretien des cultures ce qui permettrait de diminuer les coûts et d'impliquer les bénéficiaires dans le processus. Cette approche serait appropriée dans les jardins collectifs mais nécessite un suivi rigoureux et une collaboration claire, comme nous avons pu le constater par des expériences malheureuses durant ce travail. Mettre en place la phytoextraction dans des jardins potagers est aussi une occasion de réaliser un travail de sensibilisation du grand public au problème de la contamination des sols et aux bonnes pratiques.

### 3.3. Enjeux et limites

Toute une série de synthèses de la littérature soutiennent que la phytoextraction avec des plantes hyperaccumulatrices ne serait applicable que dans trop peu de sites, que les temps de dépollution seraient trop longs, les biomasses trop faibles, et voient l'incertitude sur le devenir des biomasses polluées ou sur les sources commerciales de graines comme de trop grosses contraintes (Conesa *et al.* 2012, Dickinson *et al.* 2009, Robinson *et al.* 2009, 2015). Ces révisions constituent cependant le plus souvent des articles d'opinion, étayés par peu de sources et de données. On peut aussi y voir un effet de mode qui a concentré l'essentiel des gros projets européens et internationaux récents sur la valorisation de sites marginaux pour de la production de biomasse et de la remédiation douce, dénommée désormais sous le terme de *Gentle Remediation Options* (Cundy *et al.* 2016, Kidd *et al.* 2015). Même si beaucoup de ces obstacles sont tangibles et devraient être traités dans des projets multidisciplinaires, il serait hâtif de les considérer comme insurmontables.

Un des enjeux majeurs de la phytoextraction que nous identifions est en effet celui du devenir des ETM extraits et exportés hors d'un site dans la biomasse récoltée. Même si ce travail n'a

pas traité cet aspect, il est important de souligner la nécessité de continuer le développement des voies de recyclage des ETM abordées dans l'introduction générale. Un deuxième enjeu est celui de la polycontamination des sols et plus particulièrement de la présence récurrente de Pb en excès dans les sols contaminés. Aucune solution probante de phytoextraction du Pb n'a, à ce jour, été présentée, ce qui constitue un frein à l'adoption de techniques de phytoextraction pour décontaminer des sols.

En ce qui concerne la phytoextraction avec *N. caerulea*, plusieurs limites peuvent être soulevées sur base de ce travail. Présentée comme une méthode de remédiation écologique, on a pu voir – à l'échelle expérimentale – qu'elle nécessitait quand même l'apport de produits phytosanitaires pour lutter contre les pathogènes, les mollusques ou les insectes. L'utilisation de tels produits a un coût environnemental et devrait être évitée si on veut que la technique soit réellement écologique. Par ailleurs, la faible compétitivité de *N. caerulea* face aux adventices et le travail conséquent de désherbage qui y est lié, constituent des réels désavantages de cette espèce. Enfin, comme le concluent Sterckeman et Puschenreiter (2018) dans une synthèse des essais de terrain de phytoextraction du Cd, la biomasse faible des hyperaccumulatrices rend trop long les temps de dépollution. Les auteurs soutiennent toutefois qu'un processus de sélection pourrait être une solution à ce problème. Comme nous en avons déjà discuté, ce processus de sélection pour la biomasse pourrait être compliqué par la forte dépendance environnementale de ce trait, et par la méconnaissance de la biologie reproductive de *N. caerulea*.

Par rapport aux protocoles mis en place dans ce travail, on peut aussi énoncer certaines limites. Ainsi, l'expérience réalisée en pots dans le chapitre 4 n'est pas complètement représentative des conditions du terrain (structure du sol modifiée, volume limité, pathogènes différents et absence d'herbivores), ce qui implique d'être prudent dans l'extrapolation de ses résultats. Par ailleurs, l'approche par essais de terrain des autres chapitres constitue selon nous un des atouts majeurs de cette thèse, mais elle n'est évidemment pas parfaite. Les parcelles expérimentales utilisées étaient ainsi toutes d'assez petite taille, en moyenne 4-5 m<sup>2</sup>, avec des effets de bord possibles et une végétation environnante parfois abondante. Ces conditions, bien que mises en place sur le terrain, sont différentes d'une mise en œuvre réelle sur des parcelles de plusieurs ares. Cela complique notamment l'extrapolation de nos expériences en termes de besoins techniques et de main d'œuvre. Par ailleurs, des variables tels que l'exposition des parcelles ou les paramètres biologiques du sol n'ont jamais été mesurées alors qu'elles influencent la croissance des plantes. Les sols utilisés dans nos expériences avaient un pH généralement alcalin, souvent entre 7 et 8, ce qui diminue la disponibilité des ETM, et diminue donc très probablement l'efficacité d'extraction. Les résultats de ce travail sous-estiment donc peut-être l'extraction

possible sur des sols à pH plus acide. Enfin, l'utilisation de seulement deux populations contrastées en termes d'origine climatique (tempérée et méditerranéenne) et édaphique (non-métallifère et calaminaire) rend compliquée une généralisation des résultats obtenus à l'ensemble des populations de *N. caerulescens*.

## 4. Perspectives de recherche

### • *Influence de la croissance racinaire sur l'accumulation*

Un point négligé en général, et dans ce travail de thèse également, est l'importance du système racinaire, de sa morphologie et de son comportement dans l'efficacité d'extraction des ETM. C'est un thème de recherche qui pourrait se révéler au moins aussi important que l'étude des mécanismes moléculaires de transport et d'accumulation des ETM, qui a pour l'instant monopolisé l'attention des chercheurs (Robinson *et al.* 2009). L'exploration du sol par les racines pourrait être le facteur limitant surtout dans des sols à relativement faible disponibilité en métaux (sols à contamination modérée). Des expériences de taille ou de greffe de racines ont ainsi permis de montrer que ce sont les racines – via l'absorption et le chargement du xylème – plutôt que les parties aériennes qui contrôlent l'accumulation du Cd et du Zn chez *N. caerulescens* (Guimarães *et al.* 2009, Sterckeman *et al.* 2015). Dans ce travail de thèse, nous avons suggéré à plusieurs reprises – sans pouvoir le démontrer formellement – que la stimulation de la biomasse aérienne ne doit pas se faire au détriment de la croissance racinaire, au risque d'uniquement diluer les ETM dans la plante. Le meilleur exemple est l'augmentation de production de biomasse aérienne avec des teneurs élevées en  $\text{NO}_3^-$  et en matière organique dans le sol dans le chapitre 4. Alors que cette stimulation est accompagnée d'une dilution des concentrations avec  $\text{NO}_3^-$ , ce n'est pas le cas avec la matière organique, suggérant un impact différent des deux variables sur le rapport *shoot-root*. L'intensité d'arrosage pourrait également être un facteur influençant le développement racinaire. Nous soutenons qu'affiner la compréhension de l'influence du rapport *shoot-root* sur l'accumulation est une voie de recherche à privilégier et que ce paramètre pourrait être central dans le processus de sélection de cultivars.

### • *Itinéraires techniques*

Une pratique qui vaudrait la peine d'être testée est celle de l'*intercropping*, c'est-à-dire de la culture associée de *N. caerulescens* avec une ou plusieurs autres espèces hyperaccumulatrices ou non (Li *et al.* 2012). Les avantages potentiels d'une telle pratique seraient d'agir à différentes profondeurs, d'offrir une meilleure résistance aux herbivores et aux pathogènes, d'agir sur plus d'ETM, de diminuer les concentrations en métaux dans une plante à haute biomasse en co-culture, ou d'en limiter leur toxicité (Fuksova *et al.* 2009, Gove *et al.* 2002). Jiang *et al.* (2010) ont par exemple montré que la co-culture en pots de *N. caerulescens* avec

du raygrass (*Lolium perenne*) stimulait la croissance de *N. caerulescens* et permettait d'extraire autant de Cd qu'en monoculture (avec deux fois moins de plantes). D'un point de vue fondamental, cela pourrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes de facilitation pour l'accumulation des ETM et des processus rhizosphériques de solubilisation. En parallèle, la rotation avec d'autres plantes hyperaccumulatrices ou non, comme des légumineuses, est aussi une pratique qui pourrait être étudiée pour minimiser l'incidence de maladies et de ravageurs et maintenir la fertilité.

- **Sélection de cultivars**

Comme abordé dans le premier point de cette discussion, des essais de sélection de cultivars de *N. caerulescens* sur le terrain devraient être menés dans le but de diminuer la variabilité et d'augmenter les rendements d'extraction, en visant la sélection de cultivars à haut rendement, à cycle bisannuel et à résistance accrue aux pathogènes. Une telle approche pourrait cependant être limitée par la prépondérance des effets environnementaux sur les effets génétiques.

- **Approche combinée pour les poly-contaminations**

De nombreux sites contaminés présentent des contaminations multiples, avec d'autres éléments traces (ex. : Cu, Pb) mais aussi des polluants organiques comme les HAP. D'une part, ils peuvent influencer l'extraction des ETM visés (chapitre 4) et inhiber la croissance de *N. caerulescens* comme c'est le cas pour les HAP (Sirguy et Ouvrard, 2013). Zelko *et al.* (2017) ont montré que le phénanthrène (un HAP commun) causait de fortes réductions de la biomasse racinaire et aérienne de *N. caerulescens*, via une architecture modifiée (inhibition de l'élongation racinaire, et des poils absorbants) (symptômes similaires à un manque d'eau). Sur un site comme Masui (MAS), la présence d'HAP est une explication potentielle à la mauvaise croissance des plantes. D'autre part, la poly-contamination requiert le développement d'approches combinant plusieurs espèces végétales ou associant plantes et microorganismes (voir synthèse de Batty et Dolan, 2013).

- **Montée en échelle, plusieurs années, plusieurs sites**

Enfin, des essais de plein champ de plus grande envergure (la superficie cultivée dans toutes les études étant de moins de 100 m<sup>2</sup>) sur plusieurs types de sol devraient permettre d'obtenir des taux réels d'extraction des ETM pour plusieurs années successives et sans doute de découvrir de nouvelles maladies et ravageurs ainsi que d'autres nouvelles surprises.



---

# Conclusion

---

Le développement de la phytoextraction comme technique écologique de décontamination des sols a été freiné à la fois par le décalage entre les résultats très prometteurs des expériences en milieu contrôlé et les résultats mitigés des premiers essais de terrain, mais aussi par le nombre restreint de ces derniers. Ce travail démontre que les essais de terrain ont cependant tout leur intérêt pour évaluer réellement le potentiel de la technique, mais également pour mettre en évidence l'importance de certains paramètres environnementaux tels que les niveaux de contamination, les conditions édaphiques ou encore l'influence des herbivores ou des pathogènes.

Nous avons pu identifier plusieurs paramètres de culture qui conditionnent l'efficacité de phytoextraction du Cd et du Zn avec la plante hyperaccumulatrice *Noccaea caerulescens*. Au-delà des variations d'accumulation des ETM, nous avons ainsi démontré l'importance de la variabilité entre populations en termes de cycles de vie et de résistance aux ravageurs et pathogènes. D'autre part, il apparaît que le cycle de vie, annuel ou bisannuel, est déterminant pour la vitesse de croissance de l'espèce, sa production de biomasse, et pour le choix du cycle de culture adéquat. Bien que l'accumulation des ETM ne soit pas constante au cours d'une saison de culture sur des sols modérément contaminés, il a été montré que des cycles de culture longs mis en place à l'automne ou au printemps et poursuivis durant tout l'été ont un meilleur rendement d'extraction. Le développement de cultivars performants pour la phytoextraction semble être la voie de recherche à privilégier pour augmenter les rendements d'extraction et améliorer la prévisibilité de la technique. Une faible héritabilité du trait de production de biomasse pourrait cependant compliquer ce processus.

Au cours de cette thèse, nous avons pu constater un intérêt certain du citoyen et du monde politique pour l'émergence de nouvelles techniques écologiques de remédiation telles que la phytoextraction. Ces attentes ont parfois dû être tempérées par le fait que la technique nécessitait encore la levée de contraintes techniques et des exemples probants de réussite. Au vu des quantités d'ETM extraites après une saison de culture – jusqu'à 10 - 18 % du Cd total et 5 - 10 % du Zn total – la phytoextraction du Cd avec *N. caerulescens* a le potentiel pour être une technique de décontamination adéquate pour les sols modérément contaminés. Ce potentiel nécessite toutefois d'être confirmé par des essais à grande échelle et à long terme qui pourraient constituer une valeur d'exemple et de référence afin de convaincre des organismes publics ou privés d'adopter la technique.

---

# Bibliographie

---

- Adriano, D.C., 2001. Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability and Risk of Metals. Springer-Verlag, New York.
- Alloway, B.J. (Ed.), 2013. Heavy Metals in Soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability, Environ. Pollut. Springer Netherlands.
- Álvarez-López, V., Prieto-Fernández, Á., Cabello-Conejo, M.I., Kidd, P.S., 2016. Organic amendments for improving biomass production and metal yield of Ni-hyperaccumulating plants. Sci. Total Environ. 548-549, 370-379.
- Andersson, A., Bingenfors, S., 1985. Trends and annual variations in Cd concentrations in grain of winter wheat. Acta Agriculturae Scandinavica 35, 339-344.
- Antonovics, J., Bradshaw, A.D., Turner, R.G., 1971. Heavy metal tolerance in plants. Advances in Ecological Research 7, 85.
- Arnamwong, S., Wu, L., Hu, P., Yuan, C., Thiravetyan, P., Luo, Y., Christie, P., 2015. Phytoextraction of cadmium and zinc by *Sedum plumbizincicola* using different nitrogen fertilizers, a nitrification inhibitor and a urease inhibitor. Int. J. Phytoremediation 17, 382-390.
- Assunção, A.G.L., Martins, P.D.C., De Folter, S., Vooijs, R., Schat, H., Aarts, M.G.M., 2001. Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Plant, Cell Environ. 24, 217-226.
- Assunção, A.G., Schat, H., Aarts, M.G., 2003a. *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. New Phytol. 159, 351-360.
- Assunção, A.G., Bookum, W.M., Nelissen, H.J., Vooijs, R., Schat, H., Ernst, W.H., 2003b. Differential metal-specific tolerance and accumulation patterns among *Thlaspi caerulescens* populations originating from different soil types. New Phytol. 159, 411-419.
- Azimi, S., Ludwig, A., Thévenot, D. R., Colin, J. L., 2003. Trace metal determination in total atmospheric deposition in rural and urban areas. Sci. Total Environ. 308, 247-256.
- Azimi, S., Rocher, V., Muller, M., Moilleron, R., Thevenot, D.R., 2005. Sources, distribution and variability of hydrocarbons and metals in atmospheric deposition in an urban area (Paris, France). Sci. Total Environ. 337, 223-239.
- Baize, D., 2009. Cadmium in soils and cereal grains after sewage-sludge application on French soils. A review. Agronomy for sustainable development 29, 175-184.
- Baker, A., 1981. Accumulators and excluders - strategies in the response of plants to heavy metals. Journal of Plant Nutrition 3, 643-654.
- Baker A.J.M., McGrath S.P., Sidoli C.M.D., Reeves R.D. 1994; The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. Resour. Conserv. Recycl 11, 41-49.
- Balsberg Pahlsson, A.-M. 1989. Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. Water Air Soil Pollut. 47, 287-319.
- Barrutia, O., Epelde, L., García-Plazaola, J.I., Garbisu, C., Becerril, J.M., 2009. Phytoextraction potential of two *Rumex acetosa* L. accessions collected from metalliferous and non-metalliferous sites:

- Effect of fertilization. *Chemosphere* 74, 259-264.
- Basic, N., Keller, C., Fontanillas, P., Vittoz, P., Besnard, G., Galland, N., 2006. Cadmium hyperaccumulation and reproductive traits in natural *Thlaspi caerulescens* populations. *Plant Biology* 8, 64-72.
- Batty, L.C., Dolan, C., 2013. The potential use of phytoremediation for sites with mixed organic and inorganic contamination. *Critical reviews in environmental science and technology* 43, 217-259.
- Beesley, L., Moreno-Jiménez, E., Gomez-Eyles, J.L., 2010. Effects of biochar and greenwaste compost amendments on mobility, bioavailability and toxicity of inorganic and organic contaminants in a multi-element polluted soil. *Environ. Pollut.* 158, 2282–2287.
- Bennett, F.A., Tyler, E.K., Brooks, R.R., Gregg, P.E.H., Stewart, R.B., 1998. Fertilization of hyperaccumulators to enhance their potential for phytoremediation and phytomining. In *Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals*. Ed. R.R. Brooks. CAB International, Wallingford.
- Bert, V., Hadj-Sahraoui, A., Leyval, C., Fontaine, J., Ouvrard, S., 2012. *Les phytotechnologies appliquées aux sites et sols pollués*. EDP Sciences. Paris. ADEME, INERIS.
- Bert, V., Douay, F., Faure, O., Cadière, F., 2017a. *Les phytotechnologies appliquées aux sites et sols pollués (nouveaux résultats de recherche et démonstration)*. ADEME, INERIS, ISA-Lille, Mines Saint-Etienne.
- Bert, V., Neub, S., Zdanevitch, I., Friesl-Hanl, W., Collet, S., Gaucher, R., *et al.* 2017b. How to manage plant biomass originated from phytotechnologies? Gathering perceptions from end-users. *Int. J. Phytoremediation* 19, 947-954.
- Besnard, G., Basic, N., Christin, P.A., Savova-Bianchi, D., Galland, N., 2009. *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae) population genetics in western Switzerland: is the genetic structure affected by natural variation of soil heavy metal concentrations? *New Phytol.* 181, 974-984.
- Boyd, R.S., Martens, S.N., 1992. The raison d'être for metal hyperaccumulation by plants. The vegetation of ultramafic (serpentine) soils, 279-289.
- Broadhurst, C.L., Chaney, R.L., Davis, A.P., Cox, A., Kumar, K., Reeves, R.D., Green, C.E., 2015. Growth and cadmium phytoextraction by Swiss chard, maize, rice, *Noccaea caerulescens*, and *Alyssum murale* in pH adjusted biosolids amended soils. *Int. J. Phytoremediation* 17, 25-39.
- Brooks, R.R., Lee, J., Reeves, R.D., Jaffré, T., 1977. Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *Journal of Geochemical Exploration* 7, 49-57.
- Brown, S.L., Chaney, R.L., Angle, J.S., Baker, A.J.M., 1995. Zinc and cadmium uptake by hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and metal tolerant *Silene vulgaris* grown on sludge-amended soils. *Environ. Sci. Technol.* 29, 1581–1585.
- Brussels Government, 2009. Arrêté du Gouvernement de la Région de Bruxelles-Capitale déterminant les normes d'intervention et les normes d'assainissement, 17 décembre 2009.
- Bruxelles Environnement, 2018. Les données de l'IBGE « Affectation et pollution du sol ». Collection Fiches documentées, Thème : Sols.
- Bulluck, L.R., Brosius, M., Evanylo, G.K., Ristaino, J.B., 2002. Organic and synthetic fertility amendments influence soil

- microbial, physical and chemical properties on organic and conventional farms. *Appl. Soil Ecol.* 19, 147–160.
- Burnham, K.P., Anderson, D.R., 2002. *Model selection and multimodel inference*. Springer.
- Calcagno, V., de Mazancourt, C., 2010. glmulti: an R package for easy automated model selection with (generalized) linear models. *J. Stat. Softw.* 34, 1-29.
- Callahan, D.L., Baker, A.J., Kolev, S.D., Wedd, A.G., 2006. Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 11, 2-12.
- Cao, R.X., Ma, L.Q., Chen, M., Singh, S.P., Harris, W.G., 2003. Phosphate-induced metal immobilization in a contaminated site. *Environ. Pollut.* 122, 19–28.
- Chaney, R.L., Malik, M., Li, Y.M., Brown, S.L., Brewer, E.P., Angle, J.S., Baker, A.J., 1997. Phytoremediation of soil metals. *Curr. Opin. in Biotech.* 8, 279-284.
- Chaney, R.L., Angle, J.S., Broadhurst, C.L., Peters, C.A., Tappero, R.V., Sparks, D.L., 2007. Improved understanding of hyperaccumulation yields commercial phytoextraction and phytomining technologies. *J. Environ. Qual.* 36, 1429-1443.
- Chaney, R.L., Baker, A.J., Morel, J.L., 2018. The long road to developing agromining/phytomining. In *Agromining: Farming for Metals*, Springer, Cham.
- Chardot, V., Echevarria, G., Gury, M., Massoura, S., Morel, J.L., 2007. Nickel bioavailability in an ultramafic toposequence in the Vosges Mountains (France). *Plant Soil* 293, 7–21.
- Chen, Y., Li, X., Shen, Z., 2004. Leaching and uptake of heavy metals by ten different species of plants during an EDTA-assisted phytoextraction process. *Chemosphere* 57, 187-196.
- Cheng, M., Wang, P., Kopittke, P.M., Wang, A., Sale, P.W.G., Tang, C., 2016. Cadmium accumulation is enhanced by ammonium compared to nitrate in two hyperaccumulators, without affecting speciation. *J. Exp. Bot.* 67, 5041-5050.
- Clemens, S., Aarts, M.G., Thomine, S., Verbruggen, N., 2013. Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends in plant science* 18, 92-99.
- Cooper, E.M., Sims, J.T., Cunningham, S. D., Huang, J.W., Berti, W.R., 1999. Chelate-assisted phytoextraction of lead from contaminated soils. *J. Environ. Qual.* 28, 1709-1719.
- Conesa, H. M., Evangelou, M. W., Robinson, B. H., Schulin, R., 2012. A critical view of current state of phytotechnologies to remediate soils: still a promising tool? *The Scientific World Journal*, 2012.
- Cottenie, A., Camerlynck, R., Verloo, M., Dhaese, A., 1979. Fractionation and determination of trace elements in plants, soils and sediments. *Pure Appl. Chem* 52, 43–53.
- Craciun, A. R., Meyer, C. L., Chen, J., Roosens, N., De Groodt, R., Hilson, P., Verbruggen, N., 2012. Variation in HMA4 gene copy number and expression among *Noccaea caerulea* populations presenting different levels of Cd tolerance and accumulation. *J. Exp. Bot.* 63, 4179-4189.
- Cundy, A.B., Bardos, R.P., Puschenreiter, M., Mench, M., Bert, V., Friesl-Hanl, W., *et al.* 2016. Brownfields to green fields: Realising wider benefits from practical contaminant phytomanagement strategies, *J. Environ. Management* 184, 67-77.
- Cunningham, S. D., Ow, D. W., 1996. Promises and prospects of

- phytoremediation. *Plant physiology* 110, 715.
- Cuypers, A., Remans, T., Weyens, N., Colpaert, J., Vassilev, A., Vangronsveld, J. 2013. Soil-plant relationships of heavy metals and metalloids. In: Alloway B. (eds) *Heavy Metals in Soils*. Environ. Pollut. vol 22. Springer, Dordrecht
- Dechamps, C., Roosens, N.H., Hotte, C., Meerts, P., 2005. Growth and mineral element composition in two ecotypes of *Thlaspi caerulescens* on Cd contaminated soil. *Plant Soil* 273, 327–335.
- Dechamps, C., Lefebvre, C., Noret, N., Meerts, P., 2007. Reaction norms of life history traits in response to zinc in *Thlaspi caerulescens* from metalliferous and nonmetalliferous sites. *New Phytol.* 173, 191–198.
- Dechamps, C., Noret, N., Mozek, R., Draye, X., Meerts, P., 2008. Root allocation in metal-rich patch by *Thlaspi caerulescens* from normal and metalliferous soil - New insights into the rhizobox approach. *Plant Soil* 310, 211–224.
- Dechamps, C., Elvinger, N., Meerts, P., Lefebvre, C., Escarré, J., Colling, G., Noret, N., 2011. Life history traits of the pseudometallophyte *Thlaspi caerulescens* in natural populations from Northern Europe. *Plant Biol.* 13, 125–135.
- Degryse, F., Smolders, E., Parker, D. R. 2009. Partitioning of metals (Cd, Co, Cu, Ni, Pb, Zn) in soils: concepts, methodologies, prediction and applications—a review. *European Journal of Soil Science* 60, 590-612.
- Delplanque, M., Collet, S., Del Gratta, F., Schnuriger, B., Gaucher, R., Robinson, B., Bert, V., 2013. Combustion of *Salix* used for phytoextraction: the fate of metals and viability of the processes. *Biomass and bioenergy* 49, 160-170.
- Deng, L., Li, Z., Wang, J., Liu, H., Li, N., Wu, L., *et al.* 2016. Long-term field phytoextraction of zinc/cadmium contaminated soil by *Sedum plumbizincicola* under different agronomic strategies. *Int. J. Phytoremediation* 18, 134-140.
- Dessureault-Rompré, J., Luster, J., Schulin, R., Tercier-Waeber, M.L., Nowack, B., 2010. Decrease of labile Zn and Cd in the rhizosphere of hyperaccumulating *Thlaspi caerulescens* with time. *Environ. Pollut.* 158, 1955-1962.
- De Vries, W., Groenenberg, J.E., Lofts, S., Tipping, E., Posch, M., 2013. Critical loads of heavy metals for soils. In: Alloway B. (eds) *Heavy Metals in Soils*. Environ. Pollut. vol 22. Springer, Dordrecht.
- Deyris, P.A., Bert, V., Diliberto, S., Boulanger, C., Petit, E., Legrand, Y.M., Grison, C., 2018. Biosourced polymetallic catalysis: A surprising and efficient means to promote the Knoevenagel condensation. *Frontiers in chemistry* 6, 48.
- Dickinson, N.M., Pulford, I.D., 2005. Cadmium phytoextraction using short rotation coppice *Salix*: The evidence trail. *Environ. Int.*, 31, 609–613.
- Dickinson, N.M., Baker, A.J.M., Doronila, A., Laidlaw, S., Reeves, R.D., 2009. Phytoremediation of Inorganics: Realism and Synergies. *Int. J. Phytoremediation* 11, 97–114.
- Dubois, S., Cheptou, P.O., Petit, C., Meerts, P., Poncet, M., Vekemans, X., *et al.* 2003. Genetic structure and mating systems of metallicolous and nonmetallicolous populations of *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol.* 157, 633-641.
- Dubois, S., 2005. Etude d'un réseau de populations métallicoles et non-métallicoles de *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae). Structure génétique, démographie et pressions de sélection.

- Thèse de Doctorat, Université Montpellier II – Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2012. Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA J.* 10, 2551
- Ernst, W.H.O., Schat, H., Verkleij, J.A.C., 1990. Evolutionary biology of metal resistance in *Silene vulgaris*. *Evol. Trends Plants* 4:45–51.
- Ernst, W.H., 2006. Evolution of metal tolerance in higher plants. *For. Snow. Landsc. Res.* 80, 251-274.
- Escandé, V., Olszewski, T.K., Grison, C., 2014. Preparation of ecological catalysts derived from Zn hyperaccumulating plants and their catalytic activity in Diels–Alder reaction. *Comptes Rendus Chimie* 17, 731-737.
- Escarré, J., Lefèbvre, C., Gruber, W., Leblanc, M., Lepart, J., Rivière, Y., Delay, B., 2000. Zinc and cadmium hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens* from metalliferous and nonmetalliferous sites in the Mediterranean area: implications for phytoremediation. *New Phytol.* 145, 429–437.
- Escarré, J., Lefèbvre, C., Raboyeau, S., Dossantos A., Gruber W., Cleyet-Marel J.C., *et al.* 2011. Heavy metal concentration survey in soils and plants of the Les Malines mining district (Southern France): Implications for soil restoration. *Water Air Soil Pollut.* 216:485–504.
- Escarré, J., Lefèbvre, C., Frérot, H., Mahieu, S., Noret, N., 2013. Metal concentration and metal mass of metallicolous, non metallicolous and serpentine *Noccaea caerulescens* populations, cultivated in different growth media. *Plant Soil* 370, 197-221.
- Evangelou, M.W., Ebel, M., Schaeffer, A., 2007. Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. *Chemosphere* 68, 989-1003.
- Evangelou, M.W.H., Conesa, H.M., Robinson, B.H., Schulin, R., 2012. Biomass Production on Trace Element – Contaminated Land: A Review. *Environ. Eng. Sci.* 29, 823–839.
- Felix, H., 1997. Field trials for in situ decontamination of heavy metal polluted soils using crops of metal-accumulating plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 160, 525-529.
- Finster, M.E., Gray, K.A., Binns, H.J., 2004. Lead levels of edibles grown in contaminated residential soils: a field survey. *Sci. Total Environ.* 320, 245–257.
- Fischerová, Z., Tlustoš, P., Száková, J., Šichorová, K., 2006. A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. *Environ. Pollut.* 144, 93-100.
- Fones, H., Davis, C. A., Rico, A., Fang, F., Smith, J.A.C., Preston, G.M., 2010. Metal hyperaccumulation armors plants against disease. *PLoS pathogens* 6, e1001093.
- Fones, H.N., Eyles, C.J., Bennett, M.H., Smith, J.A.C., Preston, G.M. 2013. Uncoupling of reactive oxygen species accumulation and defence signalling in the metal hyperaccumulator plant *Noccaea caerulescens*. *New Phytol.* 199, 916-924.
- Fox, J., Weisberg, S., Bates, D., *et al.* 2011. Package 'car'.
- Frérot, H., Petit, C., Lefèbvre, C., Gruber, W., Collin, C., Escarré, J., 2003. Zinc and cadmium accumulation in controlled crosses between metallicolous and nonmetallicolous populations of *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae). *New Phytol.* 157, 643-648.
- Fuksová, Z., Száková, J., Tlustoš, P., 2009. Effects of co-cropping on bioaccumulation

- of trace elements in *Thlaspi caerulescens* and *Salix dasyclados*. Plant soil environ 55, 461-467.
- Garbisu, C., Alkorta, I., 2001. Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. Bioresource technology 77, 229-236.
- Geosan, 2013. Reconnaissance de l'état du sol, études détaillées et études de risque conjointes, GEOSAN SA, Ref. GERB12844 and GRES12.13189.
- Gérard, E., Echevarria, G., Sterckeman, T., Morel, J.L., 2000. Cadmium availability to three plant species varying in cadmium accumulation pattern. J. Environ. Qual. 29, 1117-1123.
- Gerhardt, K.E., Gerwing, P.D., Greenberg, B.M. 2017. Opinion: Taking phytoremediation from proven technology to accepted practice. Plant science 256, 170-185.
- Gonneau, C., Genevois, N., Frérot, H., Sirguey, C., Sterckeman, T., 2014. Variation of trace metal accumulation, major nutrient uptake and growth parameters and their correlations in 22 populations of *Noccaea caerulescens*. Plant Soil 384, 271-287.
- Gonneau, C., Noret, N., Godé, C., Frérot, H., Sirguey, C., Sterckeman, T., Pauwels, M., 2017. Demographic history of the trace metal hyperaccumulator *Noccaea caerulescens* (J. Presl and C. Presl) FK Mey. in Western Europe. Molecular Ecology 26, 904-922.
- Gove, B., Hutchinson, J.J., Young, S.D., Craigon, J., McGrath, S.P., 2002. Uptake of metals by plants sharing a rhizosphere with the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Int. J. Phytoremediation 4, 267-281.
- Graitson, E., 2005. Inventaire et caractérisation des sites calaminaires en Région wallonne. Natura Mosana 58, 83-124.
- Grömping, U., 2006. Relative Importance for Linear Regression in R: The Package relaimpo. J. Stat. Softw. 17, 1-27.
- Guimarães, M.D., Gustin, J.L., Salt, D.E., 2009. Reciprocal grafting separates the roles of the root and shoot in zinc hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. New Phytol. 184, 323-329.
- Gustin, J.L., Loureiro, M.E., Kim, D., Na, G., Tikhonova, M., Salt, D.E., 2009. MTP1-dependent Zn sequestration into shoot vacuole's suggests dual roles in Zn tolerance and accumulation in Zn hyperaccumulating plants. Plant J. 57, 1116-1127.
- Halimaa, P., Lin, Y.F., Ahonen, V.H., Blande, D., Clemens, S., Gyenesei, A., et al. 2014. Gene expression differences between *Noccaea caerulescens* ecotypes help to identify candidate genes for metal phytoremediation. Environ. Sci. Tech. 48, 3344-3353.
- Hammer, D., Keller, C., 2002. Changes in the rhizosphere of metal-accumulating plants evidenced by chemical extractants. J. Environ Qual. 31, 1561-1569.
- Hammer, D., Keller, C., 2003. Phytoextraction of Cd and Zn with *Thlaspi caerulescens* in field trials. Soil Use Manag. 19, 144-149.
- Hammer, D., Keller, C., McLaughlin, M.J., Hamon, R.E., 2006. Fixation of metals in soil constituents and potential remobilization by hyperaccumulating and non-hyperaccumulating plants: Results from an isotopic dilution study. Environ. Pollut. 143, 407-415.
- Hamon, R.E., McLaughlin, M.J., 1999. Use of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* for bioavailable contaminant stripping, in: Wenzel, W.W., Adriano, D.C., Alloway, B.J., Doner, H., Keller, C.,

- Lepp, N.W. (Eds.), Extended Abstracts of the Fifth International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements (ICOBTE).
- Hanikenne, M., Nouet, C., 2011. Metal hyperaccumulation and hypertolérance: a model for plant evolutionary genomics. *Curr. Opin. in Plant Biol.* 14, 252–259.
- Harris, J.A., Birch, P., 1988. The effect of zeolite on the toxicity of lead to fungi. *Environ. Pollut.* 49, 235–241.
- Haydon, M.J., Cobbett, C.S., 2007. Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytol.* 174, 499–506.
- Hazotte, C., Laubie, B., Rees, F., Morel, J.L., Simonnot, M.O., 2017. A novel process to recover cadmium and zinc from the hyperaccumulator plant *Noccaea caerulescens*. *Hydrometallurgy* 174, 56–65.
- Herzig, R., Nehnevajova, E., Pfister, C., Schwitzguebel, J. P., Ricci, A., Keller, C., 2014. Feasibility of labile Zn phytoextraction using enhanced tobacco and sunflower: results of five-and one-year field-scale experiments in Switzerland. *Int. J. Phytoremediation* 16, 735–754.
- Hess, L., De Kroon, H., 2007. Effects of rooting volume and nutrient availability as an alternative explanation for root self/non-self discrimination. *J. Ecol.* 95, 241–251.
- Hodge, A., 2004. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytol.* 162, 9–24.
- Hodson, M.E., 2013. Effects of heavy metals and metalloids on soil organisms. In: Alloway B. (eds) *Heavy Metals in Soils*. *Environ. Pollut.* vol 22. Springer, Dordrecht.
- Hooda, P. (Ed.), 2010. *Trace elements in soils*. John Wiley & Sons.
- Hörger, A.C., Fones, H.N., Preston, G., 2013. The current status of the elemental defense hypothesis in relation to pathogens. *Frontiers in plant science* 4, 395.
- Hough, R.L., Breward, N., Young, S.D., Crout, N.M.J., Tye, A.M., Moir, A.M., Thornton, I., 2004. Assessing potential risk of heavy metal exposure from consumption of home-produced vegetables by urban populations. *Environ. Health Perspect.* 112, 215–221.
- Hsiao, K.H., Kao, P.H., Hseu, Z.Y., 2007. Effects of chelators on chromium and nickel uptake by *Brassica juncea* on serpentine-mine tailings for phytoextraction. *J. Hazard. Mater.* 148, 366.
- Huang, J.W., Chen, J.J., Berti, W.R., Cunningham, S.D. 1997. Phytoremediation of lead contaminated soils: Role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environ. Sci. Technol.* 31, 800–805.
- Hutchinson, J.J., Young, S.D., McGrath, S.P., West, H.M., Black, C.R., Baker, A.J. M., 2000. Determining uptake of 'non-labile' soil cadmium by *Thlaspi caerulescens* using isotopic dilution techniques. *New Phytol.* 146, 453–460.
- Imperato, M., Adamo, P., Naimo, D., Arienzo, M., Stanzone, D., Violante, P., 2003. Spatial distribution of heavy metals in urban soils of Naples city (Italy). *Environ. Pollut.* 124, 247–256.
- ISO 2007. Norm 23470:2007 Soil quality - Determination of effective cation exchange capacity (CEC) and exchangeable cations using a hexamminecobalt trichloride solution.
- Jacobs, A., Drouet, T., Sterckeman, T., Noret, N., 2017. Phytoremediation of urban soils contaminated with trace metals using *Noccaea caerulescens*: comparing non-metallicolous populations to the metallicolous 'Ganges' in field trials. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 8176–8188.



- Jacobs, A., De Brabandere, L., Drouet, T., Sterckeman, T., Noret, N., 2018a. Phytoextraction of Cd and Zn with *Noccaea caerulescens* for urban soil remediation: influence of nitrogen fertilization and planting density. *Ecol. Eng.* 116, 178-187.
- Jacobs, A., Drouet, T., Noret, N., 2018b. Field evaluation of cultural cycles for improved cadmium and zinc phytoextraction with *Noccaea caerulescens*. *Plant Soil*, 430, 381–394.
- Järup, L., 2003. Hazards of heavy metal contamination. *British medical bulletin*, 68, 167-182.
- Järup, L., Åkesson, A., 2009. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicology and applied pharmacology* 238, 201-208.
- Ji, P., Sun, T., Song, Y., Ackland, M.L., Liu, Y., 2011. Strategies for enhancing the phytoremediation of cadmiumcontaminated agricultural soils by *Solanum nigrum* L. *Environ. Pollut.* 159, 762–768.
- Jiang, C.A., Wu, Q.T., Sterckeman, T., Schwartz, C., Sirguey, C., Ouyard, S., *et al.* 2010. Co-planting can phytoextract similar amounts of cadmium and zinc to monocropping from contaminated soils. *Ecol. Eng.* 36, 391-395.
- Jiménez-Ambroz, G., Petit, C., Bourrié, I., Dubois, S., Olivieri, I., Ronce, O., 2007. Life history variation in the heavy metal tolerant plant *Thlaspi caerulescens* growing in a network of contaminated and noncontaminated sites in southern France: role of gene flow, selection and phenotypic plasticity. *New Phytol.* 173, 199–215.
- Joimel, S., Cortet, J., Jolivet, C.C., Saby, N.P.A., Chenot, E.D., Branchu, P., *et al.* 2016. Physico-chemical characteristics of topsoil for contrasted forest, agricultural, urban and industrial land uses in France. *Sci. Total Environ.* 545-546, 40-47.
- Jones, K. C., Symon, C. J., Johnston, A. E., 1987. Retrospective analysis of an archived soil collection II. Cadmium. *Sci. Total Environ.* 67, 75-89.
- Jonker, M.J., Piskiewicz, A.M., Castellà, N. I. I., Kammenga, J.E., 2004. Toxicity of binary mixtures of cadmium-copper and carbendazim-copper to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 1529-1537.
- Kabata-Pendias, A., Mukherjee, A.B., 2007. Trace elements from soil to human. Springer Science & Business Media.
- Kabata-Pendias, A., 2010. Trace elements in soils and plants. CRC press.
- Kachenko, A.G., Singh, B., 2006. Heavy metals contamination in vegetables grown in urban and metal smelter contaminated sites in Australia. *Water Air Soil Pollut.* 169, 101–123.
- Kayser, A., Wenger, K., Keller, A., Attinger, W., Felix, H. R., Gupta, S. K., Schulin, R., 2000. Enhancement of phytoextraction of Zn, Cd, and Cu from calcareous soil: the use of NTA and sulfur amendments. *Environ. Sci. Tech.* 34, 1778-1783.
- Keller, C., Hammer, D., Kayser, A., Richner, W., Brodbeck, M., Sennhauser, M., 2003. Root development and heavy metal phytoextraction efficiency: comparison of different plant species in the field. *Plant Soil* 249, 67-81.
- Keller, C., Hammer, D., 2004. Metal availability and soil toxicity after repeated croppings of *Thlaspi caerulescens* in metal contaminated soils. *Environ. Pollut.* 131, 243–254.
- Keller, C., Ludwig, C., Davoli, F., Wochele, J., 2005. Thermal treatment of metal-enriched biomass produced from heavy

- metal phytoextraction. *Environ. Sci. Tech.* 39, 3359-3367.
- Keller, C., 2006. Factors Limiting Efficiency of Phytoextraction at Multi-Metal Contaminated Sites. In *Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils*. Springer.
- Kidd, P., Mench, M., Álvarez-López, V., Bert, V., Dimitriou, I., Friesl-Hanl, W., *et al.* 2015. Agronomic practices for improving gentle remediation of trace element-contaminated soils. *Int. J. Phytoremediation* 17, 1005-1037.
- Knight, B., Zhao, F.J., McGrath, S.P., Shen, Z.G., 1997. Zinc and cadmium uptake by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* in contaminated soils and its effects on the concentration and chemical speciation of metals in soil solution. *Plant Soil* 197, 71-78.
- Knox, A.S., Erdinger, A.P., Adriano, D.C., Kolka, R.K., Kaplan, D.I., 1999. Source and practices contributing to soil contamination. In: Adriano, D.C., Bollag J.M., Frenkerberger W.T., Sims R.C. (eds) *Bioremediation of contaminated soils*. Am Soc Agron, Madison, WI;
- Koch, M. A., German, D., 2013. Taxonomy and systematics are key to biological information: *Arabidopsis*, *Eutrema* (Thellungiella), *Noccaea* and *Schrenkiella* (Brassicaceae) as examples. *Frontiers in plant science* 4, 267.
- Koopmans, G.F., Römkens, P.F.A.M., Fokkema, M.J., Song, J., Luo, Y.M., Japenga, J., Zhao, F.J., 2008. Feasibility of phytoextraction to remediate cadmium and zinc contaminated soils. *Environ. Pollut.* 156, 905-914.
- Kozhevnikova, A. D., Seregin, I. V., Erlikh, N. T., Shevyreva, T. A., Andreev, I. M., Verweij, R., Schat, H., 2014. Histidine-mediated xylem loading of zinc is a species-wide character in *Noccaea caerulescens*. *New Phytol.* 203, 508-519.
- Kratz, S., Schick, J., Schnug, E., 2016. Trace elements in rock phosphates and P containing mineral and organo-mineral fertilizers sold in Germany. *Sci. Total Environ.* 542, 1013-1019.
- Krämer, U., 2010. Metal hyperaccumulation in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 517-34.
- Kruskal, W., 1987. Relative Importance by Averaging Over Orderings. *Am. Stat.* 41, 6-10.
- Kumpiene, J., Lagerkvist, A., Maurice, C., 2008. Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments – A review. *Waste Manag.* 28, 215-225.
- Kumpiene, J., Giagnoni, L., Marschner, B., Denys, S., Mench, M., Adriaensen, K., *et al.* 2017. Assessment of methods for determining bioavailability of trace elements in soils: A review. *Pedosphere* 27, 389-406.
- Lasat, M.M., Baker, A.J., Kochian, L.V., 1996. Physiological characterization of root Zn<sup>2+</sup> absorption and translocation to shoots in Zn hyperaccumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. *Plant physiology* 112, 1715-1722.
- Lebourg, A., Sterckeman, T., Ciesielski, H., Proix, N., 1996. Intérêt de différents réactifs d'extraction chimique pour l'évaluation de la biodisponibilité des métaux en traces du sol. *Agronomie* 16, 201-215.
- Li, X., Poon, C., Liu, P.S., 2001. Heavy metal contamination of urban soils and street dusts in Hong Kong. *Appl. Geochemistry* 16, 1361-1368.
- Li, J.T., Liao, B., Dai, Z.Y., Zhu, R., Shu, W.S., 2009. Phytoextraction of Cd-contaminated soil by *Carambola* (*Averrhoa*

- carambola*) in field trials. *Chemosphere* 76, 1233-1239.
- Li, J.-T., Baker, A.J.M., Ye, Z.-H., Wang, H.-B., Shu, W.-S., 2012. Phytoextraction of Cd-Contaminated Soils: Current Status and Future Challenges. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 42, 2113–2152.
- Li, Z., Wu, L., Hu, P., Luo, Y., Zhang, H., Christie, P., 2014. Repeated phytoextraction of four metal-contaminated soils using the cadmium/zinc hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola*. *Environ. Pollut.* 189, 176–183.
- Li, Z., Jia, M., Wu, L., Christie, P., Luo, Y., 2016. Changes in metal availability, desorption kinetics and speciation in contaminated soils during repeated phytoextraction with the Zn/Cd hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola*. *Environ. Pollut.* 209, 123-131.
- Li, Z., Wu, L., Luo, Y., Christie, P., 2018. Changes in metal mobility assessed by EDTA kinetic extraction in three polluted soils after repeated phytoremediation using a cadmium/zinc hyperaccumulator. *Chemosphere* 194, 432-440.
- Lin, Z., Schneider, A., Nguyen, C., Sterckeman, T., 2014. Can ligand addition to soil enhance Cd phytoextraction? A mechanistic model study. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 12811–12826.
- Lin, Y. F., Hassan, Z., Talukdar, S., Schat, H., Aarts, M. G., 2016. Expression of the ZNT1 zinc transporter from the metal hyperaccumulator *Noccaea caerulescens* confers enhanced zinc and cadmium tolerance and accumulation to *Arabidopsis thaliana*. *PloS one* 11, e0149750.
- Liu, L., Li, W., Song, W., Guo, M., 2018. Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils: principles and applicability. *Sci. Total Environ.* 633, 206-219.
- Lochlainn, S.Ó., Bowen, H.C., Fray, R.G., Hammond, J.P., King, G.J., White, P.J., *et al.* 2011. Tandem quadruplication of HMA4 in the zinc (Zn) and cadmium (Cd) hyperaccumulator *Noccaea caerulescens*. *PloS one*, 6, e17814.
- Lock, K., Janssen, C.R., 2002. Mixture toxicity of zinc, cadmium, copper, and lead to the potworm *Enchytraeus albidus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 52, 1-7.
- Lombi, E., Zhao, F.J., Dunham, S.J., McGrath, S.P., 2000. Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense*. *New Phytol.* 145, 11–20.
- Lombi, E., Zhao, F.J., McGrath, S.P., Young, S.D., Sacchi, G.A., 2001a. Physiological evidence for a high-affinity cadmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype. *New Phytol.* 149, 53–60.
- Lombi, E., Zhao, F.J., Dunham, S.J., McGrath, S.P., 2001b. Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: Natural Hyperaccumulation versus Chemically Enhanced Phytoextraction. *J. Environ Qual.* 30, 1919-1926.
- Lombi, E., Tearall, K.L., Howarth, J.R., Zhao, F.J., Hawkesford, M.J., McGrath, S.P., 2002. Influence of iron status on cadmium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology* 128, 1359-1367.
- López-Bucio, J., Cruz-Ramirez, A., Herrera-Estrella, L., 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. in Plant Biol.* 6, 280-287.
- Losfeld, G., Escande, V., de La Blache, P.V., L'Huillier, L., Grison, C., 2012.

- Design and performance of supported Lewis acid catalysts derived from metal contaminated biomass for Friedel–Crafts alkylation and acylation. *Catalysis today* 189, 111-116.
- Lovy, L., 2012. Hyperaccumulation du cadmium par *Noccaea caerulescens* : cinétique, répartition et prédiction. Thèse de Doctorat, Université de Lorraine, Nancy, France.
- Lovy, L., Latt, D., Sterckeman, T., 2013. Cadmium uptake and partitioning in the hyperaccumulator *Noccaea caerulescens* exposed to constant Cd concentrations throughout complete growth cycles. *Plant Soil* 362, 345–354.
- Luzuriaga, A. L., Escudero, A., Pérez-García, F., 2006. Environmental maternal effects on seed morphology and germination in *Sinapis arvensis* (Cruciferae). *Weed research* 46, 163-174.
- Macnair, M.R., 2003. The hyperaccumulation of metals by plants. *Advances in Botanical Research* 40, 63-105.
- Macnicol, R.D., Beckett, P.H.T., 1985. Critical tissue concentrations of potentially toxic elements. *Plant Soil* 85, 107–129.
- Martínez-Alcalá, I., Bernal, M.P., de la Fuente, C., Gondar, D., Clemente, R., 2016. Changes in the heavy metal solubility of two contaminated soils after heavy metals phytoextraction with *Noccaea caerulescens*. *Ecol. Eng.* 89, 56-63.
- Maxted, A.P., Black, C.R., West, H.M., Crout, N.M.J., McGrath, S.P., Young, S.D., 2007. Phytoextraction of cadmium and zinc from arable soils amended with sewage sludge using *Thlaspi caerulescens*: Development of a predictive model. *Environ. Pollut.* 150, 363–372.
- McCarty, L.S., Borgert, C.J., 2006. Review of the toxicity of chemical mixtures: theory, policy, and regulatory practice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 45, 119-143.
- McGrath, S.P., Sidoli, C.M.D., Baker, A.J. M., Reeves, R.D., 1993. The potential for the use of metal-accumulating plants for the in situ decontamination of metal-polluted soils. In: Eijackers, H.J.P., Hamers, T. (eds) *Integrated soil and sediment research: a basis for proper protection*. Kluwer Academic, Dordrecht, 673-676.
- McGrath, S.P., Dunham, S.J., Correll, R.L., 2000. Potential for phytoextraction of zinc and cadmium from soils using hyperaccumulator plants. In: Terry, N., Bañuelos, G. (eds) *Phytoremediation of contaminated soil and water*. CRC Press, Boca Raton, FL, 109–128.
- McGrath, S.P., Zhao, F.J., Lombi, E., 2001. Plant and rhizosphere processes involved in phytoextraction of metal-contaminated soils. *Plant Soil*, 232, 207-214.
- McGrath, S.P., Lombi, E., Gray, C.W., Caille, N., Dunham, S.J., Zhao, F.J., 2006. Field evaluation of Cd and Zn phytoextraction potential by the hyperaccumulators *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri*. *Environ. Pollut.* 141, 115–125.
- McLaughlin, M.J., Zarcinas, B.A., Stevens, D.P., Cook, N., 2000. Soil testing for heavy metals. *Communications in Soil Science & Plant Analysis* 31, 1661-1700.
- McLaughlin, M. J., Smolders, E., Degryse, F., Rietra, R., 2011. Uptake of metals from soil into vegetables. In *Dealing with contaminated sites*. Springer, Dordrecht.
- Meers, E., Ruttens, A., Hopgood, M., Lesage, E., Tack, F. M. G., 2005. Potential of *Brassica rapa*, *Cannabis sativa*, *Helianthus annuus* and *Zea mays* for phytoextraction of heavy metals from

- calcareous dredged sediment derived soils. *Chemosphere* 61, 561-572.
- Meers, E., Samson, R., Tack, F.M.G., Ruttens, A., Vandegheuchte, M., Vangronsveld, J., Verloo, M.G., 2007. Phytoavailability assessment of heavy metals in soils by single extractions and accumulation by *Phaseolus vulgaris*. *Environ. Exp. Bot.* 60, 385-396.
- Meerts, P., van Isacker, N., 1997. Heavy metal tolerance and accumulation in metalicolous and nonmetalicolous populations of *Thlaspi caerulescens* from continental Europe. *Plant Ecol.* 133, 221–231.
- Meerts, P., Grommesch, C., 2001. Soil seed banks in a heavy-metal polluted grassland at Prayon (Belgium). *Plant Ecol.* 155, 35-45.
- Mench, M., Lepp, N., Bert, V., Schwitzguébel, J.P., Gawronski, S.W., Schröder, P., Vangronsveld, J., 2010. Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: Outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *J. Soils Sediments* 10, 1039–1070.
- Merlot, S., de la Torre, V.S.G., Hanikenne, M., 2018. Physiology and molecular biology of trace element hyperaccumulation. In *Agromining: Farming for Metals*. Springer, Cham.
- Meuser, H., 2010. Contaminated Urban Soils, Environmental Pollution. Springer Netherlands.
- Meyer, F.K., 1973. Conspectus der “*Thlaspi*”-Arten Europas, Afrikas und Vorderasiens. *Feddes Repert.* 84, 449–470.
- Meyer, F.K., 1979. Kritische Revision der “*Thlaspi*”- Arten Europas, Afrikas und Vorderasiens, I.Geschichte, Morphologie und Chorologie. *Feddes Repert.* 90,129–154.
- Meyer, F.K., 2006. Kritische Revision der “*Thlaspi*”- Arten Europas, Afrikas und Vorderasiens. Spezieller Teil; IX. *Noccaea Moench*. *Hausknechtia Suppl.* 12.
- Milner, M.J., Kochian, L.V., 2008. Investigating heavy-metal hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a model system. *Ann. Bot.*, 102, 3-13.
- Mishra, S., Mishra, A., Küpper, H., 2017. Protein Biochemistry and Expression Regulation of Cadmium/Zinc Pumping ATPases in the Hyperaccumulator Plants *Arabidopsis halleri* and *Noccaea caerulescens*. *Frontiers in plant science* 8, 835.
- Molitor, M., Dechamps, C., Gruber, W., Meerts, P., 2005. *Thlaspi caerulescens* on nonmetalliferous soil in Luxembourg: ecological niche and genetic variation in mineral element composition. *New Phytol.* 165, 503–512.
- Mortvedt, J.J., 1996. Heavy metal contaminants in inorganic and organic fertilizers. In *Fertilizers and Environment*. Springer, Dordrecht.
- Monsant, A.C., Tang, C., Baker, A.J.M., 2008. The effect of nitrogen form on rhizosphere soil pH and zinc phytoextraction by *Thlaspi caerulescens*. *Chemosphere* 73, 635–642.
- Monsant, A.C., Wang, Y., Tang, C., 2010. Nitrate nutrition enhances zinc hyperaccumulation in *Noccaea caerulescens* (Prayon). *Plant Soil* 336, 391–404.
- Morel, J.L. 2012. La phytoremédiation des sols contaminés: des plantes pour guérir les sols. EDP Sciences, Collection Chimie et Nature.
- Morris, E.C., Griffiths, M., Golebiowska, A., Mairhofer, S., Burr-Hersey, J., Goh, T., et al. 2017. Shaping 3D root system architecture. *Curr. Biol.*, 27, 919-930.

- Mousset, M., David, P., Petit, C., Pouzadoux, J., Hatt, C., Flaven, E., *et al.* 2016. Lower selfing rates in metalicolous populations than in non-metallicolous populations of the pseudometallophyte *Noccaea caerulescens* (Brassicaceae) in Southern France. *Annals of botany* 117, 507-519.
- Murakami, M., Nakagawa, F., Ae, N., Ito, M., Arao, T., 2009. Phytoextraction by rice capable of accumulating Cd at high levels: reduction of Cd content of rice grain. *Environ. Sci. Tech.* 43, 5878-5883.
- Naimi, B., Hamm, N.A.S., Groen, T.A., Skidmore, A.K., Toxopeus, A.G., 2014. Where is positional uncertainty a problem for species distribution modelling? *Ecography* 37, 191-203.
- Ngu, M., Moya, E., Magan, N., 1998. Tolerance and uptake of cadmium, arsenic and lead by *Fusarium* pathogens of cereals. *International biodeterioration & biodegradation* 42, 55-62.
- Nicholson, F.A., Smith, S.R., Alloway, B.J., Carlton-Smith, C., Chambers, B.J., 2003. An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales. *Sci. Total Environ.* 311, 205-219.
- Niu, M., Wei, S., Bai, J., Wang, S., Ji, D., 2015. Remediation and safe production of Cd contaminated soil via multiple cropping hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and low accumulation Chinese cabbage. *Int. J. Phytoremediation* 17, 657-661.
- Noret, N., Meerts, P., Tolrà, R., Poschenrieder, C., Barceló, J., Escarré, J., 2005. Palatability of *Thlaspi caerulescens* for snails: influence of zinc and glucosinolates. *New Phytol.* 165, 763-772.
- Noret, N., Meerts, P., Vanhaelen, M., Dos Santos, A., Escarré, J., 2007. Do metal-rich plants deter herbivores? A field test of the defence hypothesis. *Oecologia* 152, 92-100.
- Nowack, B., Schulin R, Robinson, BH, 2006. Critical assessment of chelant-enhanced metal phytoextraction. *Environ. Sci. Technol.* 40:5225-5232.
- Nriagu, J.O., 1983. Occupational exposure to lead in ancient times. *Sci. Total Environ.* 31, 105-116.
- Nti Nkruma, P., Baker, A.J.M., Chaney, R.L., Erskine, P.D., Echevarria, G., Morel, J.L., van der Ent, A., 2016. Current status and challenges in developing nickel phytomining : an agronomic perspective. *Plant Soil* 406, 55-69.
- Nziguheba, G., Smolders, E., 2008. Inputs of trace elements in agricultural soils via phosphate fertilizers in European countries. *Sci. Total Environ.* 390, 53-57.
- Pacyna, E.G., Pacyna, J.M., Fudala, J., Strzelecka-Jastrzab, E., Hlawiczka, S., Panasiuk, D. *et al.* 2007. Current and future emissions of selected heavy metals to the atmosphere from anthropogenic sources in Europe. *Atmospheric Environment* 41, 8557-8566.
- Pansu, M., Gautheyrou, J., 2006. *Handbook of Soil Analysis - Mineralogical, Organic and Inorganic Methods.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Peer, W.A., Mamoudian, M., Lahner, B., Reeves, R.D., Murphy, A.S., Salt, D.E., 2003. Identifying model metal hyperaccumulating plants: germplasm analysis of 20 Brassicaceae accessions from a wide geographical area. *New Phytol.* 159, 421-430.
- Peer, W.A., Mahmoudian, M., Freeman, J.L., Lahner, B., Richards, E.L., Reeves, R.D., *et al.* 2006. Assessment of plants from the Brassicaceae family as genetic models for the study of nickel and zinc hyperaccumulation. *New Phytol.* 172, 248-260.

- Peijnenburg, W.J., Zablotskaja, M., Vijver, M. G., 2007. Monitoring metals in terrestrial environments within a bioavailability framework and a focus on soil extraction. *Ecotox. Environ. Safety* 67, 163-179.
- Pence, N.S., Larsen, P.B., Ebbs, S.D., Letham, D.L., Lasat, M.M., Garvin, D.F., *et al.* 2000. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 4956-4960.
- Pereira, B., Titeux, H., Schneider, A., Sonnet, Ph., Gesels, J., Dollé, F. *et al.* 2012. Rapport Final du Projet Pollusol 2. SPAQuE, UCL, ULg-GxABT.
- Perronnet, K., Schwartz, C., Gérard, E., Morel, J.L., 2000. Availability of cadmium and zinc accumulated in the leaves of *Thlaspi caerulescens* incorporated into soil. *Plant Soil* 227, 257-263.
- Perronnet, K., Schwartz, C., Morel, J.L., 2003. Distribution of cadmium and zinc in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* grown on multicontaminated soil. *Plant Soil* 249, 19-25.
- Pollard, A. J., Baker, A. J., 1996. Quantitative genetics of zinc hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist* 132, 113-118.
- Pollard, A. J., Baker, A. J., 1997. Deterrence of herbivory by zinc hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae). *New Phytol.* 135, 655-658.
- Pollard, A.J., Powell, K.D., Harper, F.A., Smith, J.A.C., 2002. The genetic basis of metal hyperaccumulation in plants. *Critical reviews in plant sciences* 21, 539-566.
- Pollard, A.J., Reeves, R.D., Baker, A.J., 2014. Facultative hyperaccumulation of heavy metals and metalloids. *Plant Science* 217, 8-17.
- Pongrac, P., Zhao, F.J., Razinger, J., Zrimec, A., Regvar, M., 2009. Physiological responses to Cd and Zn in two Cd/Zn hyperaccumulating *Thlaspi* species. *Environ. Exp. Bot.* 66, 479-486.
- Pulford, I.D., Watson, C., 2003. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees—a review. *Environment international* 29, 529-540.
- Quartacci, M.F., Irtelli, B., Baker, A.J.M., and Navari-Izzo, F., 2007. The use of NTA and EDDS for enhanced phytoextraction of metals from a multiply contaminated soil by *Brassica carinata*. *Chemosphere* 68, 1920.
- R Development Core Team 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Raskin, I., Smith, R.D., Salt, D.E., 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Curr. Opin. in Biotech.* 8, 221-226.
- Rees, F., 2014. Mobilité des métaux dans les systèmes sol-plante-biochar. Thèse de Doctorat, Université de Lorraine, Nancy, France.
- Rees, F., Germain, C., Sterckeman, T., Morel, J.L., 2015. Plant growth and metal uptake by a non-hyperaccumulating species (*Lolium perenne*) and a Cd-Zn hyperaccumulator (*Noccaea caerulescens*) in contaminated soils amended with biochar. *Plant Soil* 395, 57-73.
- Rees, F., Sterckeman, T., Morel, J.L., 2016. Root development of non-accumulating and hyperaccumulating plants in metal-contaminated soils amended with biochar. *Chemosphere* 142, 48-55.

- Reeves, R.D., Schwartz, C., Morel, J.L., Edmondson, J., 2001. Distribution and Metal-Accumulating Behavior of *Thlaspi caerulescens* and Associated Metallophytes in France. *Int. J. Phytoremediation* 3, 145–172.
- Reeves, R.D., Baker, A.J., Jaffré, T., Erskine, P. D., Echevarria, G., van der Ent, A., 2018. A global database for plants that hyperaccumulate metal and metalloid trace elements. *New Phytol.* 218, 407-411.
- Riley, R., 1956. The influence of the breeding system on the genecology of *Thlaspi alpestre* L. *New Phytol.* 55, 319-330.
- Roach, D. A., Wulff, R. D., 1987. Maternal effects in plants. *Annual review of ecology and systematics* 18, 209-235.
- Robinson, B.H., Leblanc, M., Petit, D., Brooks, R.R., Kirkman, J.H., Gregg, P.E.H., 1998. The potential of *Thlaspi caerulescens* for phytoremediation of contaminated soils. *Plant Soil* 203, 47–56.
- Robinson, B.H., Schulin, R., Nowack, B., Roulier, S., Menon, M., Clothier, B.E., *et al.* 2006. Phytoremediation for the management of metal flux in contaminated sites. *For. Snow Landsc. Res.* 80, 221–234.
- Robinson, B.H., Bañuelos, G., Conesa, H.M., Evangelou, M.W., Schulin, R., 2009. The phytomanagement of trace elements in soil. *Critical Reviews in Plant Sciences* 28, 240-266.
- Römken, P., Bouwman, L., Japenga, J., Draaisma, C., 2002. Potentials and drawbacks of chelate-enhanced phytoremediation of soils. *Environ. Pollut.* 116, 109-121.
- Roosens, N., Verbruggen, N., Meerts, P., Ximénez-Embún, P., Smith, J.A.C., 2003. Natural variation in cadmium tolerance and its relationship to metal hyperaccumulation for seven populations of *Thlaspi caerulescens* from western Europe. *Plant, Cell Environ.* 26, 1657-1672.
- Robinson, B.H., Anderson, C.W.N., Dickinson, N.M., 2015. Phytoextraction: Where's the action? *J. Geochemical Explor.* 151, 34–40.
- Rosenfeld, C.E., Chaney, R.L., Martínez, C.E., 2018. Soil geochemical factors regulate Cd accumulation by metal hyperaccumulating *Noccaea caerulescens* (J. Presl & C. Presl) FK Mey in field-contaminated soils. *Sci. Total Environ.* 616, 279-287.
- Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, N.P., Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chet, I., Raskin, I., 1995. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Nature biotechnology* 13, 468.
- Salt, D.E., Prince, R.C., Baker, A.J., Raskin, I., Pickering, I.J., 1999. Zinc ligands in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy. *Environ. Sci. Tech.* 33, 713-717.
- Säumel, I., Kotsyuk, I., Hölscher, M., Lenkerei, C., Weber, F., Kowarik, I., 2012. How healthy is urban horticulture in high traffic areas? Trace metal concentrations in vegetable crops from plantings within inner city neighbourhoods in Berlin, Germany. *Environ. Pollut.* 165, 124–132.
- Sauve, S., Hendershot, W., Allen, H.E., 2000. Solid-solution partitioning of metals in contaminated soils: dependence on pH, total metal burden, and organic matter. *Environ. Sci. Tech.* 34, 1125-1131.
- Schaidler, L.A., Senn, D.B., Brabander, D.J., McCarthy, K.D., Shine, J.P., 2007. Characterization of zinc, lead, and cadmium in mine waste: Implications for transport, exposure, and bioavailability. *Environ. Sci. Tech.* 41, 4164-4171.



- Schneider, A., Nguyen, C., 2011. Use of an exchange method to estimate the association and dissociation rate constants of cadmium complexes formed with low-molecular-weight organic acids commonly exuded by plant roots. *J. Environ. Qual.* 40, 1857–1862.
- Schneider, T., Persson, D. P., Husted, S., Schellenberg, M., Gehrig, P., Lee, Y., *et al.* 2013. A proteomics approach to investigate the process of Zn hyperaccumulation in *Noccaea caerulescens* (J & C. Presl) FK Meyer. *The plant journal* 73, 131-142.
- Schwartz, C., 1997. Phytoextraction des métaux des sols pollués par la plante hyperaccumulatrice *Thlaspi caerulescens*. Thèse de doctorat, INPL, Nancy, France.
- Schwartz, C., Guimont, S., Saison, C., Perronnet, K., Morel, J.L., 2001. Phytoextraction of Cd and Zn by the hyperaccumulator plant *Thlaspi caerulescens* as affected by plant size and origin. *South African journal of science* 97, 561-564.
- Schwartz, C., Echevarria, G., Morel, J.L., 2003. Phytoextraction of cadmium with *Thlaspi caerulescens*. *Plant Soil* 249, 27–35.
- Schwartz, C., Sirguey, C., Peronny, S., Reeves, R.D., Bourgaud, F., Morel, J.L., 2006. Testing of outstanding individuals of *Thlaspi caerulescens* for cadmium phytoextraction. *Int. J. Phytoremediation* 8, 339–357.
- Shen, Z.G., Zhao, F.J., McGrath, S.P., 1997. Uptake and transport of zinc in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and the non-hyperaccumulator *Thlaspi ochroleucum*. *Plant, Cell Environ.* 20, 898-906.
- Simmons, R.W., Chaney, R.L., Angle, J.S., Kruatrachue, M., Klinphoklap, S., Reeves, R.D., Bellamy, P., 2015. Towards practical cadmium phytoextraction with *Noccaea caerulescens*. *Int. J. Phytoremediation* 17, 191–199.
- Simon-Delso, N., San Martin, G., Bruneau, E., Delcourt, C., Hautier, L., 2017. The challenges of predicting pesticide exposure of honey bees at landscape level. *Scientific reports* 7, 3801.
- Simonnot, M. O., Vaughan, J., Laubie, B. 2018. Processing of Bio-ore to Products. In *Agromining: Farming for Metals*. Springer, Cham.
- Sirguey, C., Schwartz, C., Morel, J.-L., 2006. Response of *Thlaspi caerulescens* to Nitrogen, Phosphorus and Sulfur Fertilisation. *Int. J. Phytoremediation* 8, 149–161.
- Sirguey, C., Ouvrard, S., 2013. Contaminated soils salinity, a threat for phytoextraction? *Chemosphere* 91, 269-274.
- Sirguey, C., Seznec, G., Mahevas, T., Echevarria, G., Gonneau, C., Sterckeman, T., 2018. Soil trace metal content does not affect the distribution of the hyperaccumulator *Noccaea caerulescens* in the Vosges Mountains (France). *Plant Soil* 430, 245–262.
- Six, L., Smolders, E., 2014. Future trends in soil cadmium concentration under current cadmium fluxes to European agricultural soils. *Sci. Total Environ.* 485, 319-328.
- Smolders, E., Mertens, J., 2013. Cadmium. In: Alloway B. (eds) *Heavy Metals in Soils*. *Environ. Pollut.* vol 22. Springer, Dordrecht
- Smolders, E., Oorts, K., Van Sprang, P., Schoeters, I., Janssen, C. R., McGrath, S. P., McLaughlin, M. J., 2009. Toxicity of trace metals in soil as affected by soil type and aging after contamination: using calibrated bioavailability models to set

- ecological soil standards. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 1633-1642.
- Steinnes, E., 2013. Zinc. In: Alloway B. (eds) *Heavy Metals in Soils*. *Environ. Pollut.* vol 22. Springer, Dordrecht
- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., Fourrier, H. 2000. Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. *Environmental Pollution* 107, 377-389.
- Sterckeman, T., Perriguet, J., Caël, M., Schwartz, C., Morel, J.L., 2004. Applying a mechanistic model to cadmium uptake by *Zea mays* and *Thlaspi caerulescens*: Consequences for the assessment of the soil quantity and capacity factors. *Plant Soil* 262, 289-302.
- Sterckeman, T., Goderniaux, M., Sirguey, C., Cornu, J.Y., Nguyen, C., 2015. Do roots or shoots control cadmium accumulation in the hyperaccumulator *Noccaea caerulescens*? *Plant Soil* 392, 87-99.
- Sterckeman, T., Cazes, Y., Gonneau, C., Sirguey, C., 2017. Phenotyping 60 populations of *Noccaea caerulescens* provides a broader knowledge of variation in traits of interest for phytoextraction. *Plant Soil*, in press.
- Sterckeman, T., Puschenreiter, M., 2018. Phytoextraction of Cadmium: Feasibility in Field Applications and Potential Use of Harvested Biomass. In *Agromining: Farming for Metals, Mineral Resource Reviews*. Springer, Cham.
- Sterckeman, T., Gossiaux, L., Guimont, S., Sirguey, C., Lin, Z., 2018. Cadmium mass balance in French soils under annual crops: Scenarios for the next century. *Sci. Total Environ.* 639, 1440-1452.
- Tack, F.M., 2010. Trace elements: general soil chemistry, principles and processes. *Trace elements in soils*, 31-59.
- Tang, Y.T., Deng, T.H.B., Wu, Q.H., Wang, S.Z., Qiu, R.L., Wei, Z.B., *et al.* 2012. Designing cropping systems for metal-contaminated sites: a review. *Pedosphere* 22, 470-488.
- Thawornchaisit, U., Polprasert, C., 2009. Evaluation of phosphate fertilizers for the stabilization of cadmium in highly contaminated soils. *J. Hazard. Mater.* 165, 1109-1113.
- Tlustoš, P., Břendová, K., Száková, J., Najmanová, J., Koubová, K., 2016. The long-term variation of Cd and Zn hyperaccumulation by *Noccaea* spp and *Arabidopsis halleri* plants in both pot and field conditions. *Int. J. Phytoremediation* 18, 110-115.
- Tolrà, R.P., Poschenrieder, C., Barceló, J., 1996. Zinc hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. I. Influence on growth and mineral nutrition. *Journal of plant nutrition*, 19, 1531-1540.
- Ullah, A., Heng, S., Munis, M. F. H., Fahad, S., Yang, X., 2015. Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: a review. *Environ. Exp. Bot.* 117, 28-40.
- Van der Ent, A., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Pollard, A.J., Schat, H., 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. *Plant Soil* 362, 319-334.
- Van Der Ent, A., Baker, A. J., Reeves, R. D., Chaney, R. L., Anderson, C. W., Meech, J. A., *et al.* 2015. Agromining: farming for metals in the future? *Environ. Sci. Technol.* 49, 4773-4780.
- Van Liedekerke, M., Prokop, G., Rabl-Berger, S., Kibblewhite, M., Louwagie, G., 2014. Progress in the Management of Contaminated Sites in Europe. European Commission, Joint Research Centre, Institute for Environment and Sustainability.

- Van Nevel, L., Mertens, J., Oorts, K., Verheyen, K., 2007. Phytoextraction of metals from soils: how far from practice? *Environ. Pollut.* 150, 34-40.
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., *et al.* 2009. Phyto remediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16, 765-794.
- Vassilev, A., Schwitzguébel, J. P., Thewys, T., Van Der Lelie, D., Vangronsveld, J., 2004. The use of plants for remediation of metal-contaminated soils. *The Scientific World Journal* 4, 9-34.
- Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H., 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytol.* 181, 759-776.
- Walker, D.J., Bernal, M.P., 2004. The effects of copper and lead on growth and zinc accumulation of *Thlaspi caerulescens* J. and C. Presl: implications for phytoremediation of contaminated soils. *Water Air Soil Pollut.* 151, 361-372.
- Walters, D.R., Bingham, I.J., 2007. Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens: implications for plant disease control. *Ann. of App. Biology* 151, 307-324.
- Wang, X., Sato, T., Xing, B., Tao, S., 2005. Health risks of heavy metals to the general public in Tianjin, China via consumption of vegetables and fish. *Sci. Total Environ.* 350, 28-37.
- Wang, A.S., Angle, J.S., Chaney, R.L., Delorme, T.A., Reeves, R.D., 2006. Soil pH effects on uptake of Cd and Zn by *Thlaspi caerulescens*. *Plant Soil* 281, 325-337.
- Wang, S., Wei, S., Ji, D., Bai, J., 2015. Co-planting Cd contaminated field using hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. through interplant with low accumulation Welsh onion. *Int. J. Phytoremediation* 17, 879-884.
- Wedepohl, K. H., 1995. The composition of the continental crust. *Geochimica et cosmochimica Acta* 59, 1217-1232.
- Wei, S., Zhou, Q., Wang, X., Zhang, K., Guo, G., Ma, L.Q., 2005. A newly-discovered Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Chin. Sci. Bull.* 50, 33-38
- Wei, S., Li, Y., Zhou, Q., Srivastava, M., Chiu, S., Zhan, J., *et al.* 2010. Effect of fertilizer amendments on phytoremediation of Cd-contaminated soil by a newly discovered hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *J. Hazard. Mater.* 176, 269-273.
- Weyens, N., van der Lelie, D., Taghavi, S., Newman, L., Vangronsveld, J., 2009. Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. *Trends Biotechnol.* 27, 591-598.
- White-Monsant, A.C., Tang, C., 2013. Organic acids are not specifically involved in the nitrate-enhanced Zn hyperaccumulation mechanism in *Noccaea caerulescens*. *Environ. Exp. Bot.* 91, 12-21.
- Whiting, S.N., Leake, J.R., McGrath, S.P., Baker, A.J.M., 2000. Positive responses to Zn and Cd by roots of the Zn and Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol.* 145, 199-210.
- Wong, C.S.C., Li, X., Thornton, I., 2006. Urban environmental geochemistry of trace metals. *Environ. Pollut.* 142, 1-16.
- Wu, Q.T., Wei, Z.B., Ouyang, Y., 2007. Phytoextraction of metal-contaminated soil by *Sedum alfredii* H: effects of chelator and co-planting. *Water Air Soil. Pollut.* 180, 131-139
- Xie, H.L., Jiang, R.F., Zhang, F.S., McGrath, S.P., Zhao, F.J., 2009. Effect of

- nitrogen form on the rhizosphere dynamics and uptake of cadmium and zinc by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Soil* 318, 205–215.
- Yanai, J., Zhao, F.J., McGrath, S.P., Kosaki, T., 2006. Effect of soil characteristics on Cd uptake by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Environ. Pollut.* 139, 167–175.
- Yang, X.E., Long, X.X., Ye, H.B., He, Z.L., Calvert, D.V., Stoffella, P.J., 2004. Cadmium tolerance and hyperaccumulation in a new Zn-hyperaccumulating plant species (*Sedum alfredii* Hance). *Plant Soil* 259, 181–189.
- Yang, Y., Ge, Y., Zeng, H., Zhou, X., Peng, L., Zeng, Q., 2017. Phytoextraction of cadmium-contaminated soil and potential of regenerated tobacco biomass for recovery of cadmium. *Scientific reports* 7, 7210.
- Young, S. D., 2013. Chemistry of heavy metals and metalloids in soils. In: Alloway B. (eds) *Heavy Metals in Soils*. *Environ. Pollut.* vol 22. Springer, Dordrecht.
- Zelko, I., Ouvrard, S., Sirguy, C., 2017. Roots alterations in presence of phenanthrene may limit co-remediation implementation with *Nocca caerulescens*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 19653-19661.
- Zhao, F.J., Hamon, R.E., McLaughlin, M.J., 2001. Root exudates of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* do not enhance metal mobilization. *New Phytol.* 151,613–620.
- Zhao, F.J., Hamon, R.E., Lombi, E., McLaughlin, M.J., McGrath, S.P., 2002. Characteristics of cadmium uptake in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J. Exp. Bot.* 53, 535-543.
- Zhao, F.J., Lombi, E., McGrath, S.P., 2003. Assessing the potential for zinc and cadmium phytoremediation with the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Soil* 249, 37–43.
- Zhuang, P., Yang, Q., Wang H., Shu, W. 2007. Phytoextraction of heavy metals by eight plant species in the field. *Water Air Soil. Pollut.* 184, 235–242.

# Annexes

## 1. Annexes au chapitre 1

**Table S1.** Analysis of variance of dry biomass production of three populations of *N. caerulea* (one calamine, Ganges, and two nonmetallicolous, Wilwerwiltz and Goebelsmühle) grown on three treatments (control soil, fertilizer, compost) in two experimental sites (Gare Royale and Masui). For each factor and interactions, the number of degrees of freedom (d.f.), mean square (MS), F value and level of significance associated (\*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*,  $P < 0.05$ ; ·,  $P < 0.1$ ; ns, not significant) are given.

		Total biomass			Individual biomass		
		d.f.	MS	F	d.f.	MS	F
Site GARE ROYALE	Population	2	4.55	21.82 ***	2	2.09	11.88 **
	Treatment	2	0.14	0.67 <sup>ns</sup>	2	0.32	1.82 <sup>ns</sup>
	Block	3	2.29	10.95 ***	3	0.69	3.92 *
	Pop. × Treat.	4	1.08	5.17 *	4	0.15	0.83 <sup>ns</sup>
	Pop. × Block	6	0.62	2.95 ·	6	0.30	1.72 <sup>ns</sup>
	Treat. × Block	6	0.67	3.23 *	6	0.42	2.40 ·
	Residuals	12	0.21		12	0.18	
Site MASUI	Population	2	0.38	1.81 <sup>ns</sup>	2	0.34	3.12 ·
	Treatment	2	0.03	0.13 <sup>ns</sup>	2	0.04	0.40 <sup>ns</sup>
	Block	3	0.74	3.54 ·	3	1.25	11.52 **
	Pop. × Treat.	4	0.45	2.15 <sup>ns</sup>	4	0.2	1.81 <sup>ns</sup>
	Pop. × Block	6	0.64	3.08 ·	6	0.22	2.03 <sup>ns</sup>
	Treat. × Block	6	0.37	1.76 <sup>ns</sup>	6	0.25	2.3 <sup>ns</sup>
	Residuals	11	0.21		11	0.11	

**Table S2.** ANOVA results of soil trace metals concentrations (total and ammonium acetate-EDTA extraction) among soil treatments (Treat.: control soil, fertilizer, compost) and blocks at two experimental sites (Gare Royale, GR and Masui, MAS). For each factor and interaction,  $F_{df}^{ls}$  is presented where  $F$  is the F-statistic value,  $df$  the number of degrees of freedom and  $ls$  the level of significance associated (\*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*,  $P < 0.05$ ; ·,  $P < 0.1$ ; ns, not significant), the number of degrees of freedom of residuals is also given.

		Cd		Cu		Ni		Pb		Zn	
		Total	Ac. EDTA	Total	Ac. EDTA	Total	Ac. EDTA	Total	Ac. EDTA	Total	Ac. EDTA
GR	Treat.	0.22 <sub>2</sub> <sup>ns</sup>	19.8 <sub>2</sub> <sup>***</sup>	6.13 <sub>2</sub> <sup>*</sup>	29.5 <sub>2</sub> <sup>***</sup>	7.87 <sub>2</sub> <sup>*</sup>	20.0 <sub>2</sub> <sup>***</sup>	4.83 <sub>2</sub> <sup>·</sup>	43.6 <sub>2</sub> <sup>***</sup>	3.25 <sub>2</sub> <sup>ns</sup>	6.86 <sub>2</sub> <sup>**</sup>
	Block	15.5 <sub>3</sub> <sup>**</sup>	119 <sub>3</sub> <sup>***</sup>	114 <sub>3</sub> <sup>***</sup>	113 <sub>3</sub> <sup>***</sup>	93.2 <sub>3</sub> <sup>***</sup>	13.4 <sub>3</sub> <sup>***</sup>	39.8 <sub>3</sub> <sup>***</sup>	322 <sub>3</sub> <sup>***</sup>	19.7 <sub>3</sub> <sup>**</sup>	26.3 <sub>3</sub> <sup>***</sup>
	Treat. × Block	/	0.28 <sub>6</sub> <sup>ns</sup>	/	2.06 <sub>6</sub> <sup>·</sup>	/	1.53 <sub>6</sub> <sup>ns</sup>	/	1.54 <sub>6</sub> <sup>ns</sup>	/	0.82 <sub>6</sub> <sup>ns</sup>
	Residuals	6	36	6	36	6	36	6	36	6	36
MAS	Treat.	1.26 <sub>2</sub> <sup>ns</sup>	8.49 <sub>2</sub> <sup>***</sup>	1.68 <sub>2</sub> <sup>ns</sup>	7.14 <sub>2</sub> <sup>**</sup>	4.58 <sub>2</sub> <sup>·</sup>	7.30 <sub>2</sub> <sup>**</sup>	4.52 <sub>2</sub> <sup>·</sup>	10.1 <sub>2</sub> <sup>***</sup>	12.3 <sub>2</sub> <sup>**</sup>	5.24 <sub>2</sub> <sup>*</sup>
	Block	4.38 <sub>3</sub> <sup>·</sup>	10.6 <sub>3</sub> <sup>***</sup>	2.18 <sub>3</sub> <sup>ns</sup>	0.29 <sub>3</sub> <sup>ns</sup>	3.17 <sub>3</sub> <sup>ns</sup>	29.8 <sub>3</sub> <sup>***</sup>	6.22 <sub>3</sub> <sup>*</sup>	15.6 <sub>3</sub> <sup>***</sup>	17.0 <sub>3</sub> <sup>**</sup>	28.7 <sub>3</sub> <sup>***</sup>
	Treat. × Block	/	1.38 <sub>6</sub> <sup>ns</sup>	/	1.42 <sub>6</sub> <sup>ns</sup>	/	0.79 <sub>6</sub> <sup>ns</sup>	/	1.87 <sub>6</sub> <sup>ns</sup>	/	0.86 <sub>6</sub> <sup>ns</sup>
	Residuals	6	36	6	36	6	36	6	36	6	36

**Table S3.** ANOVA results of soil fertility parameters among treatments (Treat.: control soil, fertilizer, compost) and blocks at two experimental sites (Gare Royale, GR and Masui, MAS). For each factor and interaction,  $F_{df}^{ls}$  is presented where  $F$  is the F-statistic value,  $df$  the number of degrees of freedom and  $ls$  the level of significance associated (\*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*,  $P < 0.05$ ; •,  $P < 0.1$ ; ns, not significant), the number of degrees of freedom of residuals is also given.

		% OM	pH	CEC	% Clay	% Silt	% Sand	Ca	K	Mg	P
GR	Treat.	0.10 <sup>ns</sup> <sub>2</sub>	32.3 <sup>***</sup> <sub>2</sub>	6.47 <sup>*</sup> <sub>2</sub>	2.00 <sup>ns</sup> <sub>2</sub>	0.36 <sup>ns</sup> <sub>2</sub>	0.12 <sup>ns</sup> <sub>2</sub>	11.5 <sup>***</sup> <sub>2</sub>	352 <sup>***</sup> <sub>2</sub>	72.9 <sup>***</sup> <sub>2</sub>	196 <sup>***</sup> <sub>2</sub>
	Block	267 <sup>***</sup> <sub>3</sub>	14.0 <sup>***</sup> <sub>3</sub>	23.1 <sup>**</sup> <sub>3</sub>	11.8 <sup>**</sup> <sub>3</sub>	13.8 <sup>**</sup> <sub>3</sub>	14.1 <sup>**</sup> <sub>3</sub>	26 <sup>***</sup> <sub>3</sub>	23.7 <sup>***</sup> <sub>3</sub>	78.4 <sup>***</sup> <sub>3</sub>	17.0 <sup>***</sup> <sub>3</sub>
	Treat. × Block	2.73 <sup>*</sup> <sub>6</sub>	1.76 <sup>ns</sup> <sub>6</sub>	/	/	/	/	1.12 <sup>ns</sup> <sub>6</sub>	7.72 <sup>***</sup> <sub>6</sub>	3.53 <sup>**</sup> <sub>6</sub>	13.6 <sup>***</sup> <sub>6</sub>
	Residuals	36	36	6	6	6	6	36	36	36	36
MAS	Treat.	2.37 <sup>ns</sup> <sub>2</sub>	2.54 <sup>•</sup> <sub>2</sub>	6.64 <sup>*</sup> <sub>2</sub>	0.06 <sup>ns</sup> <sub>2</sub>	0.02 <sup>ns</sup> <sub>2</sub>	0.02 <sup>ns</sup> <sub>2</sub>	0.33 <sup>ns</sup> <sub>2</sub>	204 <sup>***</sup> <sub>2</sub>	98 <sup>***</sup> <sub>2</sub>	114 <sup>***</sup> <sub>2</sub>
	Block	10.9 <sup>***</sup> <sub>3</sub>	18.35 <sup>***</sup> <sub>3</sub>	0.23 <sup>ns</sup> <sub>3</sub>	0.19 <sup>ns</sup> <sub>3</sub>	1.02 <sup>ns</sup> <sub>3</sub>	1.88 <sup>ns</sup> <sub>3</sub>	2.67 <sup>•</sup> <sub>3</sub>	34.5 <sup>***</sup> <sub>3</sub>	11.3 <sup>***</sup> <sub>3</sub>	60.6 <sup>***</sup> <sub>3</sub>
	Treat. × Block	1.01 <sup>ns</sup> <sub>6</sub>	2.29 <sup>•</sup> <sub>6</sub>	/	/	/	/	1.33 <sup>ns</sup> <sub>6</sub>	2.94 <sup>*</sup> <sub>6</sub>	1.86 <sup>ns</sup> <sub>6</sub>	1.02 <sup>ns</sup> <sub>6</sub>
	Residuals	36	35	6	6	6	6	36	36	36	36

**Table S1.** Soil exchangeable concentrations in Cd and Zn before and after cultivation of *N. caerulea* (GAN population and NMET, mean of GOE and WIL populations) on two experimental sites (Gare Royale, GR and Masui, MAS) and associated relative changes based on soil measurements and on plant uptake (negative values indicate a decrease and positive values an increase of soil exchangeable concentrations). Unplanted subplots were included as a control. Data are mean  $\pm$  standard error, with the level of significance associated to the paired t-test (\*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*,  $P < 0.05$ ; ·,  $P < 0.1$ ; ns, not significant).

		Soil exchangeable Cd				Soil exchangeable Zn			
		Before (mg.kg <sup>-1</sup> )	After (mg.kg <sup>-1</sup> )	Relative change from soil data <sup>1</sup> (%)	Relative change from plant uptake <sup>2</sup> (%)	Before (mg.kg <sup>-1</sup> )	After (mg.kg <sup>-1</sup> )	Relative change from soil data <sup>1</sup> (%)	Relative change from plant uptake <sup>2</sup> (%)
Site GR	GAN	0.98 $\pm$ 0.1	0.69 $\pm$ 0.06	- 27 $\pm$ 5.7 **	- 16.1 $\pm$ 3.2	158 $\pm$ 14	120 $\pm$ 10	- 21.8 $\pm$ 5.7 **	- 9.6 $\pm$ 2.1
	NMET	0.97 $\pm$ 0.06	0.73 $\pm$ 0.04	- 21.7 $\pm$ 3.4 ****	- 12.7 $\pm$ 2	151 $\pm$ 9	96 $\pm$ 8	- 36 $\pm$ 3.8 ****	- 27 $\pm$ 3.3
	Unplanted	1.06 $\pm$ 0.15	0.88 $\pm$ 0.06	- 9.8 $\pm$ 6.3 ns	/	157 $\pm$ 13	135 $\pm$ 10	- 13.1 $\pm$ 3.8 **	/
Site MAS	GAN	0.62 $\pm$ 0.05	0.59 $\pm$ 0.04	- 2.1 $\pm$ 6.1 ns	- 7.1 $\pm$ 1.7	93 $\pm$ 7	93 $\pm$ 9	+ 1.5 $\pm$ 7.2 ns	- 2.7 $\pm$ 0.5
	NMET	0.57 $\pm$ 0.04	0.63 $\pm$ 0.02	+ 15.3 $\pm$ 4.7 *	- 2.4 $\pm$ 0.3	84 $\pm$ 6	97 $\pm$ 8	+ 19 $\pm$ 8.3 ·	- 4.6 $\pm$ 0.7
	Unplanted	0.55 $\pm$ 0.03	0.65 $\pm$ 0.03	+ 19.2 $\pm$ 4.2 ****	/	92 $\pm$ 8	94 $\pm$ 7	+ 6.1 $\pm$ 6.7 ns	/

<sup>1</sup> Mean change per subplot;

<sup>2</sup> Calculation based on plant metal uptake (g.ha<sup>-1</sup>; see above) and the following soil characteristics: depth of 20 cm, soil bulk density of 1.05 g.cm<sup>-3</sup> (GR) and 1.3 g.cm<sup>-3</sup> (MAS) and gravel charge of 37% (GR) and 14% (MAS).



## 2. Annexes au chapitre 2

**Table S1.** Analysis of variance of shoot individual and total biomass, foliar concentrations in Cd and Zn, and total metal uptake of two populations (Pop.) of *N. caerulea* (one calamine, Ganges, and one non-metallicolous, Wilwerwiltz) grown at two densities (Dens.) and with or without nitrogen fertilization (Treat.) in two experimental sites (MAS = Masui and NAV = Navez). For each factor (Pop. = population, Dens. = Density, Treat. = Treatment, –) and interactions, the number of degrees of freedom (d.f.), mean square (MS), F value, and level of significance associated (\*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001; P < 0.05; P < 0.1; ns, not significant) are given.

	d.f.	Individual biomass		Total biomass		Cd shoot concentration		Zn shoot concentration		Cd uptake		Zn uptake	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
MAS													
Pop.	1	0.001	0.02 <sup>ns</sup>	0.181	2.95 <sup>ns</sup>	17.231	582.74 <sup>***</sup>	0.075	14.46 <sup>**</sup>	5.134	140.34 <sup>***</sup>	4.5884	18.06 <sup>***</sup>
Dens.	1	1.623	32.02 <sup>***</sup>	0.76	12.37 <sup>**</sup>	0.2223	7.52 <sup>*</sup>	0.029	5.65 <sup>*</sup>	0.855	23.37 <sup>***</sup>	6.5548	25.80 <sup>***</sup>
Treat.	1	0.671	13.23 <sup>**</sup>	0.37	6.02 <sup>*</sup>	3.0131	101.90 <sup>***</sup>	0.333	64.24 <sup>***</sup>	0.313	8.55 <sup>*</sup>	0.9991	3.93 <sup>*</sup>
Block	3	0.177	0.35 <sup>ns</sup>	0.09	1.46 <sup>ns</sup>	1.3143	44.45 <sup>***</sup>	0.068	13.14 <sup>***</sup>	0.505	13.81 <sup>***</sup>	0.7399	2.91 <sup>*</sup>
Pop. x Dens.	1	0.167	3.29 <sup>*</sup>	0.099	1.61 <sup>ns</sup>	0.1469	4.97 <sup>*</sup>	0.002	0.33 <sup>ns</sup>	0.001	0.03 <sup>ns</sup>	0.4058	1.60 <sup>ns</sup>
Pop. x Treat.	1	0.006	0.12 <sup>ns</sup>	0.002	0.03 <sup>ns</sup>	0.055	1.86 <sup>ns</sup>	0.009	1.65 <sup>ns</sup>	0.021	0.57 <sup>ns</sup>	0.2376	0.94 <sup>ns</sup>
Pop. x Block	3	0.283	5.58 <sup>*</sup>	0.42	6.83 <sup>**</sup>	0.098	3.32 <sup>*</sup>	0.041	7.90 <sup>**</sup>	0.411	11.23 <sup>***</sup>	3.901	15.36 <sup>***</sup>
Dens. x Treat.	1	0.006	0.11 <sup>ns</sup>	0	0.0007 <sup>ns</sup>	0.1363	4.61 <sup>*</sup>	0.022	4.25 <sup>*</sup>	0.054	1.48 <sup>ns</sup>	0.4663	1.84 <sup>ns</sup>
Dens. x Block	3	0.058	1.14 <sup>ns</sup>	0.031	0.50 <sup>ns</sup>	0.026	0.88 <sup>ns</sup>	0.002	0.33 <sup>ns</sup>	0.02	0.55 <sup>ns</sup>	0.0808	0.32 <sup>ns</sup>
Treat. x Block	3	0.019	0.37 <sup>ns</sup>	0.014	0.24 <sup>ns</sup>	0.0731	2.47 <sup>ns</sup>	0.005	0.87 <sup>ns</sup>	0.03	0.81 <sup>ns</sup>	0.0778	0.31 <sup>ns</sup>
Residuals	13	0.051		0.061		0.0296		0.005		0.037		0.254	
NAV													
Pop.	1	2.225	32.29 <sup>***</sup>	2.285	45.04 <sup>***</sup>	7.9915	1332.98 <sup>***</sup>	535	20.18 <sup>***</sup>	25.854	203 <sup>***</sup>	5.104	63.82 <sup>***</sup>
Dens.	1	1.531	22.22 <sup>***</sup>	0.966	19.04 <sup>***</sup>	0.0115	1.92 <sup>ns</sup>	218	8.24 <sup>*</sup>	2.455	19.31 <sup>***</sup>	1.959	24.5 <sup>***</sup>
Treat.	1	5.194	75.40 <sup>***</sup>	4.458	87.87 <sup>***</sup>	0.2186	36.46 <sup>***</sup>	1039	39.20 <sup>***</sup>	2.424	19.07 <sup>***</sup>	2.189	27.37 <sup>***</sup>
Block	3	2.744	39.83 <sup>***</sup>	2.367	46.64 <sup>***</sup>	0.0439	7.33 <sup>**</sup>	1355	51.11 <sup>***</sup>	5.882	46.26 <sup>***</sup>	6.405	80.09 <sup>***</sup>
Pop. x Dens.	1	0.002	0.03 <sup>ns</sup>	0.001	0.02 <sup>ns</sup>	0.0036	0.61 <sup>ns</sup>	21	0.81 <sup>ns</sup>	0.013	0.10 <sup>ns</sup>	0.009	0.11 <sup>ns</sup>
Pop. x Treat.	1	0	0 <sup>ns</sup>	0.01	0.19 <sup>ns</sup>	0.0005	0.08 <sup>ns</sup>	68	2.58 <sup>ns</sup>	0.017	0.13 <sup>ns</sup>	0.092	1.15 <sup>ns</sup>
Pop. x Block	3	0.107	1.55 <sup>ns</sup>	0.071	1.40 <sup>ns</sup>	0.0527	8.79 <sup>**</sup>	141	5.34 <sup>*</sup>	0.519	4.08 <sup>*</sup>	0.317	3.97 <sup>*</sup>
Dens. x Treat.	1	0.099	1.43 <sup>ns</sup>	0.103	2.02 <sup>ns</sup>	0.0019	0.32 <sup>ns</sup>	23	0.86 <sup>ns</sup>	0.039	0.31 <sup>ns</sup>	0.04	0.5 <sup>ns</sup>
Dens. x Block	3	0.372	5.39 <sup>*</sup>	0.21	4.15 <sup>*</sup>	0.0106	1.76 <sup>ns</sup>	47	1.78 <sup>ns</sup>	0.661	5.20 <sup>*</sup>	0.291	3.63 <sup>*</sup>
Treat. x Block	3	0.077	1.11 <sup>ns</sup>	0.09	1.77 <sup>ns</sup>	0.0041	0.69 <sup>ns</sup>	11	0.42 <sup>ns</sup>	0.137	1.08 <sup>ns</sup>	0.081	1.01 <sup>ns</sup>
Residuals	13	0.069		0.051		0.0065		27		0.127		0.08	

**Table S2.** Shoot concentrations in metals and macroelements in two populations (GAN and WIL) of *Noccaea caerulea* grown at two sites (Masui and Navez), depending on planting densities (D50 and D100) and soil treatments (Fertilized with N (Fert.) and Control (Cont.)). Data are mean  $\pm$  SE. The level of significance of the population (Pop), Density, and N treatment (Treat.) factors (ANOVA) are indicated for each element (\*\*\*P < 0.001, \*\*P < 0.01, \*P < 0.05; P < 0.1; ns, not significant).

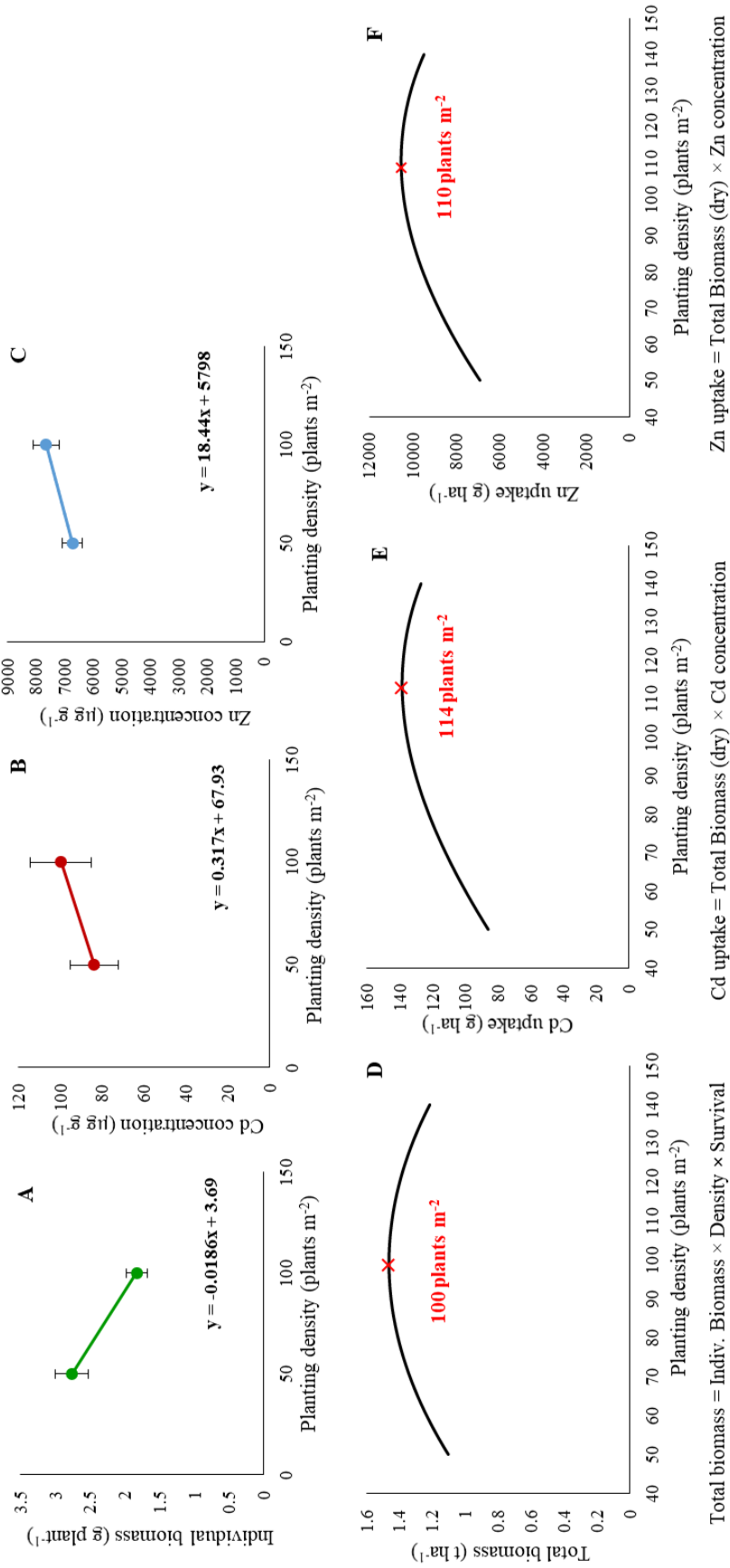
Site	Pop	Density	Treat.	Ca	Cd	Cu	Fe	K	Mg	Ni	P	Pb	Zn
Masui	GAN	D100	Fert.	14160 $\pm$ 1500	104 $\pm$ 12	29 $\pm$ 4	296 $\pm$ 90	35550 $\pm$ 2450	2610 $\pm$ 110	59 $\pm$ 3	4560 $\pm$ 330	5.7 $\pm$ 2.3	5180 $\pm$ 370
		Cont.	16740 $\pm$ 1340	205 $\pm$ 30	23 $\pm$ 3	278 $\pm$ 39	26150 $\pm$ 1080	2350 $\pm$ 210	75 $\pm$ 6	3920 $\pm$ 250	4.2 $\pm$ 0.8	7610 $\pm$ 700	
	D50	Fert.	14610 $\pm$ 1030	92 $\pm$ 13	28 $\pm$ 3	270 $\pm$ 17	35970 $\pm$ 2060	2540 $\pm$ 90	53 $\pm$ 5	4420 $\pm$ 100	4.1 $\pm$ 0.3	4750 $\pm$ 420	
		Cont.	16250 $\pm$ 840	145 $\pm$ 27	23 $\pm$ 4	261 $\pm$ 24	28140 $\pm$ 3260	2420 $\pm$ 120	54 $\pm$ 3	3730 $\pm$ 260	4.1 $\pm$ 0.7	6270 $\pm$ 620	
	WIL	D100	Fert.	17570 $\pm$ 840	31 $\pm$ 7	15 $\pm$ 3	173 $\pm$ 23	23280 $\pm$ 2400	2880 $\pm$ 530	84 $\pm$ 12	2240 $\pm$ 230	2.8 $\pm$ 0.4	5610 $\pm$ 860
		Cont.	19420 $\pm$ 1110	54 $\pm$ 11	12 $\pm$ 2	181 $\pm$ 20	19850 $\pm$ 1130	3590 $\pm$ 430	124 $\pm$ 8	1970 $\pm$ 100	2.8 $\pm$ 0.1	10150 $\pm$ 1210	
D50	Fert.	17910 $\pm$ 1110	34 $\pm$ 9	15 $\pm$ 2	160 $\pm$ 19	25260 $\pm$ 3240	2770 $\pm$ 420	88 $\pm$ 8	2360 $\pm$ 240	2.5 $\pm$ 0.3	6080 $\pm$ 1240		
	Cont.	18030 $\pm$ 480	45 $\pm$ 4	16 $\pm$ 3	209 $\pm$ 28	20510 $\pm$ 2020	2920 $\pm$ 120	109 $\pm$ 14	1860 $\pm$ 160	3.5 $\pm$ 0.7	7840 $\pm$ 690		
			<b>Pop</b>	***	***	***	***	***	**	***	***	*	***
			<b>Density</b>	ns	*	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*
			<b>Treat.</b>	**	***	**	ns	**	ns	***	***	ns	***
Navez	GAN	D100	Fert.	14750 $\pm$ 850	153 $\pm$ 41	9.8 $\pm$ 0.6	264 $\pm$ 52	23100 $\pm$ 1570	2300 $\pm$ 100	39 $\pm$ 4	3650 $\pm$ 130	9 $\pm$ 2.9	7080 $\pm$ 1570
		Cont.	17440 $\pm$ 1220	203 $\pm$ 19	9.9 $\pm$ 1.5	346 $\pm$ 86	19430 $\pm$ 3140	2400 $\pm$ 180	46 $\pm$ 2	3200 $\pm$ 380	15.6 $\pm$ 6.2	8150 $\pm$ 1310	
	D50	Fert.	13640 $\pm$ 380	121 $\pm$ 9	11.5 $\pm$ 1.9	233 $\pm$ 127	21300 $\pm$ 1470	2360 $\pm$ 60	39 $\pm$ 6	3770 $\pm$ 180	16 $\pm$ 8.7	5720 $\pm$ 760	
		Cont.	15000 $\pm$ 700	186 $\pm$ 32	8.3 $\pm$ 0.6	245 $\pm$ 57	16740 $\pm$ 2570	2060 $\pm$ 160	48 $\pm$ 5	2720 $\pm$ 290	9.3 $\pm$ 2.8	7140 $\pm$ 970	
	WIL	D100	Fert.	14130 $\pm$ 450	20 $\pm$ 1	4.9 $\pm$ 0.6	144 $\pm$ 22	15620 $\pm$ 3060	2350 $\pm$ 180	41 $\pm$ 10	1590 $\pm$ 190	3.8 $\pm$ 0.6	7040 $\pm$ 1040
		Cont.	16350 $\pm$ 460	27 $\pm$ 2	4.7 $\pm$ 0.6	203 $\pm$ 35	14270 $\pm$ 2220	2800 $\pm$ 100	44 $\pm$ 8	1250 $\pm$ 140	6.1 $\pm$ 1.1	10310 $\pm$ 1390	
D50	Fert.	14120 $\pm$ 630	20 $\pm$ 1	5 $\pm$ 0.5	154 $\pm$ 17	17240 $\pm$ 2070	2610 $\pm$ 90	41 $\pm$ 8	1600 $\pm$ 220	5.4 $\pm$ 5.3	7150 $\pm$ 1030		
	Cont.	14650 $\pm$ 640	25 $\pm$ 2	4.4 $\pm$ 0.5	170 $\pm$ 44	14420 $\pm$ 2630	2570 $\pm$ 210	43 $\pm$ 9	1230 $\pm$ 70	5 $\pm$ 1.7	8820 $\pm$ 1030		
			<b>Pop</b>	ns	***	***	**	**	*	ns	***	**	***
			<b>Density</b>	*	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*
			<b>Treat.</b>	**	***	*	ns	**	ns	*	***	ns	***

**Table S3.** Soil exchangeable concentrations in Cd and Zn before and after cultivation of *N. caerulea* on two experimental sites (Masui and Navez). The associated relative changes in soil Cd and Zn concentrations are based 1) on soil measurements (before cultivation and 6 months after harvest) and 2) on plant uptake (negative values indicate a decrease of soil exchangeable concentrations). Data are mean  $\pm$  standard error, with the level of significance associated to the paired t-test (\*\*\*,  $P < 0.001$ ).

	Before cultivation (mg kg <sup>-1</sup> )	After (mg kg <sup>-1</sup> )		Relative change 6 months after harvest (%)	Relative change based on plant uptake (%) <sup>1</sup>
		At harvest	6 months after harvest		
Soil exchangeable Cd					
MASUI	0.43 $\pm$ 0.01	0.35 $\pm$ 0.01	0.39 $\pm$ 0.01	- 10 $\pm$ 2 ***	- 9 $\pm$ 1
NAVEZ	0.51 $\pm$ 0.01	0.42 $\pm$ 0.01	0.45 $\pm$ 0.01	- 12 $\pm$ 1 ***	- 11 $\pm$ 2
Soil exchangeable Zn					
MASUI	56 $\pm$ 3	47 $\pm$ 2	50 $\pm$ 3	- 9 $\pm$ 2 ***	- 6 $\pm$ 0.5
NAVEZ	106 $\pm$ 3	91 $\pm$ 2	98 $\pm$ 3	- 8 $\pm$ 1 ***	- 5 $\pm$ 0.6

<sup>1</sup> Calculation based on plant metal uptake (kg.ha<sup>-1</sup>) and the following soil characteristics: depth of 20 cm, plot soil bulk density and gravel charge.

**Figure S1.** Summary of the model built to calculate the optimal planting density for phytoextraction with *N. caeruleascens*. Linear relationships of individual biomass (A), shoot Cd concentration (B) and Zn concentration (C) with planting density were built based on average values obtained on two sites (MAS and NAV) with two populations (GAN and WIL) at planting densities D50 and D100 (n = 64 observations). Total biomass (D), Cd and Zn uptake (E, F) were then extrapolated for planting densities between 50 and 150 plants m<sup>-2</sup> (using an average survival of 0.8).



## 3. Annexe au chapitre 3

**Table S1.** Results of the analyses of variance with the number of degrees of freedom (d.f.), mean square (MS), F value, and level of significance associated (\*\*\* p < 0.001, \*\* p < 0.01, \* p < 0.05, ns not significant) for all factors and interactions: Season (Spring or Fall), Seeding strategy (Direct sowing or Transplantation), Population (GAN or LUX), Sowing season (Late summer, Fall or Spring), Length (6, 7 or 12 month-growth).

		Individual biomass		Total biomass		Flowering		Survival		Cd shoot concentration		Cd uptake		Zn shoot concentration		Zn uptake	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F	MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
Season	d.f.	5.762	<b>35.27</b> ***	2.468	<b>12.87</b> **	0.0192	1.05 <sup>ns</sup>	3781	2.92 <sup>ns</sup>	0.491	2.13 <sup>ns</sup>	4.128	2.40 <sup>ns</sup>	0.031	2.38 <sup>ns</sup>	3.12	5.73 *
Seeding strategy (SS)	1	11.73	<b>71.81</b> ***	7.982	<b>41.63</b> ***	3.4293	<b>188</b> ***	5523	<b>4.27</b> ·	0.541	2.35 <sup>ns</sup>	14.762	<b>8.6</b> **	0.077	<b>5.84</b> *	8.721	<b>16.01</b> ***
Population	1	0.196	1.20 <sup>ns</sup>	0.102	0.53 <sup>ns</sup>	0.0068	0.37 <sup>ns</sup>	3125	2.42 <sup>ns</sup>	38.637	<b>167.81</b> ***	125.885	<b>73.30</b> ***	0.267	<b>20.35</b> ***	3.176	<b>5.83</b> *
Block	3	1.909	<b>11.68</b> ***	2.219	<b>11.58</b> ***	0.0038	0.21 <sup>ns</sup>	481	0.37 <sup>ns</sup>	0.293	1.27 <sup>ns</sup>	8.739	<b>5.09</b> **	0.378	<b>28.83</b> ***	8.891	<b>16.32</b> ***
Season × SS	1	0.135	0.83 <sup>ns</sup>	0.505	2.64 <sup>ns</sup>	0.0192	1.05 <sup>ns</sup>	456	0.35 <sup>ns</sup>	0.387	1.68 <sup>ns</sup>	5.447	<b>3.17</b> ·	0.0001	0.006 <sup>ns</sup>	1.315	2.41 <sup>ns</sup>
Season × Population	1	0.029	0.18 <sup>ns</sup>	0.034	0.17 <sup>ns</sup>	0.2769	<b>15.16</b> ***	1042	0.80 <sup>ns</sup>	0.2	0.87 <sup>ns</sup>	0.12	0.07 <sup>ns</sup>	0.006	0.48 <sup>ns</sup>	0.214	0.39 <sup>ns</sup>
SS × Pop.	1	0.251	1.54 <sup>ns</sup>	0.74	3.86 ·	0.0068	0.37 <sup>ns</sup>	22275	<b>17.22</b> ***	0.026	0.11 <sup>ns</sup>	1	0.58 <sup>ns</sup>	0.003	0.21 <sup>ns</sup>	1.236	2.27 <sup>ns</sup>
Residuals	22	0.163		0.192				1294		0.23		1.717		0.013		0.545	

		Individual biomass		Total biomass		Flowering		Survival		Cd shoot concentration		Cd uptake		Zn shoot concentration		Zn uptake	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F	MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
Sowing Season	d.f.	4.137	<b>24.59</b> **	1.388	<b>11.60</b> **	0.035	<b>48.54</b> ***	8564	<b>6.05</b> *	0.003	0.01 <sup>ns</sup>	0.017	<b>10.36</b> *	0.016	0.94 <sup>ns</sup>	2.166	<b>10.10</b> *
Population	1	0.026	0.15 <sup>ns</sup>	0	0 <sup>ns</sup>	0.008	<b>10.81</b> *	6075	<b>4.29</b> ·	24.54	<b>101</b> ***	0.013	<b>159</b> ***	0.274	<b>16.56</b> **	1.803	<b>8.41</b> *
Block	3	0.832	<b>4.94</b> *	1.857	<b>15.52</b> **	0.002	2.25 <sup>ns</sup>	3967	2.80 <sup>ns</sup>	0.713	2.94 <sup>ns</sup>	0.233	<b>27.12</b> ***	0.194	<b>11.7</b> **	7.452	<b>34.76</b> ***
Sowing season × Pop.	2	0.464	2.76 <sup>ns</sup>	0.226	1.89 <sup>ns</sup>	0.008	<b>10.81</b> *	9947	<b>7.03</b> *	0.324	1.34 <sup>ns</sup>	0.049	<b>7.16</b> *	0.004	0.23 <sup>ns</sup>	0.685	3.2 <sup>ns</sup>
Sowing season × Block	6	0.529	<b>3.14</b> ·	0.361	3.02 <sup>ns</sup>	0.002	2.25 <sup>ns</sup>	3504	2.48 <sup>ns</sup>	0.199	0.82 <sup>ns</sup>	0.094	<b>7.44</b> *	0.028	1.72 <sup>ns</sup>	1.588	<b>7.41</b> *
Pop. × Block	3	0.051	0.30 <sup>ns</sup>	0.544	<b>4.55</b> ·	0.001	1 <sup>ns</sup>	1169	0.83 <sup>ns</sup>	0.882	<b>3.64</b> ·	0.155	<b>8.66</b> *	0.046	2.76 <sup>ns</sup>	1.8	<b>8.39</b> *
Residuals	6	0.168		0.12				1415		0.242		0.03		0.017		0.214	

		Individual biomass		Total biomass		Flowering		Survival		Cd shoot concentration		Cd uptake		Zn shoot concentration		Zn uptake	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F	MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
Length	d.f.	8.446	<b>50.4</b> ***	5.733	<b>44.91</b> **	0.184	<b>36.9</b> ***	2329	<b>9.22</b> **	1.932	<b>56.59</b> ***	8.975	<b>17.73</b> **	0.402	<b>42.27</b> ***	5.24	<b>31.06</b> ***
Population	1	0.002	0.01 <sup>ns</sup>	0.395	3.1 <sup>ns</sup>	0.192	<b>38.46</b> ***	1687	<b>5.49</b> *	31.114	<b>911</b> ***	86.026	<b>170</b> ***	0.186	<b>19.6</b> **	5.597	<b>33.17</b> ***
Block	4	0.442	2.64 <sup>ns</sup>	0.636	<b>4.98</b> *	0.024	<b>4.85</b> *	325	1.28 <sup>ns</sup>	0.628	<b>18.40</b> ***	4.244	<b>8.38</b> **	0.244	<b>25.68</b> ***	3.464	<b>20.53</b> ***
Length × Pop.	2	0.491	2.93 <sup>ns</sup>	0.982	<b>7.69</b> *	0.430	<b>86.40</b> ***	1925	<b>7.62</b> *	0.263	<b>7.69</b> *	0.94	1.86 <sup>ns</sup>	0.007	0.77 <sup>ns</sup>	1.129	<b>6.69</b> *
Length × Block	8	0.067	0.4 <sup>ns</sup>	0.116	0.90 <sup>ns</sup>	0.026	<b>5.24</b> *	225	0.89 <sup>ns</sup>	0.139	<b>4.08</b> *	0.972	1.92 <sup>ns</sup>	0.02	2.11 <sup>ns</sup>	0.343	2.03 <sup>ns</sup>
Pop. × Block	4	0.361	2.15 <sup>ns</sup>	0.205	1.6 <sup>ns</sup>	0.016	3.23 ·	346	1.37 <sup>ns</sup>	0.704	<b>20.61</b> ***	4.933	<b>9.74</b> **	0.003	0.34 <sup>ns</sup>	0.364	2.16 <sup>ns</sup>
Residuals	8	0.168		0.128				253		0.034		0.506		0.01		0.169	

## 4. Annexes au chapitre 4

Table S1. General information of the sites of origin and major characteristics of the soils used in the experiment.

Soil	Region	Locality	Type of site	GPS coordinates	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)	pH	CARB	OM (%)	CEC (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	Soil bulk density (g cm <sup>-3</sup> )	Gravel charge (m/m %)	PI (cm h <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )
ALST	Brussels	Laeken	Community garden	50°52'32"N, 4°21'36"E	71	24	5	6.61	0	20.2	25.0	0.77	32	18.3	826	0.92
AN1	Brussels	Anderlecht	Urban wasteland	50°50'19"N, 4°19'25"E	48	45	7	7.24	1	8.0	21.7	0.93	4	3.4	1858	0.99
AN2	Brussels	Anderlecht	Urban wasteland	50°50'13"N, 4°19'25"E	59	37	4	7.68	1	4.1	10.6	1.25	17	0.1	4	0.17
AN3	Brussels	Anderlecht	Urban wasteland	50°50'16"N, 4°19'21"E	38	56	6	7.69	1	5.4	15.4	1.16	5	0.3	3	1.10
AN4	Brussels	Anderlecht	Urban wasteland	50°50'14"N, 4°19'24"E	66	26	7	7.85	1	4.5	10.2	1.20	8	0.03	5	0.62
ANG	Wallonia	Angleur	Private garden	50°36'41"N, 5°35'58"E	55	39	7	6.82	0	13.6	17.0	0.94	9	24.3	24	11.88
BEM	Brussels	Forest	Community garden	50°48'17"N, 4°18'43"E	57	36	7	7.13	1	6.0	15.3	1.10	3	0.8	294	2.10
CHA1	Wallonia	Châtelet	Private garden	50°24'22"N, 4°31'40"E	48	43	9	7.00	1	16.6	17.6	0.94	6	0.5	33	2.25
CHA2	Wallonia	Châtelet	Private garden	50°24'22"N, 4°31'40"E	48	39	13	7.24	1	19.9	24.5	0.91	0	1.3	9	0.86
FLO	Wallonia	Flône	Private garden	50°33'27"N, 5°20'10"E	31	57	11	6.96	0	9.4	20.1	1.03	5	0.03	60	36.70
GR	Brussels	Laeken	Urban wasteland	50°52'31"N, 4°21'41"E	48	43	9	6.76	0	19.9	34.9	0.80	11	5.7	3800	1.38
GRAY	Brussels	Ixelles	Community garden	50°50'2"N, 4°22'47"E	57	38	5	7.63	1	5.6	13.7	1.13	5	0.3	122	0.97
LIE	Wallonia	Liège	Private garden	50°37'57"N, 5°34'47"E	42	50	8	6.24	0	16.9	13.7	0.88	13	1.4	27	37.12
MAS	Brussels	Brussels	Urban wasteland	50°52'8"N, 4°21'40"E	71	24	5	8.01	1	5.0	11.2	1.21	8	0.1	173	0.66
MOE1	Brussels	Evere	Nature Reserve	50°52'59"N, 4°24'8"E	72	23	5	6.84	0	10.5	17.5	0.97	13	2.2	770	0.55
MOE2	Brussels	Evere	Nature Reserve	50°53'3"N, 4°24'16"E	81	16	3	7.18	1	8.7	22.8	0.93	1	24.5	3323	2.94
NAV	Brussels	Schaerbeek	Community garden	50°52'21"N, 4°22'19"E	76	18	6	7.47	1	7.0	17.1	1.01	6	0.7	14	0.52
RUE	Brussels	Molenbeek	Community garden	50°51'10"N, 4°20'13"E	63	33	4	7.93	1	4.3	11.2	1.19	9	0.8	4	0.48
SER1	Wallonia	Seraing	Private garden	50°35'2"N, 5°29'59"E	43	47	10	7.20	1	13.5	20.7	0.95	2	0.8	9	1.32
SER2	Wallonia	Seraing	Private garden	50°35'2"N, 5°29'59"E	36	53	12	6.95	0	13.3	20.7	0.96	7	9.6	87	1.71
SOL6	Wallonia	Vaux-sous-Chèvremont	Private garden	50°36'4"N, 5°37'55"E	27	60	13	7.35	1	9.8	20.5	1.00	0	2.3	6	1.19
TIL	Brussels	Uccle	Community garden	50°48'33"N, 4°20'9"E	68	29	3	6.26	0	4.4	9.2	1.10	3	4.1	368	1.86
TIN	Wallonia	Tinlot	Private garden	50°28'40"N, 5°22'44"E	49	39	12	7.01	1	7.5	16.2	1.08	5	0.2	5	5.29
WIE	Brussels	Forest	Community garden	50°49'29"N, 4°19'32"E	58	37	5	7.82	1	8.1	19.6	1.03	11	1.6	4	0.60

Soil	Exchangeable macronutrients (EDTA-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> acetate) (mg kg <sup>-1</sup> )					Total metal concentrations (mg kg <sup>-1</sup> )					Exchangeable metal concentrations (EDTA-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> acetate) (mg kg <sup>-1</sup> )				
	Ca	Fe	K	Mg	P	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn
ALST	4497	151	217	211	15	1.4	141	40	222	334	0.70	42.4	2.70	70	151
AN1	5668	38	511	237	39	0.6	26	15	103	126	0.46	6.9	0.82	48	44
AN2	5536	12	152	78	26	1.0	49	19	572	217	0.36	14.2	0.55	290	40
AN3	9833	71	319	232	66	1.0	73	20	301	228	0.89	51.9	1.81	295	91
AN4	5408	7	167	74	13	1.2	94	18	473	226	0.35	29.4	0.79	195	36
ANG	3703	93	250	89	67	3.7	107	34	719	1696	3.01	38.3	1.84	209	734
BEM	4194	121	221	127	146	1.2	49	18	182	227	0.91	18.4	1.90	72	104
CHA1	4999	57	159	93	80	1.7	86	38	247	592	0.76	18.8	1.44	66	177
CHA2	5584	30	316	139	53	1.2	84	42	419	479	0.58	13.1	1.44	103	164
FLO	3888	70	203	166	46	6.2	32	13	198	1461	5.41	10.3	0.73	121	727
GR	5789	157	335	252	16	1.3	94	26	279	315	0.87	32.8	1.60	113	127
GRAY	4612	10	160	87	26	1.3	172	33	262	2392	0.61	80.1	1.29	120	831
LIE	2180	142	373	49	39	20.0	240	43	841	5322	13.86	101.2	2.91	383	3202
MAS	5023	13	161	57	11	1.6	205	25	287	427	0.67	39.3	0.39	94	51
MOE1	3778	111	215	147	27	2.0	70	23	1482	2646	1.37	24.3	1.49	575	849
MOE2	5877	24	321	163	30	1.0	26	9	1410	209	0.37	7.1	0.53	714	75
NAV	4856	21	266	205	65	1.3	110	22	263	278	0.50	46.0	0.81	102	76
RUE	5010	13	186	81	34	1.1	28	12	152	188	0.17	6.8	0.33	47	30
SER1	5070	59	377	203	84	2.8	88	36	412	735	1.52	22.6	1.38	114	232
SER2	4395	61	639	159	122	2.6	69	34	181	597	1.64	16.0	1.65	72	235
SOL6	5029	63	447	245	86	3.0	53	24	154	584	1.91	15.6	1.26	59	180
TIL	2022	163	230	143	100	0.6	29	9	92	75	0.29	17.0	0.86	68	48
TIN	4454	93	164	104	231	1.6	40	14	525	593	0.82	13.2	0.87	175	247
WIE	5542	19	390	188	30	0.9	84	20	301	307	0.21	18.4	0.29	56	51

**Table S2.** Average biomass production, shoot metal concentrations and Cd and Zn uptake of *N. caerulea* on 24 soils (control, unfertilized).

Soil	Pop.	Biomass (g)		Shoot concentrations ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )														Uptake ( $\mu\text{g plant}^{-1}$ )	
		Reproductive	Vegetative	Total biomass	Ca	Cd	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Ni	P	Zn	Cd uptake	Zn uptake			
ALST	GAN	0.66	0.60	1.26	12910	15	4.3	54	22510	2198	24	7	2569	1638	15	1736			
	LUX	0.14	0.64	0.78	17166	9	3.1	41	20208	1814	22	9	1747	3445	6	2443			
AN1	GAN	0.44	0.90	1.33	17389	4	3.6	72	24977	2695	39	2	2840	327	5	410			
	LUX	0.06	0.73	0.79	14521	4	2.1	78	24647	1387	23	2	1326	320	4	377			
AN2	GAN	0.20	0.18	0.38	24061	22	6.6	115	20674	3499	52	15	2983	850	6	246			
	LUX	0.01	0.44	0.45	24218	24	3.7	74	17930	2459	55	21	1447	2357	9	936			
AN3	GAN	0.10	0.50	0.60	20784	18	4.5	119	19668	2751	53	10	2496	710	10	385			
	LUX	0.10	0.35	0.44	24364	29	4.6	212	18716	2666	60	25	2211	2347	12	975			
AN4	GAN	0.20	0.21	0.40	15279	13	6.2	34	19148	1946	37	12	2258	697	5	261			
	LUX	0.02	0.30	0.32	23556	24	12.4	81	19753	1871	49	34	1622	1933	7	590			
ANG	GAN	0.30	1.22	1.52	10893	55	4.2	84	23199	2035	81	1	2873	1399	69	1788			
	LUX	0.14	1.70	1.84	15447	10	3.3	47	20973	2271	147	1	1719	6544	16	11164			
BEM	GAN	0.28	0.20	0.48	15034	23	4.4	67	22410	2839	37	10	3541	1500	10	638			
	LUX	0.21	0.60	0.80	18247	38	3.3	68	19680	2469	35	21	2027	4647	28	3331			
CHAI	GAN	0.50	0.61	1.11	17066	31	4.7	104	20872	1719	52	12	3229	1386	29	1382			
	LUX	0.14	1.17	1.32	20078	19	3.5	46	18648	2711	67	23	1956	7400	23	8771			
CHA2	GAN	0.64	0.38	1.02	14037	20	3.5	53	22077	2038	34	11	2701	1766	18	1645			
	LUX	0.14	0.87	1.01	20061	21	3.6	53	22329	2441	47	30	2224	8854	19	8103			
FLO	GAN	0.35	1.80	2.15	13113	126	2.9	65	18415	2335	84	1	2512	1754	239	3285			
	LUX	0.32	1.36	1.68	17443	53	2.8	44	23000	3519	109		2285	8778	78	13416			
GR	GAN	0.58	2.39	2.97	17218	5	3.7	83	18424	2664	39	2	1757	304	13	823			
	LUX	0.29	3.36	3.65	18264	6	2.7	95	19007	1886	35	2	1130	946	20	3280			
GRAY	GAN	0.11	0.47	0.58	22584	11	6.5	72	17133	3332	71	1	2409	1331	6	691			
	LUX	0.06	0.37	0.43	23787	4	8.4	139	20640	3224	77	3	2169	5772	2	2424			
LIE	GAN	0.38	0.95	1.33	11344	138	11.4	172	22667	1967	305	3	2405	3604	170	4410			
	LUX	0.23	1.60	1.83	9556	11	5.0	46	25280	2170	202	4	1680	10248	19	17313			
MAS	GAN	0.22	0.11	0.33	19336	23	9.2	187	17494	1953	32	10	2489	948	6	269			
	LUX	0.10	0.28	0.39	20026	44	11.1	67	22022	2220	40	25	1882	3055	15	1053			

**Table S2 continued.** Average biomass production, shoot metal concentrations and Cd and Zn uptake of *N. caerulea* on 24 soils (control, unfertilized).

Soil	Pop.	Reproductive Biomass (g)	Vegetative biomass (g)	Total biomass (g)	Shoot concentrations ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )											Uptake ( $\mu\text{g plant}^{-1}$ )		
					Ca	Cd	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Ni	P	Zn	Cd uptake	Zn uptake		
MOE1	GAN	0.31	1.50	1.80	21323	37	4.0	148	16471	3084	83	2	2323	2308	58	3541		
	LUX	0.23	1.87	2.10	17817	6	2.6	81	15972	2766	58	2	1567	5500	12	10528		
MOE2	GAN	0.97	1.28	2.25	20297	6	3.6	83	22605	2818	56	2	2122	673	11	1209		
	LUX	0.24	1.85	2.09	23156	9	2.7	46	30916	2376	55	3	1603	1820	17	3281		
NAV	GAN	0.26	0.17	0.43	15008	17	5.5	36	20082	2495	33	9	3051	1146	7	449		
	LUX	0.01	0.43	0.43	19360	29	6.7	66	16270	2576	46	23	1488	4010	12	1647		
RUE	GAN	0.15	0.09	0.24	24268	5	5.5	176	19786	2507	42	6	2807	468	1	107		
	LUX	0.03	0.17	0.19	24916	7	4.3	147	15474	1775	40	10	1209	1059	2	270		
SER1	GAN	0.45	0.34	0.78	12371	44	4.7	207	25356	2734	40	6	3137	1696	32	1245		
	LUX	0.13	0.92	1.05	16661	51	3.3	78	24979	3201	47	18	1798	8526	50	8367		
SER2	GAN	0.35	0.85	1.21	12748	56	3.7	68	22237	2229	57	4	2705	1962	60	2082		
	LUX	0.20	1.76	1.97	14563	20	2.8	53	24540	2293	64	5	1737	5564	35	9763		
SOL6	GAN	0.39	0.43	0.82	14877	36	3.8	58	24565	2739	42	4	3142	1433	27	1077		
	LUX	0.11	1.07	1.18	19326	77	3.3	55	26741	3669	53	15	1892	7056	82	7566		
TIL	GAN	0.26	0.30	0.56	14407	15	4.4	94	24631	3079	44	2	2958	1089	8	547		
	LUX	0.07	0.31	0.38	17006	7	2.7	99	17956	2256	31	3	1695	2356	3	876		
TIN	GAN	0.47	0.73	1.19	12787	25	3.1	84	20277	2155	62	1	2357	1362	28	1508		
	LUX	0.15	1.24	1.38	16245	12	2.8	64	22599	2664	77	3	1868	6077	15	7924		
WIE	GAN	0.25	0.04	0.29	14107	3	3.9	45	21364	2650	39	2	2387	652	1	294		
	LUX	0.01	0.28	0.28	14073	8	3.4	45	20177	1790	39	9	1481	2421	2	640		
TOT	MOY	<b>0.33</b>	<b>0.73</b>	<b>1.06</b>	<b>16888</b>	<b>28</b>	<b>4.9</b>	<b>127</b>	<b>21585</b>	<b>2588</b>	<b>60</b>	<b>5</b>	<b>2673</b>	<b>1249</b>	<b>33</b>	<b>1272</b>		
	MIN	0.10	0.18	0.31	10342	4	2.8	47	16916	1760	27	1	1834	280	1	126		
	MAX	0.75	3.16	3.91	28410	122	10.7	456	27920	4160	269	12	3177	3635	215	4753		
	MOY	<b>0.13</b>	<b>1.02</b>	<b>1.15</b>	<b>18333</b>	<b>19</b>	<b>4.3</b>	<b>118</b>	<b>21960</b>	<b>2361</b>	<b>58</b>	<b>11</b>	<b>1761</b>	<b>4293</b>	<b>19</b>	<b>5198</b>		
	MIN	0.03	0.22	0.27	10185	4	2.5	44	17209	1466	28	1	1017	345	1	198		
	MAX	0.43	3.14	3.57	26058	67	10.5	1078	30546	3499	187	29	2235	11080	78	24277		



**Table S3.** Analysis of variance of shoot biomass (total, vegetative and reproductive), shoot concentrations in Cd and Zn, and metal uptake of two populations (POP) of *N. caerulea* (one calamine, Ganges, and one non-metalliferous, LUX) For each factor (SOIL = Origin of soil, TREAT = Treatment, POP = Population) and interactions, the number of degrees of freedom (d.f.), mean square (MS), F value, and level of significance associated (\*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001; \*P < 0.05; P < 0.1; ns, not significant) are given. The interactions between factors that were not significant were removed from the ANOVA models (Crawley 2012).

	Total biomass			Vegetative biomass			Reproductive biomass						
	d.f.	MS	F	d.f.	MS	F	d.f.	MS	F				
SOIL	23	8.459	47.06 ***	23	8.312	25.45 ***	23	3.848	4.06 ***				
TREAT	2	0.196	1.09 <sup>ns</sup>	2	0.424	1.3 <sup>ns</sup>	2	1.360	0.24 <sup>ns</sup>				
POP	1	0.256	1.42 <sup>ns</sup>	1	20.364	62.36 ***	1	57.160	60.37 ***				
SOIL × TREAT	46	0.465	2.59 ***	46	0.590	1.81 **	434	0.947					
SOIL × POP	23	0.269	1.5 •	23	0.476	1.46 •							
Residuals	360	0.180		2	1.118	3.42 *							
				Residuals	358	0.327							
	Cd shoot concentration			Zn shoot concentration			Cd uptake			Zn uptake			
	d.f.	MS	F	d.f.	MS	F	d.f.	MS	F	d.f.	MS	F	
SOIL	23	15.653	68.81 ***	23	17.128	74.82 ***	23	35.174	96.97 ***	23	48.162	102.11 ***	
TREAT	2	2.940	12.93 ***	2	1.730	7.57 ***	2	1.995	5.51 ***	2	1.045	2.21 <sup>ns</sup>	
POP	1	7.970	35.02 ***	1	343.440	1500 ***	1	4.230	11.66 ***	1	391.680	830 ***	
SOIL × TREAT	46	0.373	1.64 **	46	0.478	2.09 ***	46	0.847	2.33 ***	46	1.383	2.93 ***	
SOIL × POP	23	4.047	17.79 ***	23	1.053	4.6 ***	23	3.763	10.38 ***	23	2.287	4.85 ***	
Residuals	346	0.227		2	0.645	2.83 •	346	0.363		2	1.365	2.89 •	
				Residuals	345	0.229				Residuals	345	0.472	

\* Crawley, M. J., 2012. The R book. John Wiley & Sons.

**Table S4.** Results of model averaging of linear regression models aiming at explaining the variation of biomass production of *M. caeruleus* as a function of 16 soil variables (lines) on 21 soils (3 soils with high soil Pb concentrations LIE, MOE2 were removed from the initial 24 soils). Only the variables significantly supported by the models (AICc weight  $w > 0.7$ ) are considered (in bold). Coefficient estimates are the averaged coefficients for each standardized soil variable ( $\pm$  unconditional standard error).

	GAN				LUX					
	freq	w	w av. coef	av. se	freq	w	w av. coef	av. se		
(Intercept)	1.000	1.000	(Intercept)	1.000	1.000	(Intercept)	1.000	-0.196	0.064	
OM	<b>0.474</b>	<b>0.999</b>	GC	0.474	0.190	OM	<b>0.474</b>	<b>0.235</b>	<b>0.008</b>	<b>0.019</b>
N03	<b>0.474</b>	<b>0.996</b>	PERM	0.474	0.252	<b>Pb_ech</b>	<b>0.474</b>	<b>0.962</b>	0.000	0.024
<b>Pb_ech</b>	<b>0.474</b>	<b>0.996</b>	SAND	0.474	0.654	SAND	<b>0.474</b>	<b>0.945</b>	<b>-0.320</b>	<b>0.101</b>
<b>Cu_ech</b>	<b>0.474</b>	<b>0.926</b>	CARB	0.474	0.250	N03	0.474	0.798	-0.010	0.031
SAND	0.474	0.654	OM	<b>0.474</b>	<b>0.999</b>	Ca_ech	0.474	1.000	0.392	0.075
NH4	0.474	0.640	N03	<b>0.474</b>	<b>0.996</b>	Fe_ech	0.474	0.798	0.159	0.077
Mg_ech	0.474	0.504	NH4	0.474	0.640	P_ech	0.474	0.429	0.001	0.022
K_ech	0.474	0.363	Ca_ech	0.474	0.239	Mg_ech	0.474	0.351	-0.115	0.074
Zn_ech	0.474	0.309	Cd_ech	0.474	0.219	Cd_ech	0.474	0.327	0.051	0.058
PERM	0.474	0.252	<b>Cu_ech</b>	<b>0.474</b>	<b>0.926</b>	CARB	0.474	0.265	-0.009	0.028
CARB	0.474	0.250	Fe_ech	0.474	0.245	K_ech	0.474	0.439	0.057	0.052
Fe_ech	0.474	0.245	K_ech	0.474	0.363	Zn_ech	0.474	0.250	-0.011	0.027
Ca_ech	0.474	0.239	Mg_ech	0.474	0.504	Cu_ech	0.474	0.243	-0.036	0.040
Cd_ech	0.474	0.219	P_ech	0.474	0.198	GC	0.474	0.235	0.045	0.043
P_ech	0.474	0.198	<b>Pb_ech</b>	<b>0.474</b>	<b>0.996</b>	PERM	0.474	0.219	<b>0.296</b>	<b>0.096</b>
GC	0.474	0.190	Zn_ech	0.474	0.309	NH4	0.474	0.214	-0.020	0.040

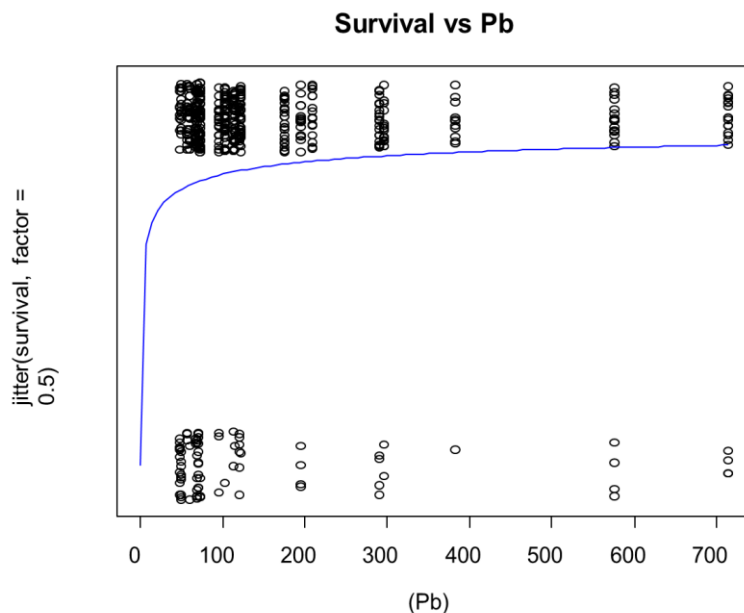
**Table S5.** Analysis of covariance of total shoot biomass of two populations of *N. caerulea* (one calamine, Ganges, and one non-metallicolous, Wilwerwiltz). For each factor (TREAT = Treatment), cofactor (NH<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub>) and interactions, the number of degrees of freedom (d.f.), mean square (MS), F value, and level of significance associated (\*\*P < 0.001; \*P < 0.01; P < 0.05; ·P < 0.1; ns, not significant) are given.

	d.f.	MS	F
TREAT	2	0.0105	0.02 <sup>ns</sup>
N-NH <sub>4</sub>	1	66.876	150 <sup>***</sup>
N-NO <sub>3</sub>	1	3.437	7.72 <sup>**</sup>
TREAT × N-NH <sub>4</sub>	2	0.276	0.62 <sup>ns</sup>
TREAT × N-NO <sub>3</sub>	2	2.528	5.68 <sup>**</sup>
Residuals	447		

**Table S7.** Results of the logistic regression of survival of *N. caerulea* plants after 20 weeks on soil exchangeable Pb

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z )
(Intercept)	-0.2512	0.8834	-0.284	0.7761
log(Pb)	0.4101	0.1884	2.177	<b>0.0295 *</b>

Null deviance: 448.53 on 515 degrees of freedom  
Residual deviance: 443.36 on 514 degrees of freedom  
AIC: 447.36

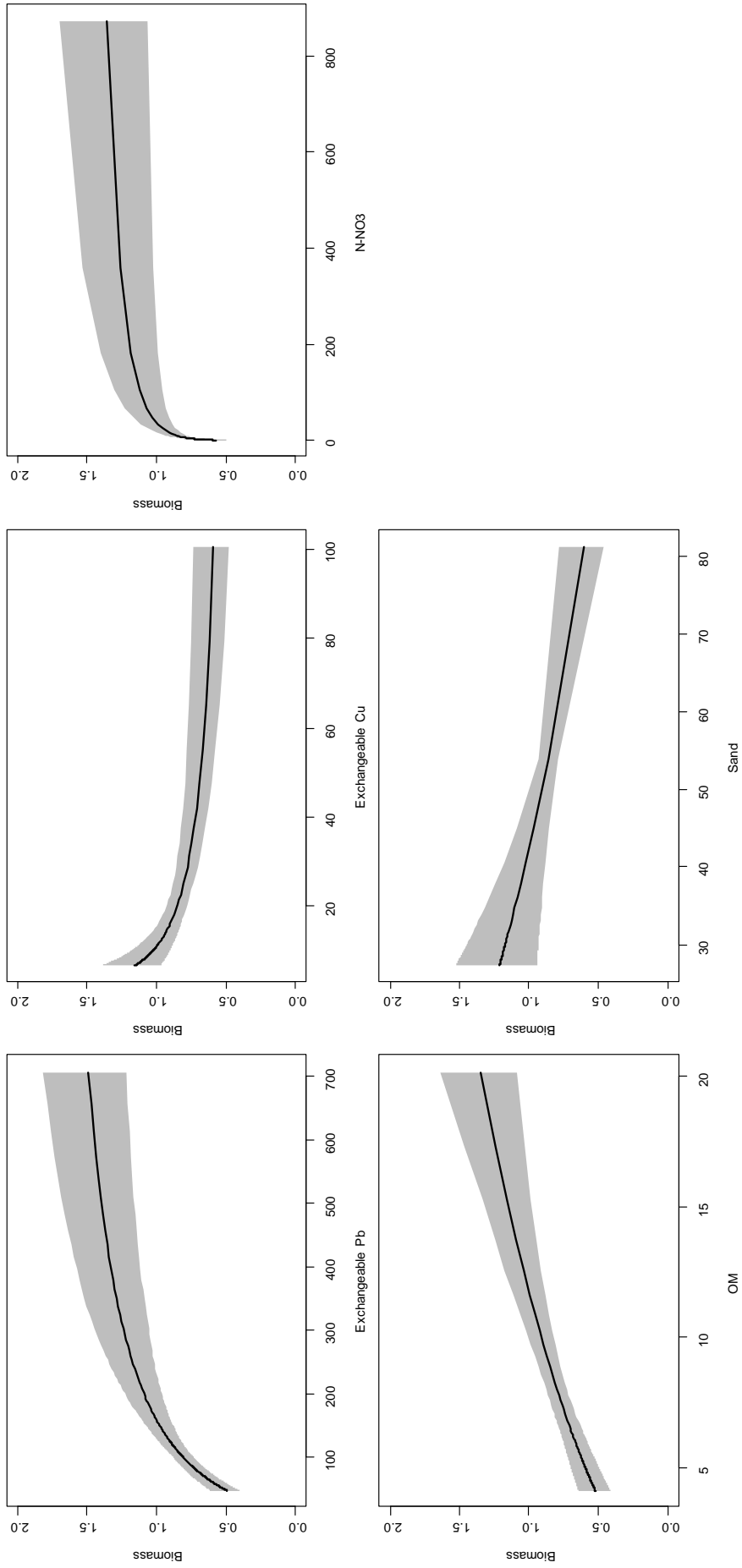


**Table S6.** Correlations (Pearson) between transformed soil variables measured on the 24 field contaminated soils used in the pot experiment. Values in bold correspond to coefficients  $|r| > 0.7$ .

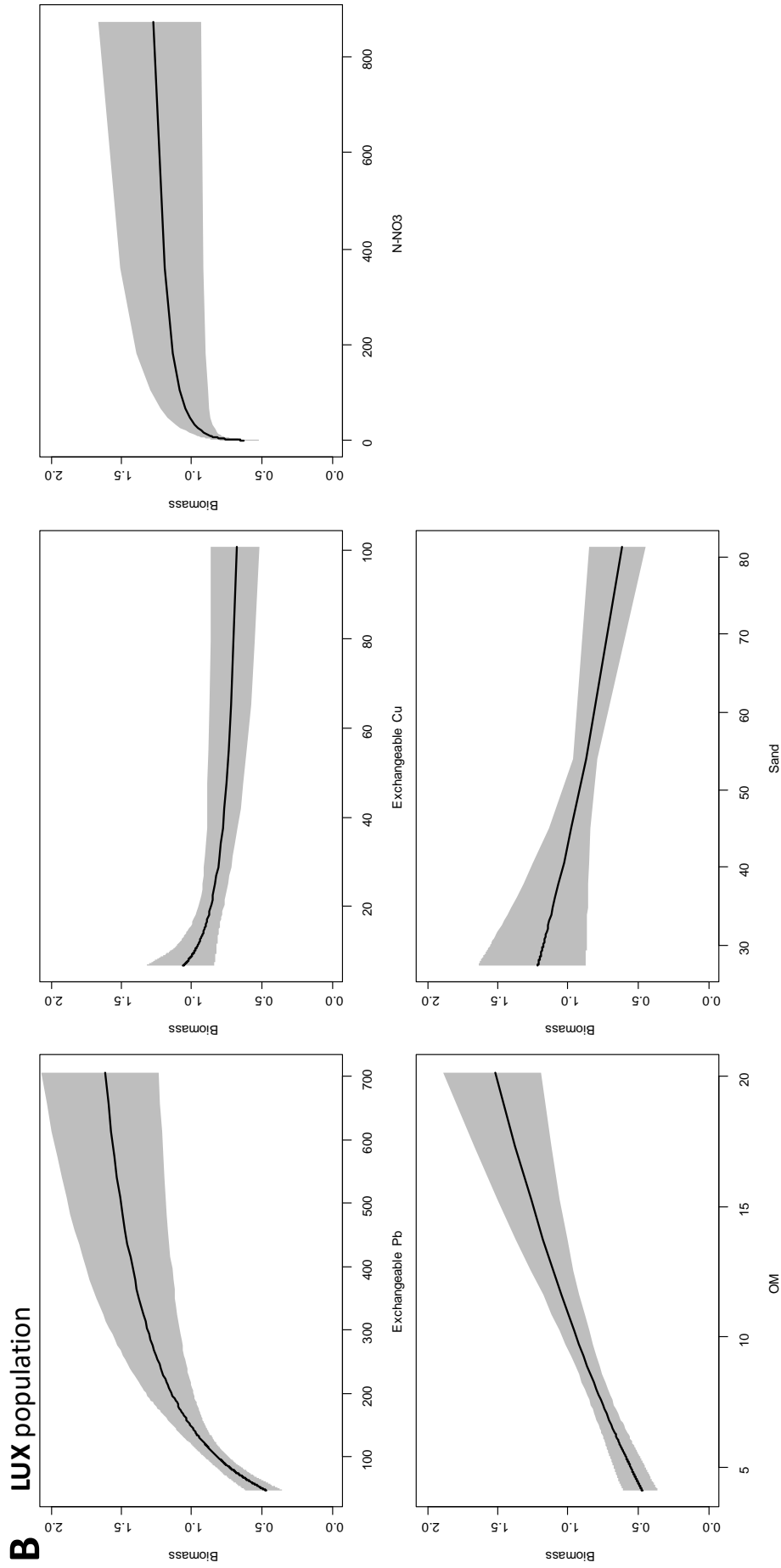
	BD	GC	PI	SAND	SILT	CLAY	CARB	pH	CEC	OM	N_NO3	N_NH4	Ca	Cd	Cu	Fe	K	Mg	Ni	P	Pb	Zn
BD	<b>1.00</b>	-0.10	<b>-0.71</b>	0.12	-0.07	-0.24	0.48	0.68	<b>-0.82</b>	<b>-0.92</b>	-0.49	-0.41	0.17	-0.41	-0.08	-0.40	-0.54	-0.46	-0.57	-0.01	0.04	-0.47
GC	-0.10	<b>1.00</b>	0.05	0.32	-0.26	-0.36	-0.42	-0.10	-0.09	0.06	0.13	-0.19	-0.14	-0.01	0.36	0.14	-0.30	-0.19	0.12	-0.46	0.12	0.02
PI	<b>-0.71</b>	0.05	<b>1.00</b>	0.17	-0.17	-0.22	-0.40	-0.54	0.54	0.54	0.50	0.22	-0.16	0.07	-0.09	0.39	0.57	0.43	0.34	0.13	-0.09	0.17
SAND	0.12	0.32	0.17	<b>1.00</b>	<b>-0.99</b>	<b>-0.80</b>	0.12	0.13	-0.23	-0.30	0.34	-0.39	-0.09	-0.54	0.03	-0.17	-0.40	-0.13	-0.35	-0.40	0.17	-0.39
SILT	-0.07	-0.26	-0.17	<b>-0.99</b>	<b>1.00</b>	<b>0.71</b>	-0.13	-0.12	0.17	0.24	-0.33	0.36	0.10	0.50	0.00	0.19	0.39	0.13	0.33	0.37	-0.18	0.36
CLAY	-0.24	-0.36	-0.22	<b>-0.80</b>	<b>0.71</b>	<b>1.00</b>	-0.04	-0.10	0.32	0.44	-0.33	0.36	0.04	0.52	-0.02	0.06	0.29	0.02	0.35	0.36	-0.15	0.38
CARB	0.48	-0.42	-0.40	0.12	-0.13	-0.04	<b>1.00</b>	<b>0.74</b>	-0.18	-0.43	-0.41	-0.44	0.58	-0.48	-0.25	-0.64	-0.19	-0.01	-0.49	0.08	-0.16	-0.49
pH	0.68	-0.10	-0.54	0.13	-0.12	-0.10	<b>0.74</b>	<b>1.00</b>	-0.32	-0.60	-0.50	-0.62	0.64	-0.54	-0.11	<b>-0.83</b>	-0.26	-0.15	-0.64	-0.32	-0.14	-0.57
CEC	<b>-0.82</b>	-0.09	0.54	-0.23	0.17	0.32	-0.18	-0.32	<b>1.00</b>	<b>0.79</b>	0.39	0.23	0.27	0.30	-0.13	0.15	0.55	<b>0.71</b>	0.30	0.03	-0.09	0.32
OM	<b>-0.92</b>	0.06	0.54	-0.30	0.24	0.44	-0.43	-0.60	<b>0.79</b>	<b>1.00</b>	0.28	0.44	-0.13	0.56	0.15	0.33	0.45	0.31	0.62	0.07	0.02	0.61
N_NO3	-0.49	0.13	0.50	0.34	-0.33	-0.33	-0.41	-0.50	0.39	0.28	<b>1.00</b>	0.23	-0.25	0.15	-0.03	0.37	0.12	0.27	0.21	-0.20	0.01	0.16
N_NH4	-0.41	-0.19	0.22	-0.39	0.36	0.36	-0.44	-0.62	0.23	0.44	0.23	<b>1.00</b>	-0.41	0.66	0.08	0.55	0.22	-0.03	0.42	0.40	0.14	0.64
Ca	0.17	-0.14	-0.16	-0.09	0.10	0.04	0.58	0.64	0.27	-0.13	-0.25	-0.41	<b>1.00</b>	-0.29	-0.12	-0.52	0.10	0.39	-0.20	-0.17	0.04	-0.38
Cd	-0.41	-0.01	0.07	-0.54	0.50	0.52	-0.48	-0.54	0.30	0.56	0.15	0.66	-0.29	<b>1.00</b>	0.38	0.48	0.24	0.04	0.67	0.27	0.35	<b>0.85</b>
Cu	-0.08	0.36	-0.09	0.03	0.00	-0.02	-0.25	-0.11	-0.13	0.15	-0.03	0.08	-0.12	0.38	<b>1.00</b>	0.09	-0.10	-0.19	0.54	-0.23	0.32	0.42
Fe	-0.40	0.14	0.39	-0.17	0.19	0.06	-0.64	<b>-0.83</b>	0.15	0.33	0.37	0.55	-0.52	0.48	0.09	<b>1.00</b>	0.16	0.20	0.54	0.47	0.01	0.42
K	-0.54	-0.30	0.57	-0.40	0.39	0.29	-0.19	-0.26	0.55	0.45	0.12	0.22	0.10	0.24	-0.10	0.16	<b>1.00</b>	0.58	0.26	0.22	-0.18	0.12
Mg	-0.46	-0.19	0.43	-0.13	0.13	0.02	-0.01	-0.15	<b>0.71</b>	0.31	0.27	-0.03	0.39	0.04	-0.19	0.20	0.58	<b>1.00</b>	0.09	0.18	-0.24	-0.04
Ni	-0.57	0.12	0.34	-0.35	0.33	0.35	-0.49	-0.64	0.30	0.62	0.21	0.42	-0.20	0.67	0.54	0.54	0.26	0.09	<b>1.00</b>	0.21	0.20	0.66
P	-0.01	-0.46	0.13	-0.40	0.37	0.36	0.08	-0.32	0.03	0.07	-0.20	0.40	-0.17	0.27	-0.23	0.47	0.22	0.18	0.21	<b>1.00</b>	-0.15	0.26
Pb	0.04	0.12	-0.09	0.17	-0.18	-0.15	-0.16	-0.14	-0.09	0.02	0.01	0.14	0.04	0.35	0.32	0.01	-0.18	-0.24	0.20	-0.15	<b>1.00</b>	0.38
Zn	-0.47	0.02	0.17	-0.39	0.36	0.38	-0.49	-0.57	0.32	0.61	0.16	0.64	-0.38	<b>0.85</b>	0.42	0.42	0.12	-0.04	0.66	0.26	0.38	<b>1.00</b>

**Figure S1.** Effect plots of biomass production of GAN (A) and LUX (B) populations of *N. caerulescens* grown on 24 control soils for the soil variables selected with model averaging ( $w > 0.7$ , Fig. 3). The response variable and the predictors are back-transformed and/or back-normalized, and a 95-percent pointwise confidence interval is drawn around the estimated effect. Soil exchangeable Cd and Zn concentrations are in logarithmic scale.

**A** GAN population

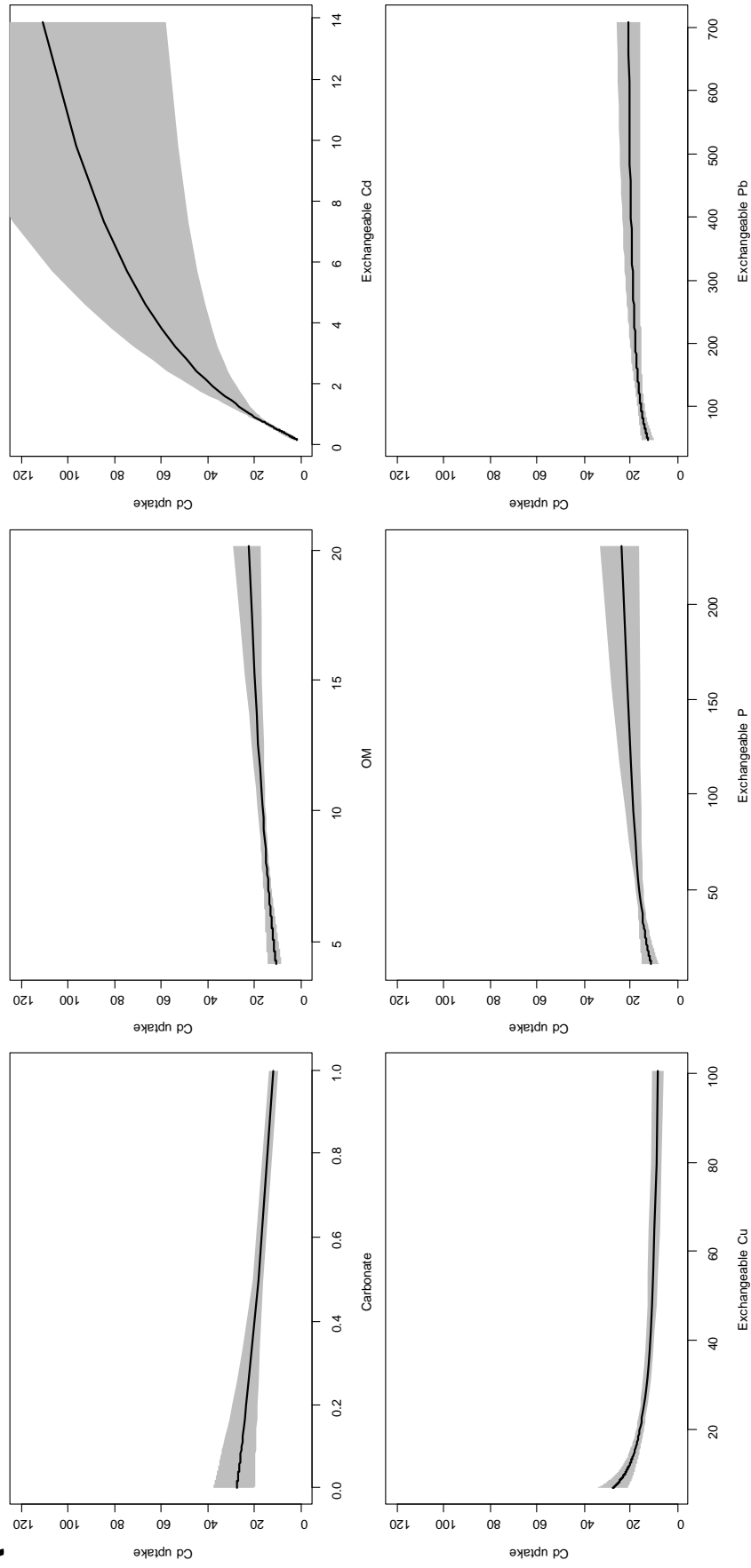


**Figure S1.** Effect plots of biomass production of GAN (A) and LUX (B) populations of *N. caerulescens* grown on 24 control soils for the soil variables selected with model averaging ( $w > 0.7$ , Fig. 3). The response variable and the predictors are back-transformed and/or back-normalized, and a 95-percent pointwise confidence interval is drawn around the estimated effect. Soil exchangeable Cd and Zn concentrations are in logarithmic scale.



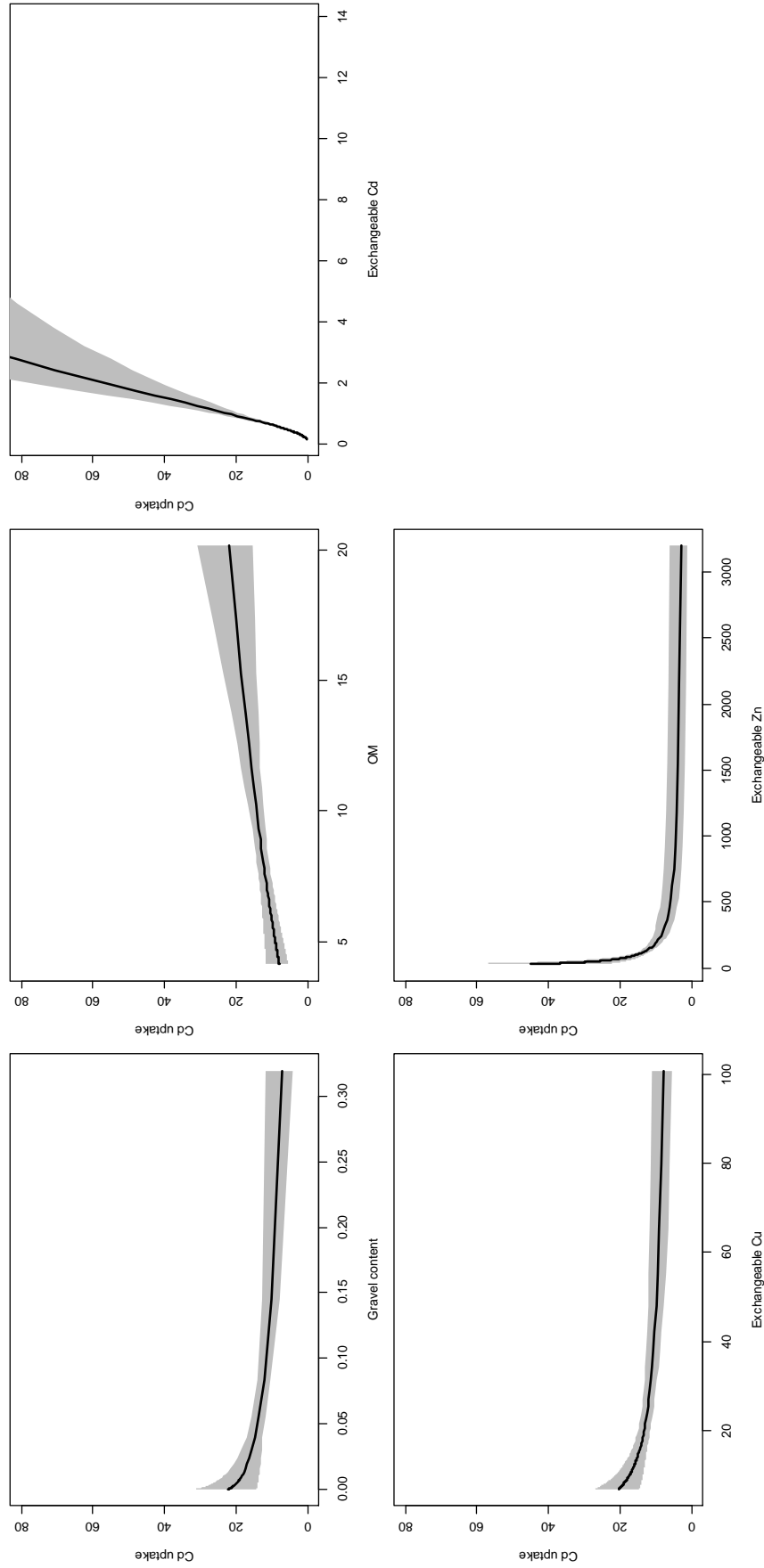
**Figure S2.** Effect plots of Cd uptake of GAN and LUX populations of *N. caerulea* grown on 24 control soils for the soil variables selected with model averaging ( $w > 0.7$ ; Fig. 4 and 5). The response variable and the predictors are back-transformed and/or back-normalized, and a 95-percent pointwise confidence interval is drawn around the estimated effect. Soil exchangeable Cd and Zn concentrations are in logarithmic scale.

**A** GAN population



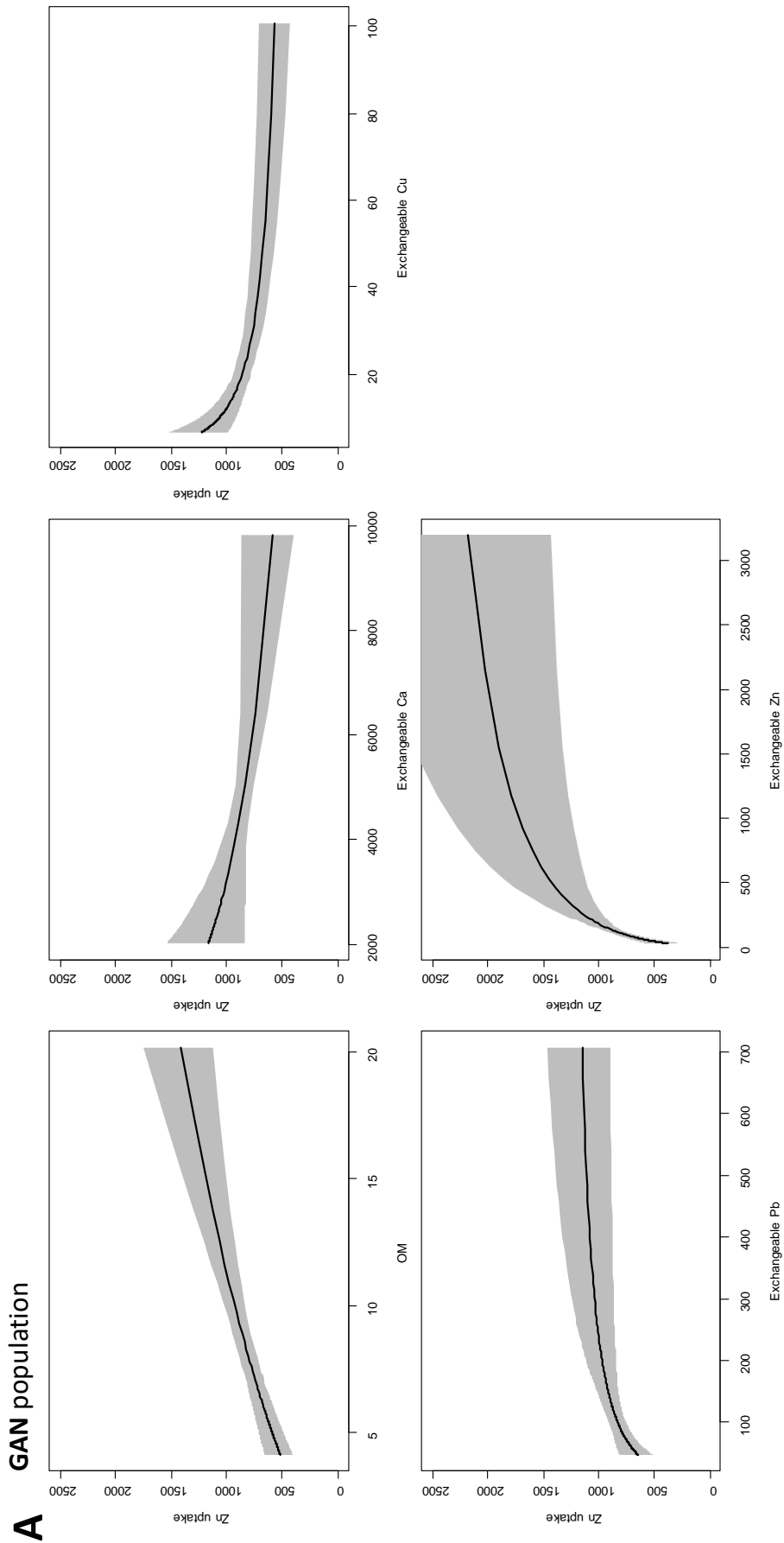
**Figure S2.** Effect plots of Cd uptake of GAN and LUX populations of *N. caerulea* grown on 24 control soils for the soil variables selected with model averaging ( $w > 0.7$ , Fig. 4 and 5). The response variable and the predictors are back-transformed and/or back-normalized, and a 95-percent pointwise confidence interval is drawn around the estimated effect. Soil exchangeable Cd and Zn concentrations are in logarithmic scale.

**B LUX population**

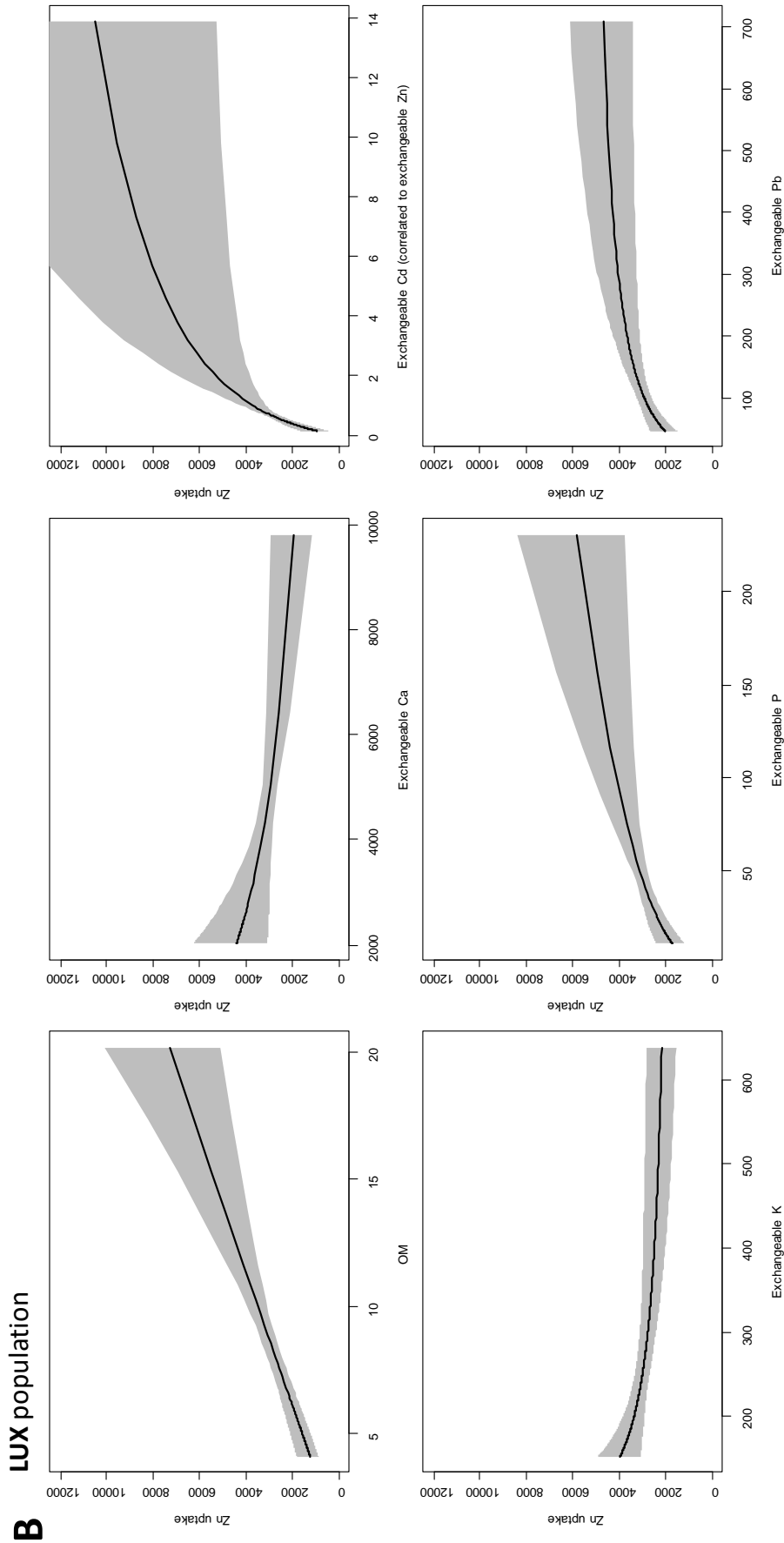




**Figure S3.** Effect plots of Zn uptake of GAN (A) and LUX (B) populations of *N. caeruleus* grown on 24 control soils for the soil variables selected with model averaging ( $w > 0.7$ , Fig. 4 and 5). The response variable and the predictors are back-transformed and/or back-normalized, and a 95-percent pointwise confidence interval is drawn around the estimated effect. Soil exchangeable Cd and Zn concentrations are in logarithmic scale.



**Figure S3.** Effect plots of Zn uptake of GAN (A) and LUX (B) populations of *N. caerulea* grown on 24 control soils for the soil variables selected with model averaging ( $w > 0.7$ , Fig. 4 and 5). The response variable and the predictors are back-transformed and/or back-normalized, and a 95-percent pointwise confidence interval is drawn around the estimated effect. Soil exchangeable Cd and Zn concentrations are in logarithmic scale.



## 5. Annexe au chapitre 5

**Table S1** Results of likelihood ratio tests following GLMMs of the variation in winter mortality of *N. caeruleus* from mother plants selected at GR and NAV sites. Levels of significance associated to  $\chi^2$  test: \*\* P < 0.01; ns, not significant).

		GR			NAV		
		Likelihood ratio	df	p (> $\chi^2$ )	Likelihood ratio	df	p (> $\chi^2$ )
GAN	Type of mother	0.5	2	ns	3.9	2	ns
	Soil	0.61	1	ns	0.18	1	ns
	Type of mother × Soil	2.41	2	ns	0.94	2	ns
LUX	Type of mother	3.22	2	ns	0.88	2	ns
	Soil	0.63	1	ns	7.65	1	**
	Type of mother × Soil	1.71	2	ns	2.98	2	ns



---

# Publications et communications

---

## Publications dans des revues à comité de lecture

**Jacobs, A.**, Drouet, T., Noret, N., 2018b. Field evaluation of cultural cycles for improved cadmium and zinc phytoextraction with *Noccaea caerulescens*. *Plant Soil*, 430, 381–394.

**Jacobs, A.**, De Brabandere, L., Drouet, T., Sterckeman, T., Noret, N., 2018a. Phytoextraction of Cd and Zn with *Noccaea caerulescens* for urban soil remediation: influence of nitrogen fertilization and planting density. *Ecol. Eng.* 116, 178-187.

**Jacobs, A.**, Drouet, T., Sterckeman, T., Noret, N., 2017. Phytoremediation of urban soils contaminated with trace metals using *Noccaea caerulescens*: comparing non-metallicolous populations to the metallicolous ‘Ganges’ in field trials. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 8176–8188.

Muledi, J.I.\*, Bauman, D.\*, Drouet, T., Vleminckx, J., **Jacobs, A.**, Meerts, P. *et al.* 2017. Fine-scale habitats influence tree species assemblage in a miombo forest. *Journal of Plant Ecology* 10: 958-969.

## Communications orales

**Jacobs, A.**, Drouet, T., Noret, N., 2017. Phytoextraction of trace metals with *Noccaea caerulescens* in field trials: improving metal uptake with cultural practices – 14<sup>th</sup> International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements (ICOBTE), ETH Zurich, Switzerland, 17-20/07/17.

**Jacobs, A.**, Drouet, T., Noret, N., 2017. La pollution des sols à Bruxelles sous l’angle de la phytoremédiation - Journées d’étude « Bruxelles en recherches » ULB, 24/05/2017.

**Jacobs, A.**, Drouet, T., Noret, N., 2016. Phytoextraction of trace metals with *Noccaea Caerulescens* for urban agriculture development. 18<sup>th</sup> International Conference on Heavy Metals in the Environment (ICHMET), UGent, Belgium, 13/09/16.





## Phytoextraction du cadmium et du zinc de sols urbains : optimisation de la culture de *Noccaea caerulescens*

La problématique de la contamination des sols urbains et agricoles par les éléments traces métalliques (ETM) est un enjeu majeur en termes de santé publique et de protection de l'environnement. Dans le contexte de l'expansion de l'agriculture urbaine et des jardins communautaires souvent localisés sur des sites contaminés, il existe un intérêt fort pour le développement de méthodes de décontamination moins coûteuses que les méthodes de remédiation conventionnelles et qui préservent l'intégrité et la fertilité du sol. La phytoextraction est une technique écologique de remédiation des sols contaminés en ETM qui repose sur l'utilisation de plantes accumulatrices de métaux pour diminuer les concentrations en ETM dans le sol. La crucifère européenne *Noccaea caerulescens* (tabouret calaminaire), hyperaccumulatrice de zinc (Zn), cadmium (Cd) et nickel (Ni), s'est imposée comme plante phytoextractrice modèle vu ses étonnantes capacités d'accumulation *in natura*. Cependant, les conditions de culture optimales de *N. caerulescens* sont largement méconnues.



Cette thèse se penche sur l'optimisation de la phytoextraction du Cd et du Zn avec *N. caerulescens* par une approche d'essais de terrain à Bruxelles. Nous y abordons l'influence du choix des populations et d'une éventuelle sélection. L'effet de plusieurs pratiques de culture, ainsi que l'influence des paramètres édaphiques sur la croissance et l'accumulation des ETM y sont également étudiés. Ce travail apporte de nouvelles connaissances sur l'itinéraire technique le plus performant pour cultiver *N. caerulescens* et sur l'efficacité d'extraction du Cd et du Zn en conditions de terrain.

