

# Évaluation morpho-physiologique de trois clones de *Salix* des zones semi-arides soumis à un excès de zinc en conditions hydroponiques

Mejda Abassi, Mohammed S. Lamhamedi, Chadlia Hachani et Zoubeir Béjaoui

**Résumé :** L'usage des pesticides à base de sels de zinc (Zn) en agriculture intensive engendre son accumulation continue dans le sol. Le recours à l'utilisation du genre *Salix* constitue une solution viable à long terme pour extraire le Zn en excès. Trois clones de *Salix* sp., originaires de la zone méditerranéenne sud, ont été évalués quant à leur degré de tolérance à quatre différentes concentrations de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,4, 250, 500 et 750  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) pendant 45 jours. À la fin de cette période, plusieurs variables écophysiological ont été évaluées. Les traitements appliqués ont montré des différences génotypiques relatives à la sensibilité au stress causé par le Zn. Cette variabilité clonale très prononcée s'est manifestée par l'apparition de symptômes de toxicité et des perturbations physiologiques, ainsi que par une réduction de croissance. Nos résultats laissent présager les possibilités de l'utilisation des clones de *Salix* comme modèle agroforestier pour lutter contre l'accumulation du zinc dans les sols agricoles afin que ces derniers conservent leur valeur agronomique, leur fertilité et leur potentiel productif.

**Mots-clés :** *Salix*, zinc, phytotoxicité, tolérance, écophysiology, phytorestauration.

**Abstract:** Pesticides based on zinc (Zn) salts used for intensive agriculture continuously accumulate in the soil. Using the genus *Salix* is a viable long-term solution to extract excess Zn from soil. Three *Salix* spp. clones from the southern Mediterranean region were rated for their tolerance levels to four different concentrations of  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.4, 250, 500, and 750  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). At the end of a 45-day period, many ecophysiological variables were measured. Following treatments, stress response to Zn varied among genotypes. These marked clonal variations were expressed as toxicity symptoms, physiological disturbances, and reduced growth. Our results suggest that *Salix* clones could be used as agroforestry model to counteract Zn accumulation in agricultural soils, allowing them to maintain their agronomic value, fertility, and productive potential. [Journal translation]

**Key words:** *Salix*, zinc, phytotoxicity, tolerance, ecophysiology, phytorestauration.

## Introduction

L'agriculture intensive et la pollution atmosphérique, causées par l'industrialisation accélérée, figurent parmi les causes de l'augmentation des concentrations des éléments traces métalliques (ETM) et la pollution chimique des sols agricoles (FAO 2002). En effet, certains ETM (Zn, Cu, Mg, Ni, Fe...) s'accumulent de plus en plus et affectent négativement la durabilité et la productivité des sols, ainsi que la préservation de la qualité des eaux souterraines. Par exemple, le zinc (Zn) est considéré parmi les polluants majeurs générés par les « secteurs industriels » (acier, émissions des minières, combustion du charbon, usines de transformation des métaux...) et agricole (fertilisants minéraux, pesticides et fongicides) (Lamb et al. 2010).

Le Zn se distingue par son accumulation continue dans les sols (Kopponen et al. 2001). Cet oligoélément est indispensable à l'état de trace pour de multiples processus physiologiques des plantes, notamment dans la multiplication cellulaire, le maintien de l'intégrité des membranes cellulaires (Disante et al. 2010) et l'assimilation du  $\text{CO}_2$  (Rout et Das 2009). Cependant, à fortes concentrations dans le

sol, il s'avère phytotoxique (D'Souza et Devaraj 2012) et conduit à une réduction significative de la croissance des plantes associée souvent à une baisse de la photosynthèse (Azzarello et al. 2012), de la conductance des stomates pour le  $\text{CO}_2$  (Sagardoy et al. 2009), de la synthèse de la chlorophylle (Reichman 2002) et de l'activité de la Rubisco (Cuypers et al. 2009). L'excès du Zn déclenche également des perturbations sévères spécifiques à l'absorption, le transport et la compartimentation des éléments minéraux essentiels à la croissance des plantes (Sagardoy et al. 2009).

La phytotoxicité des métaux lourds est généralement attribuable en partie à la production des espèces réactives de l'oxygène qui engendrent à leur tour un stress oxydatif (Shahid et al. 2014). Ce dernier cause un dysfonctionnement cellulaire et une peroxydation des lipides membranaires (Stohs et al. 2000) qui affectent négativement la perméabilité sélective des membranes (Azooz 2009). En raison de sa phytotoxicité, le zinc contribue à diminuer la qualité, la durabilité et la productivité des sols. En effet, la pollution atmosphérique sans frontière et l'usage répété des pesticides à base de sels de zinc en agriculture intensive

Reçu le 28 novembre 2017. Accepté le 28 février 2018.

**M. Abassi.** Laboratoire d'Ecologie Forestière, Institut National de Recherches en Génie Rural, Eaux et Forêts, Rue Hédi Elkarray, Elmenzah IV, BP 10, Ariana 2080, Tunisie.

**M.S. Lamhamedi.** Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs (MFFP), Direction de la recherche forestière, 2700, rue Einstein, Québec, QC G1P 3W8, Canada.

**C. Hachani et Z. Béjaoui.** Laboratoire d'Ecologie Forestière, Institut National de Recherches en Génie Rural, Eaux et Forêts, Rue Hédi Elkarray, Elmenzah IV, BP 10, Ariana 2080, Tunisie; Faculté des Sciences de Bizerte, Jarzouna 7021, Université de Carthage, Tunisie.

**Auteur correspondant :** Zoubeir Béjaoui (courriel : [zoubeirbe@yahoo.fr](mailto:zoubeirbe@yahoo.fr)).

Les droits d'auteur demeurent la propriété des auteurs ou de leur établissement. Il est possible d'obtenir (gratuitement dans la plupart des cas) l'autorisation de réutiliser du contenu en passant par [RightsLink](#).

représentent, à ce jour, une source de pollution chimique non négligeable des sols agricoles.

Afin de diminuer de façon significative l'augmentation de la concentration du Zn dans les couches arables des sols dédiés à l'agriculture, le recours à des espèces ligneuses à croissance rapide, caractérisées par un excellent potentiel de phytodépollution des métaux lourds, figure parmi les solutions pratiques de restauration, du maintien de la productivité des sols et de lutte contre l'érosion hydrique. Par exemple, le genre *Salix* se distingue par une production accrue de la biomasse aérienne et par son haut potentiel d'accumulation et de tolérance aux fortes concentrations vis-à-vis des ETM (Lu et al. 2013). À cause de sa grande surface foliaire et de son système racine bien développé, cette essence permet de mobiliser des quantités importantes du Zn en excès dans le sol (Klang-Westin et Eriksson 2003). Cependant, les clones de *Salix* présentent une grande variabilité génétique quant à leur tolérance aux ETM (Purdy et Smart 2008; Zhivotovsky et al. 2010). Ainsi, la sélection de clones appropriés s'avère cruciale pour le succès des opérations de lutte contre la pollution chimique des sols agricoles par les ETM. À notre connaissance, en Afrique du Nord, il n'y a aucune évaluation de la variabilité génétique des clones autochtones, originaires de la zone méditerranéenne sud, du genre *Salix*, basée sur des connaissances scientifiques solides quant à leur sélection précoce en matière de tolérance accrue aux ETM et d'adaptabilité au climat méditerranéen des zones semi-arides. À cet effet, la sélection de clones de *Salix* tolérants aux ETM sera basée sur leur aptitude à croître et à maintenir leur capacité des échanges gazeux en présence de différentes concentrations du Zn. Ainsi, notre hypothèse consiste à ce que les clones méditerranéens de *Salix* montrent une variabilité clonale très prononcée en matière d'accumulation et de tolérance des concentrations élevées du Zn et de réponses morpho-physiologiques.

Ce projet s'intègre dans le cadre de la mise en application opérationnelle de clones de *Salix* adaptés au climat méditerranéen des zones semi-arides comme modèle agroforestier spécifique à la phytoremédiation en matière d'atténuation des effets négatifs de l'accumulation du zinc dans les sols agricoles, de lutte contre l'érosion hydrique, de satisfaction des besoins des populations en produits ligneux en lien avec la sécurité alimentaire (FAO 2017). La sélection de clones performants contribuera à conserver la valeur agronomique et le potentiel productif de ces sols. Ainsi, l'objectif général de cette étude consiste à évaluer la variabilité morpho-physiologique clonale en réponse à différentes concentrations du Zn. Les réponses morpho-physiologiques de trois clones méditerranéens de *Salix* (*Salix alba* L., *Salix vitellina* L. et *Salix purpurea* L.) englobent les variables de croissance, les échanges gazeux, les concentrations en chlorophylles, en protéines totaux, en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), en polyphénols totaux, en proline, ainsi que la nutrition minérale.

## Matériel et méthodes

### Matériel végétal

Les plants ont été produits à partir de boutures prélevées sur trois clones de *Salix* méditerranéens (*Salix alba* L., *Salix vitellina* L. et *Salix purpurea* L.) originaire du nord-ouest de la Tunisie (latitude :  $36^{\circ}58'31''N$ ; longitude :  $9^{\circ}04'51''E$ ). Les boutures ligneuses ( $20 \pm 1,4$  cm de longueur et  $10,8 \pm 1,4$  mm de diamètre) ont été prélevées en février 2014 sur des rejets de souche âgés d'un an bien exposés au rayonnement photosynthétique actif. Le prélèvement des boutures a été effectué à la fin du stade de la dormance, et ce à la même hauteur afin que les boutures aient une architecture hydraulique relativement similaire.

### Bouturage, production de plants et conditions de culture

L'enracinement des boutures a été réalisé en conditions hydroponiques dans des pots sombres en plastique (30 cm diamètre  $\times$  15 cm profondeur) remplies avec de l'eau distillée à une hauteur

donnée. Près de la moitié de la longueur de chaque bouture est immergée dans l'eau distillée. Dans chaque pot, les boutures ont été maintenues suspendues par des bandes en mousse synthétique, dont le quart de leur longueur était soumise aux conditions environnementales extérieures (photopériode moyenne de 14 h, température journalière de  $29,6 \pm 4$  °C et humidité relative de  $64 \pm 5$  %) sous une ombrière. Cette dernière permet de diminuer l'intensité du rayonnement photosynthétique actif de 50 %. Les boutures ont été placées sur des plaques de polystyrène (1,5 cm épaisseur  $\times$  32 cm diamètre) préalablement perforé à l'emporte-pièce, à raison de 10 boutures par plaque.

Après 30 jours, près de 120 boutures par clone ont été bien enracinées. Seules les boutures ayant montré un bon débourrement et un enracinement adéquat ont été transférées sur des couvercles perforés adaptées à des pots en plastique (20 cm diamètre  $\times$  25 cm profondeur) contenant une solution de Hoagland (Hoagland et Arnon 1950) à demi-concentration, soit 5 L par pot, avec une densité de cinq boutures par pot. Les solutions ont été oxygénées de façon continue à l'aide de plusieurs pompes (modèle Hydroponic Air-Pump Hp-6500, Electrical Co., Ltd., Guangdong, Chine) à raison d'une pompe pour quatre pots. Après trois semaines d'acclimatation, des plants homogènes issus des différents clones ont été soumis pendant 45 jours à quatre traitements. Le zinc ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) est introduit dans les solutions nutritives (1/2 solution Hoagland) aux concentrations suivantes : 0 (témoin : T), 250, 500 ou  $750 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Les concentrations cibles des quatre traitements ont été contrôlées par un spectrophotomètre d'absorption atomique (modèle PU 9100, Philips, Cambridge, UK). La solution nutritive de chaque pot a été enrichie avec  $45 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de Fe (III)-EDTA.

Les plants ont été distribués selon un dispositif expérimental en cinq blocs aléatoires complets. Chaque bloc est composé de trois zones où chacune est assignée de façon aléatoire à un clone. Dans chaque zone 40 plants ont été utilisés qui correspondent aux quatre traitements (10 plants par clone par bloc  $\times$  4 traitements), à raison de cinq plants par pot, soit un total de 200 plants par clone (cinq blocs  $\times$  40 plants par clone par bloc). Les solutions des différents traitements ont été renouvelées deux fois par semaine et le pH de ces différentes solutions a été maintenu constant à  $5,9 \pm 0,3$  par addition de KOH (1 N). Tout au long de la durée de l'expérience, la conductivité électrique de la solution de chaque traitement a été maintenue à  $1,2 \pm 0,3 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ . Les variables suivantes ont été mesurées durant la période (mai-juin 2014) correspondante à la phase de croissance végétative active des plants de *Salix*.

### Croissance, échanges gazeux et concentrations en chlorophylles

Durant l'expérimentation, la croissance de la tige principale en hauteur des plants de *S. alba*, *S. vitellina* et *S. purpurea*, a été évaluée sur les mêmes plants tous les 15 jours en utilisant cinq plants pour chacun des traitements à raison d'un plant par clone par bloc par traitement. L'élongation foliaire a été évaluée, sur des feuilles juvéniles de rang 2 à 3 du sommet, tous les 2 jours après l'application des traitements sur cinq plants choisis aléatoirement par traitement, et ce durant les 12 premiers jours de l'expérience.

Les masses sèches des parties aériennes (MSA) et des racines (MSR) ont été déterminées après un séchage à l'étuve à 60 °C pendant 72 h, au début et à la fin des traitements en utilisant cinq plants choisis aléatoirement à raison d'un plant par clone par bloc par traitement. La surface foliaire totale ( $\text{cm}^2$ ) a été évaluée sur les mêmes plants qui ont servi aux mesures des MSA et des MSR, à l'aide d'un planimètre (modèle Paton electronic Pty Ltd, Adelaide, SA). L'indice de tolérance (IT) a été déterminé sur les mêmes plants qui ont servi aux mesures de la masse sèche produite, selon la formule (1) (Wilkins 1978) :

$$(1) \quad IT (\%) = \frac{\text{masse sèche des plants traités au zinc (g)}}{\text{masse sèche des plants témoins (T)(g)}} \times 100$$

Le taux de photosynthèse nette ( $A$ ), la conductance stomatique ( $g_s$ ) et le taux de transpiration ( $E$ ) ont été mesurés à l'aide d'un analyseur portable à infrarouge (modèle LCA 4, Analytical Development Company Limited, Herts, England) à raison de cinq plants choisis aléatoirement pour chacun des traitements dans les conditions suivantes : un flux photosynthétique actif de photons (PPFD) de  $740 \pm 52 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , une concentration en  $\text{CO}_2$  de  $350 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  et une température foliaire de  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ . Les mesures ont été effectuées entre 0900 et 1100 heures, sur des feuilles entières de rang 5 à 8, les plus exposées au rayonnement solaire, et ce après 45 jours d'imposition aux traitements.

L'estimation de la concentration relative en chlorophylles a été évaluée à la fin des traitements, en utilisant cinq plants choisis aléatoirement par traitement, sur des feuilles de rang 6 à 8 et les plus exposées au soleil, en utilisant un lecteur de chlorophylle (modèle SPAD-502, Minolta, Japon).

#### Dosage des éléments minéraux en relation avec le Zn

En plus du dosage du Zn, nous avons mis l'accent sur deux principaux oligoéléments en lien avec les interactions probables avec le Zn, notamment le Fe et le Mg. Nos observations n'ont pas révélé la présence de symptômes de déficience spécifiques aux éléments majeurs (azote, phosphore et potassium). Le dosage a été réalisé sur des échantillons (parties aériennes et racinaires) préalablement rincés à l'eau distillée puis séchés pendant 72 h à  $105^\circ\text{C}$  (Mo et Neilson 1994) en utilisant cinq plants choisis aléatoirement pour chacun des traitements. Les échantillons secs ont été broyés puis digérés en présence d'une solution de trois acides ( $\text{HNO}_3$  :  $\text{HClO}_4$  :  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; 10 : 4 : 1) pendant 2 h, sur une plaque chauffante à une température avoisinant  $300^\circ\text{C}$ . Les extraits, filtrés sur papier filtre (Whatman No. 1) sans cendre, ont été utilisés pour le dosage des éléments minéraux. Les éléments Fe, Mg et Zn ont été dosés par absorption atomique (modèle PU 9100, Philips, Cambridge, UK). Les concentrations ont été exprimées en  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ·masse sèche (MS). Le potentiel de phytoremédiation vis-à-vis du zinc chez les trois clones de *Salix* a été évalué, à la fin des traitements, au moyen des facteurs de bioaccumulation (FBA) et de translocation (FT) (Mackay et Fraser 2000).

$$(2) \quad \text{FBA} = \frac{\text{concentration du Zn dans la plante}}{\text{concentration du Zn dans la solution}}$$

$$(3) \quad \text{FT} = \frac{\text{concentration du Zn dans les parties aériennes}}{\text{concentration du Zn dans les racines}}$$

#### Détermination des fuites d'électrolytes, du peroxyde d'hydrogène, des protéines totales et des polyphénols totaux

Pour chaque traitement, l'intégrité des structures membranaires a été évaluée sur deux plants choisis aléatoirement par bloc, par des mesures directes d'efflux d'électrolytes selon le protocole de Campos et al. (2003). Ainsi, 20 disques foliaires ont été prélevés sur des feuilles situées en partie médiane à l'aide d'un emporte-pièce (5 mm de diamètre). Ces disques ont été trempés dans des tubes à essai stériles contenant 20 mL d'eau distillée, à l'obscurité et à une température de  $25^\circ\text{C}$  pendant 24 h. Ensuite, la conductivité libre ( $C_L$ ) du milieu initial a été mesurée à l'aide d'un conductimètre à microprocesseur (modèle Cellox 325, Multiline P3 PH/LF-SET, WTW GmbH, Weilheim, Germany) et exprimée en  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Après cette mesure, les tubes à essai ont été mis dans un bain-marie à  $100^\circ\text{C}$  pendant 1 h pour déterminer la fuite maximale de tous les électrolytes. Après refroidissement, la conductivité totale ( $C_T$ ) a été mesurée. La fuite d'électrolytes (FE) est définie comme suit :

**Tableau 1.** Analyse de variance pour différentes variables écophysiologiques dépendantes de trois clones de *Salix* en réponse à un excès de zinc.

Variable	Valeur p		
	Effet clone (1)	Effet traitement (2)	(1) × (2)
Masse sèche aérienne (MSA)	0,0084	0,0001	0,0963
Masse sèche racinaire (MSR)	0,0130	0,0001	0,1062
Teneur en eau relative (RWC)	0,0302	0,0260	0,4932
Assimilation nette	0,0012	0,0001	0,0154
Concentration en chlorophylles	0,0136	0,0010	0,6022
Peroxyde d'hydrogène	0,0012	0,0001	0,0386
Fuite d'électrolyte (FE)	0,0001	0,0001	0,0110
Polyphénols totaux	0,0100	0,0010	0,0408

$$(4) \quad \text{FE} (\%) = \frac{C_L}{C_T} \times 100$$

La concentration en peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a été déterminée selon la méthode de Velikova et al. (2000) en utilisant cinq échantillons de feuilles matures choisies aléatoirement pour chacun des traitements par bloc. Ces tissus frais (0,5 g) ont été homogénéisés à froid dans une solution d'acide trichloracétique (TCA) à 0,1 %. L'homogénéat a été ensuite centrifugé à 1200g pendant 15 min. Une aliquote de surnageant (0,5 mL) a été additionnée à 0,5 mL de tampon phosphate ( $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; pH = 7) et 1 mL d'une solution d'iodate de potassium ( $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). La densité optique du surnageant a été lue à 390 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

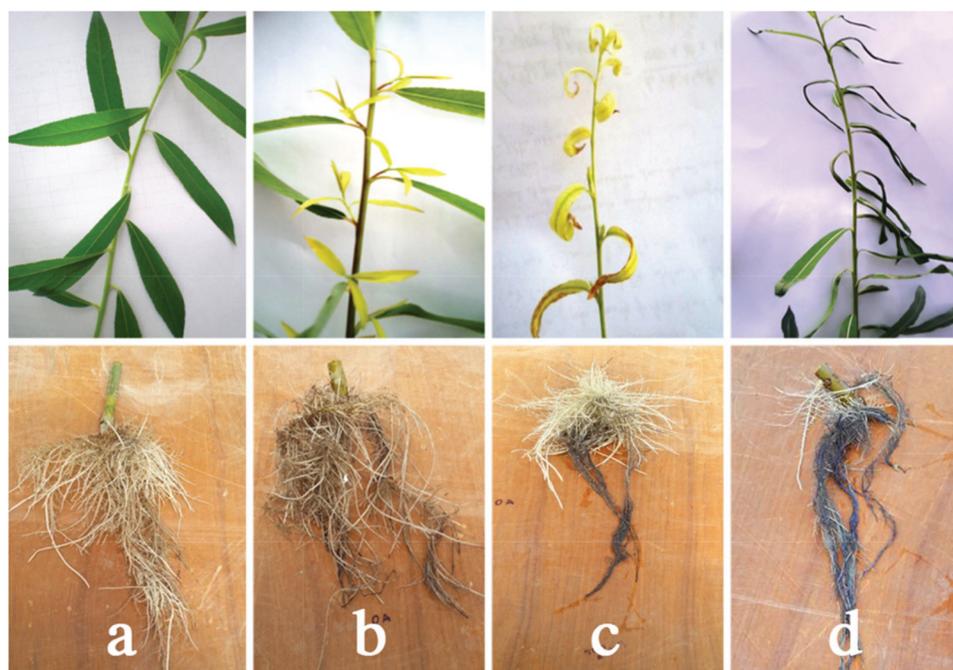
Pour chaque traitement, le dosage des protéines totales a été réalisé selon la méthode de Bradford (1976) sur cinq échantillons de feuilles matures fraîches (0,5 g) choisies aléatoirement par traitement par bloc. L'extraction a été faite après le broyage de ces tissus foliaires dans 10 mL de tampon phosphate ( $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; pH = 7) en présence de 0,5 g de polyvinylpyrrolidone (PVP). Après une centrifugation à froid de l'extrait obtenu pendant 15 min à 10 000g, le surnageant a été récupéré puis précipité avec 5 mL de sulfate d'ammonium 80 % ( $m/v$ ), et à nouveau centrifugé. Le culot protéique obtenu a été resuspendu dans 5 mL de tampon d'extraction et a été dosé au spectrophotomètre UV (modèle UV-1800 PC, Shimadzu, Kyoto, Japan) par réaction au bleu de Coomassie à la longueur d'onde de 595 nm.

La concentration en polyphénols totaux a été déterminée selon la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par Bursal et Gülçin (2011), à raison de cinq échantillons de feuilles matures choisies aléatoirement pour chacun des traitements. 100  $\mu\text{L}$  de l'échantillon de concentration  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ont été mélangés avec 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué puis ont été laissés reposer pendant 5 min. 900  $\mu\text{L}$  de carbonate de sodium 10 % ( $m/v$ ) ont été ajoutés à ce mélange. Après une incubation de 60 min à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance du réactif préparé a été déterminée à 765 nm par un spectrophotomètre (Lambda 35 UV/VIS, Perkin Elmer, USA). Les concentrations en polyphénols totaux des extraits foliaires sont exprimées en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme de masse sèche ( $\text{mg GAE}\cdot\text{g}^{-1}$  MS).

#### Analyses statistiques

Les données de chaque variable écophysiologique ont été soumises à une analyse de la variance à deux critères (clone, traitement) en utilisant le logiciel SPSS 16,0 (SPSS Institute Inc., Chicago, Illinois, USA). Pour chaque clone, les comparaisons des moyennes des variables mesurées entre les différents traitements ont été effectuées au seuil de 5 % par le test de Tukey. En présence d'interaction significative entre ces effets, des analyses séparées ont été effectuées pour préciser la signification des différences

**Fig. 1.** Aspect morphologique des feuilles, au bout de 20 jours, et du système racinaire, au bout de 45 jours, chez des plants de *Salix* (a) témoin ou soumis à un stress attribuable au zinc : (b) 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , (c) 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  et (d) 750  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . [Version en ligne en couleur.]



entre les clones étudiés pour chaque concentration de Zn appliquée.

## Résultats

Le traitement engendré par les différentes concentrations de zinc a affecté significativement le comportement morpho-physiologique des plants, mais de façon différente selon le clone et la sévérité du stress appliqué à base du Zn. L'interaction entre les deux facteurs (clone  $\times$  traitement) a été significative pour la photosynthèse nette ( $p = 0,0154$ ), la fuite d'électrolytes ( $p = 0,0110$ ) et les concentrations en peroxyde d'hydrogène ( $p = 0,0386$ ), en polyphénols totaux ( $p = 0,0408$ ) et en protéines totales ( $p = 0,0240$ ) et non significative pour les autres variables, plus particulièrement, la MSR, le contenu relatif en eau et la concentration en chlorophylles (tableau 1).

### Principaux symptômes d'excès du Zn observés chez les clones de *Salix*

Après 20 jours de traitement, le stress dû au Zn s'est manifesté chez les trois clones de *Salix*, notamment par une chlorose très prononcée des jeunes feuilles, une croissance réduite des feuilles caractérisée par une diminution de la surface foliaire par rapport aux feuilles avant le stress (fig. 1b et 1c), un enroulement du limbe (fig. 1c), une réduction de la longueur entre les nœuds et un dessèchement des apex foliaires ou d'une grande portion des feuilles (fig. 1c et 1d). Dans certains cas, certaines feuilles ayant terminé leur expansion et leur développement ont montré une coloration pourpre (fig. 1c). Au-delà de cette période, des effets plus prononcés ont été enregistrés sous la dose 750  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , avec l'apparition de nécroses sévères à l'extrémité des feuilles suivie d'une abscission précoce des feuilles les plus âgées. Toutefois, chez les plants du clone *S. alba*, ces symptômes ont été moins présents par comparaison à ceux observés chez les deux autres clones. En outre, au cours des traitements, les effets toxiques du zinc ont occasionné un brunissement progressif du système racinaire initial, nettement plus marqué sous les doses 500 et 750  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de Zn (fig. 1). Par contre, les racines du clone *S. alba* n'ont pas montré des symptômes de toxicité très prononcés.

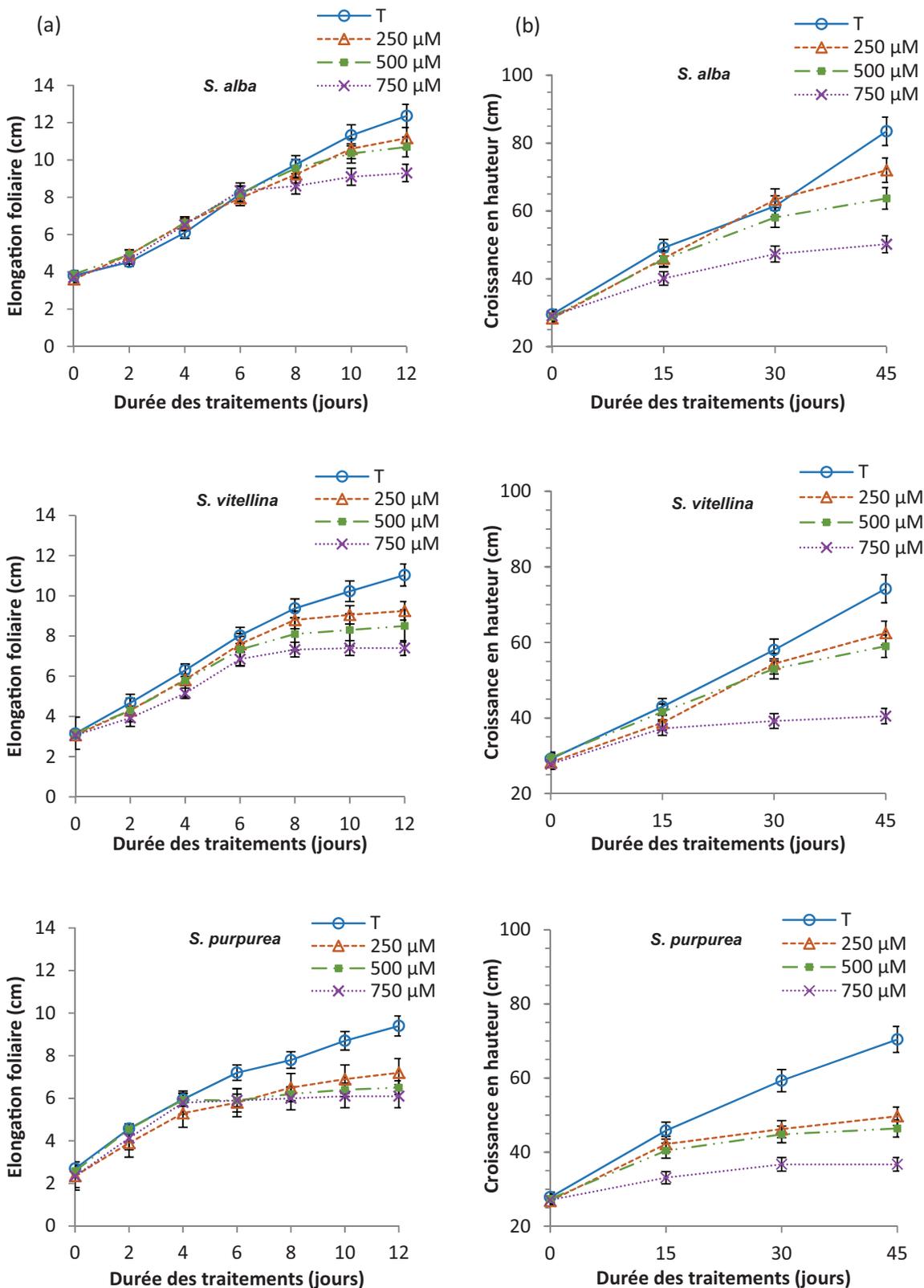
### Paramètres de croissance et indice de tolérance (IT)

L'excès du Zn a réduit significativement ( $p < 0,001$ ) l'élongation foliaire (fig. 2a), la croissance en hauteur (fig. 2b), la surface foliaire totale (SFT) et les MSA et MSR chez les plants des clones évalués par rapport à leurs témoins (fig. 3a, 3b et 3d). Ces réductions se sont révélées quasiment proportionnelles aux concentrations de Zn appliquées. A la fin des traitements, pour chaque clone, les taux de baisse (% du témoin), ont été nettement moins élevés sous la dose 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Cependant, les plus fortes réductions ont été enregistrées sous les doses 500 et 750  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Zn. Par ailleurs, les plants de *S. alba* ont présenté toujours un meilleur comportement par comparaison aux deux autres clones. En effet, après 45 jours, l'imposition du zinc a réduit significativement ( $p < 0,0001$ ) la masse sèche totale des clones testés par rapport à leurs témoins de 15, 20 et 31 % avec la dose 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , de 35, 43 et 49 % avec la dose 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  et de 55, 62 et 70 % avec la dose 750  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivement pour les clones *S. alba*, *S. vitellina* et *S. purpurea*. En outre, les plants de *S. alba* ont montré un indice de tolérance (IT) plus élevé ( $p < 0,05$ ) que celui des plants de *S. vitellina* et de *S. purpurea*, et ce quel que soit la dose de Zn appliquée (fig. 3c).

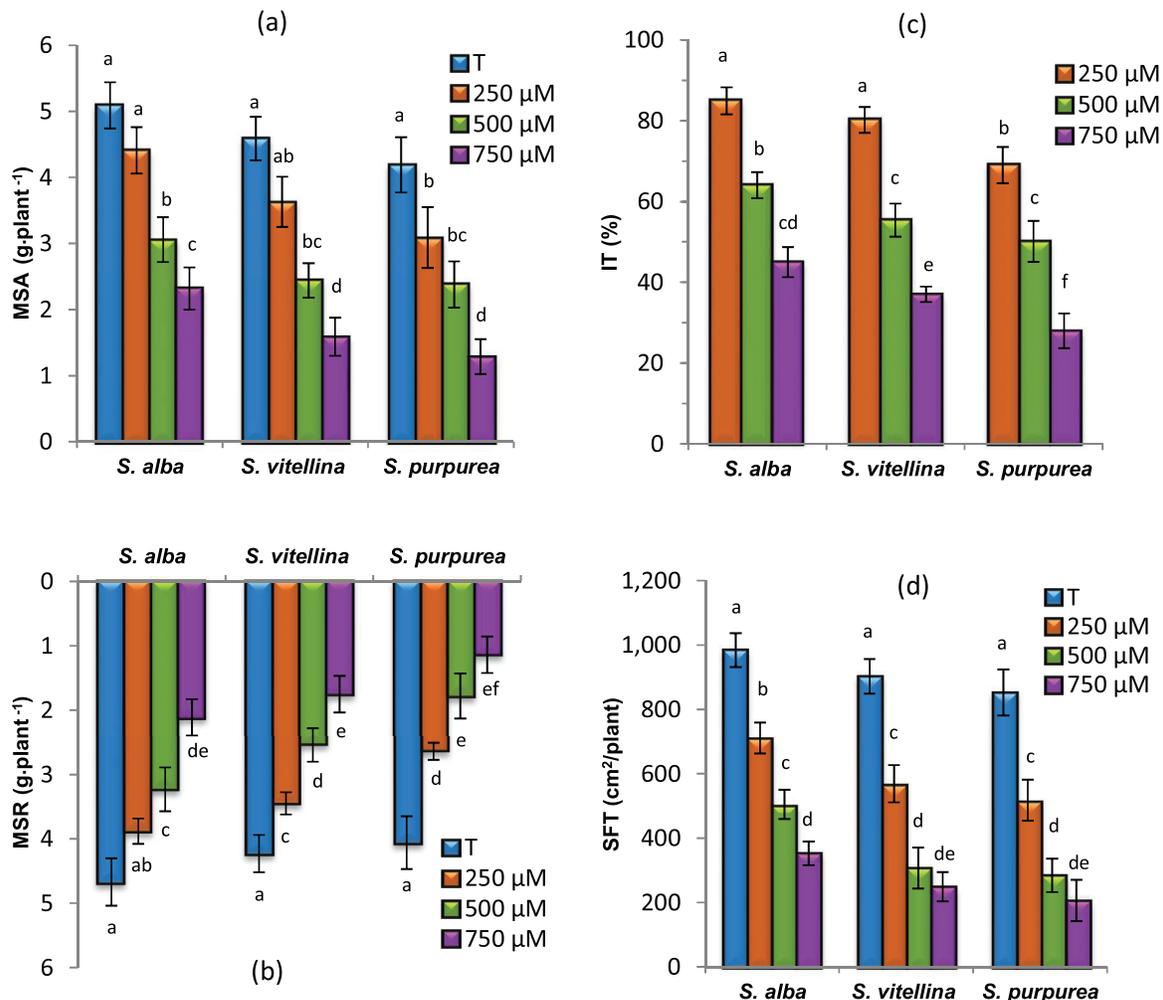
### Échanges gazeux

L'excès de Zn a occasionné une baisse significative ( $p < 0,0001$ ) de la photosynthèse nette ( $A$ ), de la conductance stomatique ( $g_s$ ) et du taux de la transpiration ( $E$ ) chez les trois clones par comparaison à leur témoin, quel que soit le traitement (fig. 4a, 4b et 4c). Les diminutions en  $A$ ,  $g_s$  et  $E$  par rapport à leurs témoins ont été significativement moins accentuées ( $p < 0,05$ ) sous la dose 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  et mettent en évidence le meilleur comportement du clone *S. alba* suivi de de *S. vitellina*. Par contre, à la fin des traitements, l'effet de l'excès de Zn sur  $A$ ,  $g_s$  et  $E$  a été nettement plus prononcé sous les doses 500 et 750  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , avec des valeurs sensiblement plus réduites chez *S. purpurea*. Ainsi, après 45 jours, la valeur de  $A$  représentait 22, 43 et 59 % du témoin chez *S. alba* contre 43, 60 et 69 % chez *S. vitellina* et 52, 67 et 76 % chez *S. purpurea*, respectivement, sous les doses 250, 500 et 750  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Zn.

Fig. 2. Évolution (a) de l'élongation foliaire et (b) de la croissance en hauteur chez des plants de *S. alba*, *S. vitellina* et *S. purpurea* témoin (T) ou soumis à un stress attribuable au zinc : 250, 500 et 750  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $n = 5$  (moyenne  $\pm$  SD). [Version en ligne en couleur.]



**Fig. 3.** Variabilité clonale (a) de la masse sèche aérienne (MSA) et (b) racinaire (MSR), (c) de l'indice de tolérance (IT) et (d) de la surface foliaire totale (SFT) chez des plants de *S. alba*, *S. vitellina* et *S. purpurea* témoin (T) ou soumis à un stress attribuable au zinc : 250, 500 et 750  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $n = 5$  (moyenne  $\pm$  SD). Des lettres différentes au-dessus des histogrammes indiquent une différence significative à  $p < 0,05$  selon le test de Tukey entre les clones et les traitements de zinc. [Version en ligne en couleur.]



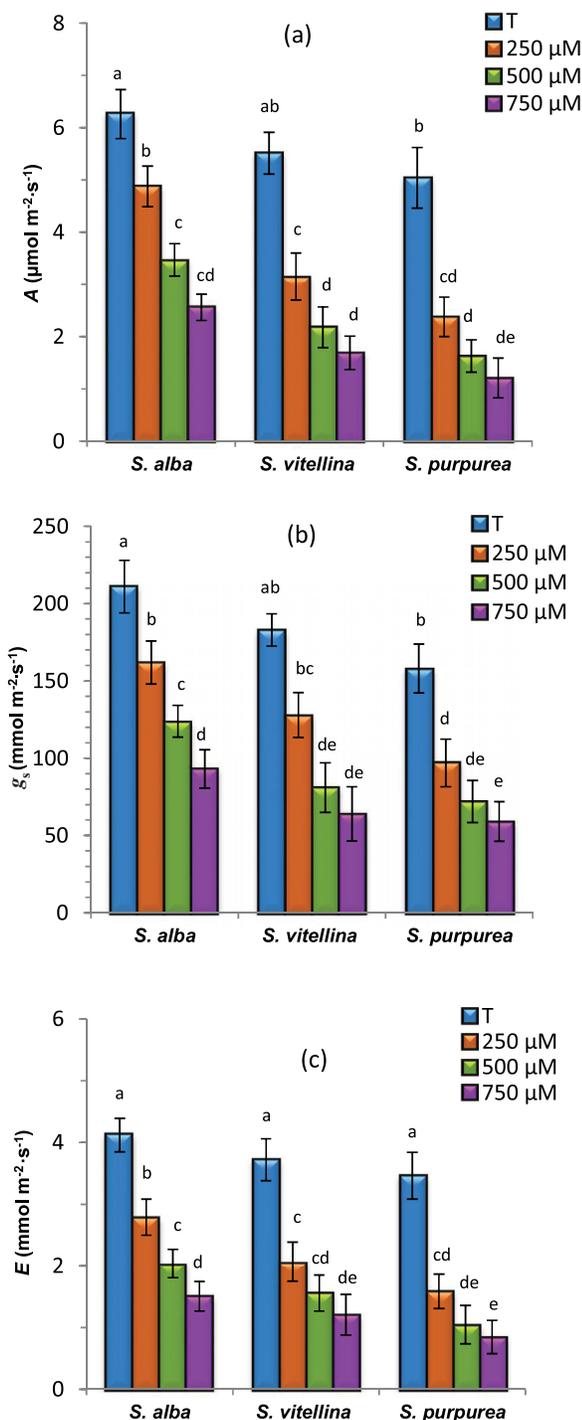
### Indicateurs de stress

Après 45 jours, le stress attribuable au zinc a occasionné une baisse significative ( $p < 0,001$ ) de la teneur en eau relative (« RWC ») et de la concentration en chlorophylles, chez les trois clones évalués par rapport à leurs témoins (fig. 5a et 5b). La réduction de RWC chez *S. alba* a été relativement faible et n'a été significativement marquée que sous la dose 750  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . De même, chez les clones *S. vitellina* et *S. purpurea*, la diminution de RWC sous la dose 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  a été faible et non significative. Cependant, après 45 jours, sous les doses 500 et 750  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , les diminutions de RWC ont été, respectivement, d'ampleur comparable atteignant en moyenne 17 et 21 %, chez *S. vitellina* et *S. purpurea*. Par ailleurs, après 45 jours de l'imposition du Zn, la concentration en chlorophylles a subi une forte baisse, avec toujours une diminution plus prononcée pour les doses dépassant 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Cette diminution a été significativement plus faible chez *S. alba* par comparaison aux deux autres clones ( $p < 0,05$ ). Ainsi, sous la dose 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , la concentration en chlorophylles chez *S. alba* (en % du témoin) a été réduite de 19 %, alors que chez *S. vitellina* et *S. purpurea*, on a enregistré une réduction plus prononcée, respectivement, de 28 et 41 %. Sous les doses 500 et 750  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , le clone *S. alba* a présenté le meilleur comportement avec un taux de baisse de 36 et 48 % du témoin, respectivement. Alors que, chez *S. vitellina*

et *S. purpurea*, ces taux ont été nettement plus élevés et d'ampleur similaire atteignant, respectivement, 52 et 65 % et 60 et 72 %.

L'imposition du zinc a occasionné une augmentation significative ( $p < 0,0001$ ) de la fuite relative d'électrolytes (FE) et de la concentration en peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) dans les feuilles chez les plants de *Salix*, par comparaison à leur témoin, quel que soit le traitement (fig. 5c et 5d). La résistance membranaire a été nettement plus marquée chez le clone *S. alba* ( $p < 0,05$ ) avec une fuite atteignant 15, 23 et 37 %, respectivement, sous les doses 250, 500 et 750  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Cependant, chez *S. vitellina* et *S. purpurea*, l'altération des structures membranaires a été plus prononcée que chez *S. alba* atteignant, respectivement, 27, 38 et 46 % et 33, 42 et 52 %, pour les mêmes doses de Zn (fig. 5c). Par ailleurs, les traitements de Zn appliqués ont rehaussé significativement ( $p < 0,001$ ) la concentration foliaire en  $\text{H}_2\text{O}_2$  chez les trois clones par comparaison à leur témoin, quel que soit le traitement (fig. 5d). L'accumulation de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a été nettement ( $p < 0,05$ ) moins élevée chez *S. alba* par comparaison à celles des deux autres clones. En outre, chez *S. alba*, sous la dose 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , cette accumulation a été légère et non significative. Ainsi, l'amplification de la concentration en  $\text{H}_2\text{O}_2$  représentait, respectivement, 37 et 53 % par rapport au témoin chez *S. alba* contre 48 et 65 % chez *S. vitellina* et 52 et 77 % chez *S. purpurea*, sous les doses 500 et 750  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

**Fig. 4.** Variabilité clonale (a) de la photosynthèse nette (A), (b) de la conductance stomatique ( $g_s$ ) et (c) du taux de transpiration (E) chez des plants de *S. alba*, *S. vitellina* et *S. purpurea* témoin (T) ou soumis à un stress attribuable au zinc : 250, 500 et 750  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $n = 5$  (moyenne  $\pm$  SD). Des lettres différentes au-dessus des histogrammes indiquent une différence significative à  $p < 0,05$  selon le test de Tukey entre les clones et les traitements de zinc. [Version en ligne en couleur.]



#### Concentrations en protéines et en polyphénols totaux

L'excès de Zn a réduit significativement ( $p < 0,001$ ) les concentrations foliaires en protéines totales (fig. 6a) et en polyphénols totaux (fig. 6b) chez les trois clones par comparaison à leurs témoins. Ces réductions ont été d'autant plus marquées que le stress

appliqué était plus sévère. Exception faite, chez *S. alba* où la dose 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  n'a aucun effet significatif sur les concentrations en protéines totales et en polyphénols totaux (fig. 6a et 6b). Par ailleurs, sous les doses 500 et 750  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Zn, le clone *S. alba* a présenté le meilleur comportement avec un taux de baisse en protéines totales, respectivement, de 26 et 58 % par rapport au témoin, contre 60 et 79 % chez *S. vitellina* et 76 et 84 % chez *S. purpurea*. Également, chez *S. alba* la réduction des concentrations en polyphénols totaux, sous les doses 250, 500 et 750  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Zn, a été nettement ( $p < 0,05$ ) moins élevée que celles des deux autres clones, atteignant respectivement 7, 29 et 53 % du témoin. Ainsi, chez *S. vitellina* et *S. purpurea*, la réduction a été plus prononcée et d'ampleur similaire atteignant, respectivement, 24, 49 et 62 % et 27, 50 et 63 %.

#### Distribution des éléments métalliques dans les parties aériennes et racinaires

L'imposition du zinc chez les trois clones étudiés a diminué significativement ( $p < 0,001$ ) les concentrations en éléments dosés par rapport au témoin, quel que soit le traitement (tableau 2). Après 45 jours, le stress attribuable au zinc a entraîné un appauvrissement des tissus aériens et racinaires en Fe et Mg et leur enrichissement en Zn. Notons également que ce déséquilibre de concentration en éléments (Zn, Fe et Mg) a été d'autant plus marqué que le stress attribuable au zinc était sévère. Par ailleurs, l'analyse comparative des éléments dosés chez les trois clones a montré que les plants du clone *S. alba* ont toujours manifesté un meilleur comportement avec des taux de perte (rapporté au témoin) en Mg et Fe et des taux d'accumulation en Zn les plus faibles.

#### Accumulation et translocation du Zn

Les valeurs de translocation (FT) de Zn entre les racines et les parties aériennes ont été tributaires du clone considéré et de la sévérité du stress appliqué. Pour les clones testés les valeurs de FT ont varié de 0,46 à 0,71 (tableau 3). Ainsi, sous la dose 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Zn, les valeurs FT ont été significativement ( $p < 0,05$ ) plus élevées chez *S. alba* que chez les deux autres clones (tableau 3). Par ailleurs, l'application des doses 500 et 750  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  aurait significativement contribué à rehausser FT ( $p < 0,05$ ). Après 45 jours, FT a conservé des valeurs relativement stables chez les trois clones (en moyenne  $0,68 \pm 0,3$ ). Également, les valeurs des FBA étaient dépendantes du clone testé et de la dose appliquée de Zn. Chez les trois clones, ces valeurs de FBA ont été largement supérieures à 1 et ont varié entre 6,91 et 3,47 (tableau 3). Le FBA a montré une variation significative ( $p < 0,05$ ) entre les clones, aussi bien sous la dose modérée (250  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Zn) que sévère ( $>500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Zn). Sous la dose 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Zn, les plants de *S. alba* ont présenté des valeurs de FBA les plus élevées par comparaison aux deux autres clones. Par ailleurs, les valeurs de FBA ont subi une diminution significative pour les doses  $>250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Zn chez *S. alba* et pour les doses  $>500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Zn chez *S. vitellina* et *S. purpurea*.

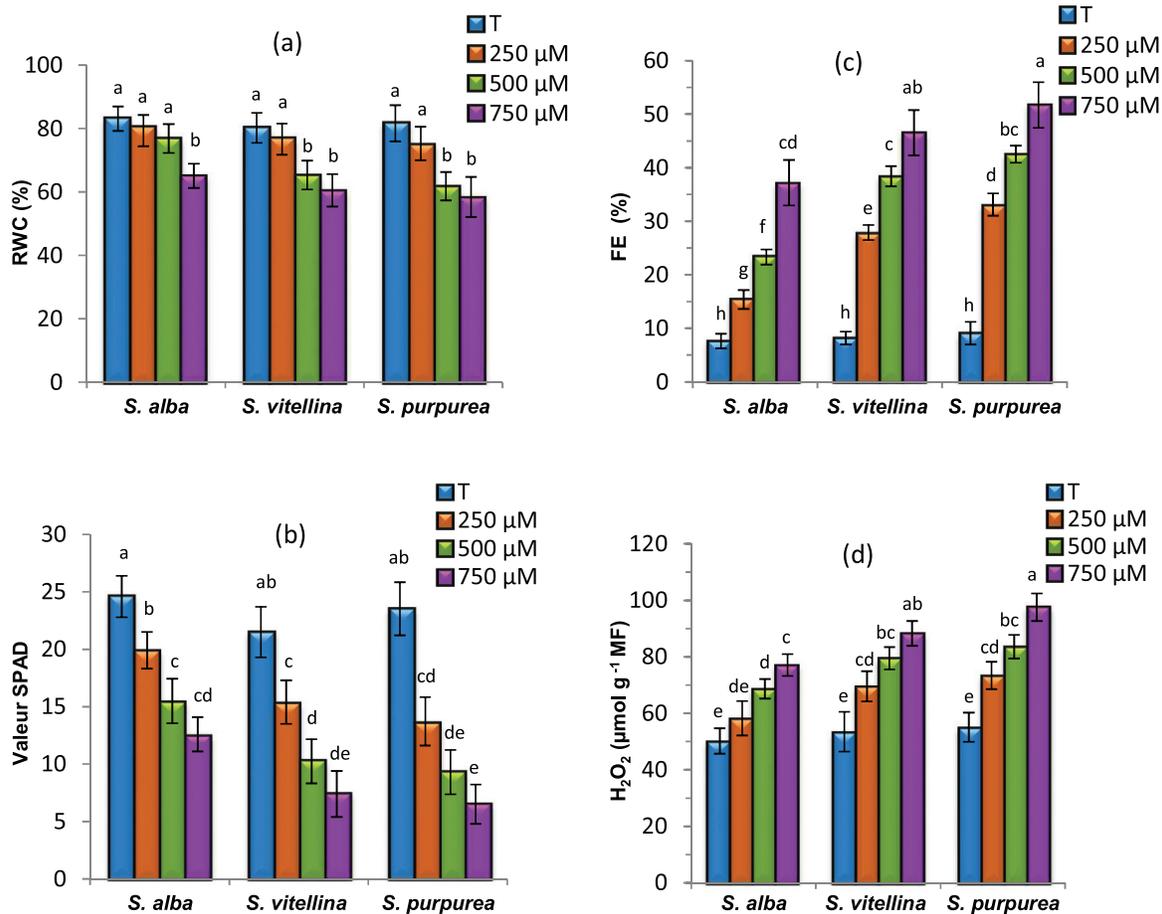
#### Relations entre la stabilité membranaire et la tolérance à l'excès du Zn

Pour examiner la nature des effets du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) suite à une accumulation excessive de Zn sur la stabilité des structures membranaires, nous avons calculé les régressions correspondantes chez les trois clones de *Salix*. Les équations obtenues sont de type linéaire avec des coefficients de corrélation significatifs (fig. 7). On a noté l'existence d'une corrélation positive significative ( $R^2 = 0,93$ ) entre l'accumulation de Zn et la fuite d'électrolytes (fig. 7a), ainsi qu'une relation significative ( $R^2 = 0,96$ ) entre la surproduction de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et la fuite d'électrolytes (fig. 7b).

#### Discussion

Les clones de *Salix* ont montré une variabilité clonale morpho-physiologique en réponse aux effets des différentes concentra-

Fig. 5. Variabilité clonale (a) de la teneur en eau relative (RWC), (b) de la concentration relative en chlorophylles (valeur SPAD), (c) de la fuite d'électrolytes (FE) et (d) de la concentration foliaire en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) chez des plants de *S. alba*, *S. vitellina* et *S. purpurea* témoin (T) ou soumis à un stress attribuable au zinc : 250, 500 et 750  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $n = 5$  (moyenne  $\pm$  SD). Des lettres différentes au-dessus des histogrammes indiquent une différence significative à  $p < 0,05$  selon le test de Tukey entre les clones et les traitements de zinc. [Version en ligne en couleur.]



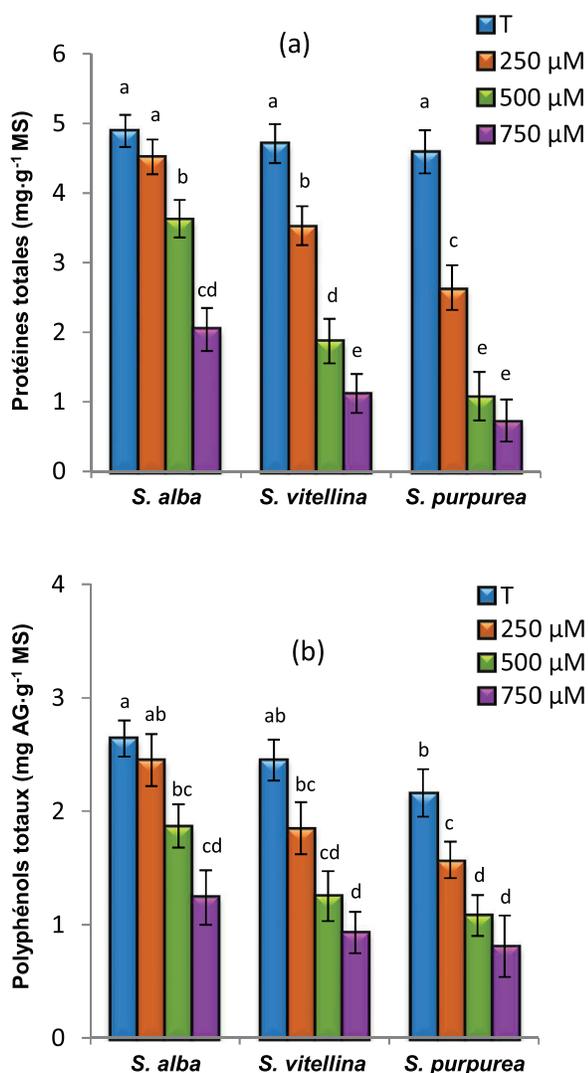
tions du zinc. L'expansion des feuilles a été sévèrement inhibée par le stress attribuable au zinc (fig. 2). Celle-ci s'est manifestée plus tard par une chlorose des feuilles très prononcée suivant la diminution de la teneur en chlorophylles et un enroulement du limbe (fig. 1). Au-delà de 20 jours, des lésions nécrotiques progressives ont été enregistrées (fig. 1) suivies d'une sénescence précoce des feuilles âgées. De tels symptômes visibles sont généralement attribués à une phytotoxicité de Zn comme l'avait suggéré Beyer et al. (2013). Ils sont éventuellement la conséquence d'une photooxydation dans les tissus contenant les plus fortes concentrations de zinc (Shahid et al. 2014). Signalons toutefois, que la sénescence précoce des feuilles âgées pourrait être une réponse adaptative à cause probablement de la séquestration vacuolaire des ions toxiques (Ramade 1992). Par ailleurs, l'exposition à long terme à un excès de zinc a affecté en parallèle la morphologie des racines et a occasionné un brunissement progressif du système racinaire initial (fig. 1). Ces perturbations étaient moins prononcées chez les plants *S. alba* par comparaison à ceux de *S. vitellina* et plus particulièrement de *S. purpurea*.

L'exposition à long terme à un excès de Zn a réduit significativement la croissance des plants chez les trois clones de *Salix*. Ces baisses ont toujours été considérablement moins intenses chez les plants de *S. alba* par comparaison aux deux autres clones, ce qui laisse présager leur plasticité phénotypique considérable vis-à-vis d'un excès de zinc. Un tel retard observé chez les plants stressés a résulté d'une diminution significative de la MSA et MSR, de la surface foliaire totale, de la croissance des tiges en hauteur (fig. 2

et 3) et d'une détérioration racinaire accentuée (fig. 1), considérablement plus marquée que le stress subi a été plus sévère. Des résultats similaires ont été observés chez *Populus* sp. attribuables à une toxicité du zinc (Di Baccio et al. 2009) qui a réduit l'allongement de la racine principale et a ralenti le développement des racines latérales (Ren et al. 1993). En outre, la phytotoxicité du zinc s'est accompagnée d'un ralentissement de l'initiation foliaire et d'une réduction marquée de l'élongation foliaire (fig. 2a) qui peut être attribuée à une inhibition de la division cellulaire, notamment à forte concentration en zinc (Rout et Das 2009; Jain et al. 2010).

Le déficit en masse sèche totale enregistré, sous stress attribuable au zinc pourrait être en raison d'une baisse de la capacité de fixation du  $\text{CO}_2$  (fig. 4a) combinée à un appauvrissement en pigments chlorophylliens selon un gradient de Zn croissant (fig. 5b). Une telle réduction a été attribuée à une inhibition de la voie de biosynthèse de la chlorophylle et (ou) à la formation d'une enzyme protéolytique, responsable de la dégradation des chloroplastes (Ouni et al. 2016). Également, l'excès de Zn peut engendrer une carence induite en magnésium et (ou) en fer (Sivasankar et al. 2012), exprimée souvent par l'installation de chlorose des jeunes feuilles (Fukao et al. 2011). Chez les trois clones testés, l'excès de zinc a induit un déficit significatif en éléments Fe et Mg (tableau 2) et par conséquent une baisse de la biosynthèse des chlorophylles (fig. 5b). Cependant, l'appauvrissement en chlorophylles considérablement moins intense chez *S. alba* par comparaison aux deux autres clones était vraisemblablement lié à une

**Fig. 6.** Variabilité clonale (a) des concentrations en protéines totales et (b) des polyphénols totaux chez des plants de *S. alba*, *S. vitellina* et *S. purpurea* témoin (T) ou soumis à un stress dû au zinc : 250, 500 et 750  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $n = 5$  (moyenne  $\pm$  SD). Des lettres différentes au-dessus des histogrammes indiquent une différence significative à  $p < 0,05$  selon le test de Tukey entre les clones et les traitements de zinc. [Version en ligne en couleur.]



accumulation amoindrit en zinc au niveau des parties aériennes. En effet, les éléments métalliques en excès limitent l'absorption des ions indispensables et seraient à l'origine d'un déséquilibre hydrominéral (Beyer et al. 2013).

À long terme, l'excès du zinc a causé une fermeture partielle des stomates (fig. 4b) associée à une baisse de la photosynthèse nette (fig. 4a) et du taux de transpiration (fig. 4c) avec toujours un abaissement moins accentué chez les plants *S. alba* (fig. 4). Les plants de *S. alba* ont montré des taux de réduction de photosynthèse significativement moins accentués par comparaison aux deux autres clones (fig. 4). Outre la fermeture des stomates, ce retard est attribuable principalement à une baisse de l'efficacité photochimique du photosystème II (Sidhu et al. 2017) et (ou) à une limitation de la capacité biochimique de carboxylation (Islam et al. 2008). Notons par ailleurs que l'enroulement des feuilles, enregistré particulièrement pour les doses avoisinant 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de Zn (fig. 1) limite certes l'interception directe des radiations lumineuses et aurait pour conséquence une baisse de l'activité photosynthétique (Woodrow et al. 1989). La fermeture partielle

des stomates et la limitation de la photosynthèse sont considérées par plusieurs auteurs comme un indicateur de stress abiotique au niveau de la zone pilifère (Di Baccio et al. 2009; Béjaoui et al. 2012). Par ailleurs, nous pensons que la diminution du taux de transpiration (fig. 4c) confère vraisemblablement aux plants stressés, notamment ceux soumis aux concentrations  $>500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de Zn, un mécanisme de défense face à la toxicité de zinc au moyen d'un contrôle des ions acheminés vers l'appareil chlorophyllien. Ainsi, la toxicité de Zn aurait pour conséquence une diminution de l'alimentation hydrique des tissus foliaires, manifesté chez les trois clones de *Salix* par une réduction de RWC (fig. 5a). Toutefois, les plants de *S. alba* ont présenté le meilleur comportement en réponse à cette déshydratation induite par l'excès de Zn. Cette baisse de RWC s'est accompagnée d'une réduction significative de l'élongation foliaire (fig. 2a). En outre, RWC contribue au maintien de la turgescence, nécessaire pour l'expansion des cellules (Katerji et al. 1997).

L'excès de zinc a provoqué une augmentation significative de la concentration foliaire en  $\text{H}_2\text{O}_2$  (fig. 5d) et serait à l'origine de perturbations métaboliques et de dommages oxydatifs (Versieren et al. 2017). Cependant, la production amoindrie en  $\text{H}_2\text{O}_2$  observée chez les plants *S. alba* témoigne d'un mécanisme de défense efficace contre le stress oxydatif. Un tel comportement s'est traduit chez les plants soumis aux fortes concentrations par une meilleure stabilité des structures membranaires, exprimée par des valeurs de fuites d'électrolytes relativement les plus faibles (fig. 5c), leur conférant ainsi une tolérance accrue au stress attribuable au zinc. En effet, de fortes corrélations positives et hautement significatives (fig. 7a et 7b) furent établies entre l'accumulation de Zn et la fuite d'électrolytes et entre la production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et la fuite d'électrolytes. Ces modèles exprimeraient en partie l'existence de mécanisme de tolérance au zinc chez les trois clones qui pourrait provenir d'une résistance aux dommages causés par le stress oxydatif. A long terme, la phytotoxicité de Zn a causé une altération des membranes cellulaires suite à la peroxidation des lipides membranaires (Li et al. 2006) et une oxydation des protéines (Stadtman et Levine 2000). Dans le présent travail, la concentration en protéines foliaires était sensiblement réduite selon un gradient de Zn (fig. 6a) toujours avec une réduction plus faible chez *S. alba*. Cela est probablement le résultat d'un accroissement de l'activité protéolytique sous l'impact du stress (Szöllösi et al. 2009) et reflète un état de stress oxydatif déclenché par la surproduction de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Cependant, le stress attribuable au zinc s'est répercuté d'une manière significative sur la concentration foliaire en polyphénols totaux (fig. 6b), susceptible d'inhiber le stress oxydatif. Mais contrairement à ce que l'on pouvait s'attendre en partant des données de Vinod et al. (2012), c'est une baisse et non pas une accumulation des polyphénols qui se produit.

Nos résultats ont montré une accumulation plus élevée de Zn dans les racines par rapport aux parties aériennes à des concentrations croissantes de Zn. Les valeurs de FT  $< 1$  pour les différentes doses de zinc appliquées témoignent de l'aptitude des trois clones évalués à la phytostabilisation de Zn. Selon Denais (2007), certaines espèces sont capables d'accumuler de fortes doses de Zn dans leurs racines. En effet, la translocation du zinc est souvent limitée (FT  $< 1$ ) en raison de sa forte capacité à créer un complexe Zn-phytochélatines, qui réside généralement dans les vacuoles racinaires (Lux et al. 2011). Les trois clones de *Salix* ont présenté une accumulation potentielle du zinc au niveau des racines (tableau 3) contre une faible translocation vers les parties aériennes (FT  $< 1$ ). Les clones de *Salix* ont présenté un fort potentiel à l'accumulation de Zn dans leurs tissus (FBA  $> 1$ ). Signalons toutefois, que les valeurs de FBA diminuent avec l'augmentation de la concentration de Zn appliquée (tableau 3). Ainsi, l'absorption de Zn a été ralentie au niveau des racines alors que leur translocation augmente vers les parties aériennes (tableau 3). Les plants de *S. vitellina* et de *S. purpurea* ont manifesté de plus fortes perturba-

**Tableau 2.** Concentrations en Zn, Fe et Mg (mg·g<sup>-1</sup> masse sèche (MS)) dans les parties racinaires et aériennes après l'application des quatre différents traitements de zinc (0 (témoin), 250, 500 et 750 µmol·L<sup>-1</sup>).

Clone	Partie racinaire				Partie aérienne			
	Témoin	250	500	750	Témoin	250	500	750
<b>Zn</b>								
<i>Salix alba</i>	0,081±0,025a	0,784±0,058b	0,935±0,072c	1,080±0,061d	0,103±0,024a	0,497±0,024c	0,614±0,049d	0,746±0,039e
<i>S. vitellina</i>	0,092±0,018a	0,897±0,062b	1,114±0,084d	1,312±0,077e	0,087±0,027a	0,414±0,031b	0,761±0,042e	0,863±0,057f
<i>S. purpurea</i>	0,112±0,033a	0,852±0,043b	1,176±0,091d	1,291±0,082e	0,093±0,019a	0,437±0,019b	0,795±0,061e	0,917±0,061f
<b>Fe</b>								
<i>Salix alba</i>	0,223±0,021a	0,184±0,008b	0,143±0,013c	0,117±0,009d	0,068±0,006a	0,056±0,005b	0,051±0,004b	0,040±0,005c
<i>S. vitellina</i>	0,211±0,018a	0,139±0,011c	0,116±0,007d	0,093±0,010e	0,054±0,007b	0,041±0,003c	0,039±0,003c	0,033±0,002d
<i>S. purpurea</i>	0,207±0,011a	0,119±0,010d	0,098±0,008e	0,078±0,008f	0,053±0,005b	0,038±0,002c	0,032±0,002d	0,029±0,004d
<b>Mg</b>								
<i>Salix alba</i>	1,381±0,094a	1,115±0,052b	0,932±0,051c	0,821±0,043c	3,324±0,408a	2,552±0,253b	1,892±0,139c	1,368±0,053e
<i>S. vitellina</i>	1,262±0,063a	0,877±0,074c	0,654±0,039e	0,525±0,021f	3,146±0,385a	2,031±0,137c	1,564±0,108d	1,041±0,046f
<i>S. purpurea</i>	1,294±0,085a	0,743±0,032d	0,598±0,046e	0,507±0,033f	3,093±0,271a	1,924±0,205c	1,342±0,079e	0,954±0,065f

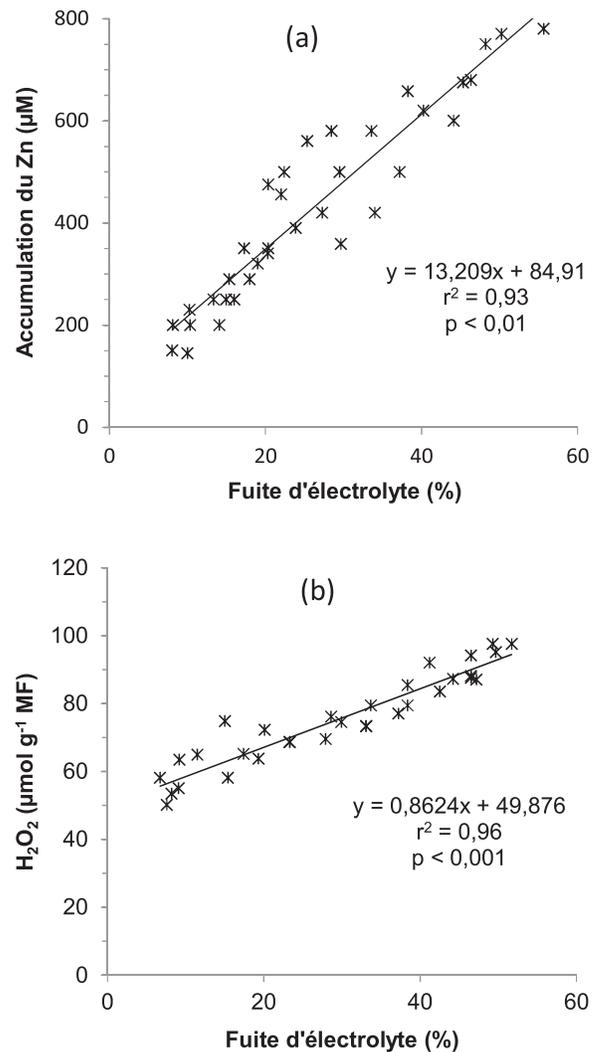
**Nota :** Pour chaque élément, les moyennes suivies de lettres distinctes au sein des parties racinaires ou aériennes présentent des différences significatives au seuil de 5 % selon le test de Tukey.

**Tableau 3.** Facteurs de translocation (FT) et de bioaccumulation (FBA) chez des plants de *Salix* soumis à un stress attribuable au zinc (250, 500 et 750 µmol·L<sup>-1</sup>).

Traitements (µmol·L <sup>-1</sup> Zn)	Clone		
	<i>S. alba</i>	<i>S. vitellina</i>	<i>S. purpurea</i>
<b>FT</b>			
250	0,61±0,01a	0,46±0,02c	0,51±0,01d
500	0,65±0,02b	0,68±0,03b	0,67±0,02b
750	0,69±0,03b	0,66±0,02b	0,71±0,03b
<b>FBA</b>			
250	6,91±0,27a	5,75±0,43b	6,07±0,39b
500	4,26±0,23c	5,28±0,42b	5,52±0,51b
750	3,47±0,19d	4,01±0,21c	4,27±0,26c

**Nota :** Les moyennes suivies de lettres distinctes présentent des différences significatives au seuil de 5 % selon le test de Tukey.

tions par comparaison à *S. alba*, ne peuvent tolérer que de faibles concentrations avoisinant 250 µmol·L<sup>-1</sup> Zn. Par ailleurs, nos résultats ont montré que *S. alba* a été moins sensible au stress attribuable au zinc et peut éventuellement survivre jusqu'à l'application de 500 µmol·L<sup>-1</sup> de Zn. Ceci suggère que ce clone présente une capacité potentielle pour la réhabilitation des sols contaminés au zinc. Nos résultats ont démontré, à notre connaissance, pour la première fois en Afrique du Nord la présence d'une variabilité clonale morpho-physiologique entre les trois clones de *Salix*, originaires de la zone méditerranéenne sud, en réponse à différentes concentrations de Zn. Toutefois, par comparaison aux autres clones, les plants de *S. alba* ont présenté le meilleur comportement d'adaptation et de tolérance face aux effets néfastes déclenchés par un excès de Zn (*S. alba* > *S. vitellina* > *S. purpurea*). En effet, les plants de *S. alba* sont caractérisés par un enracinement et une production de biomasse nettement plus marqués, ce qui permet d'augmenter leur capacité d'absorption et d'extraction du Zn. Ce résultat revêt une importance considérable pour la gestion et l'assainissement des sols pollués par le zinc. Ainsi, d'autres travaux de recherche s'avèrent nécessaires quant à l'implantation de *S. alba* dans un modèle agroforestier dont l'objectif est de limiter au maximum le risque de contamination des eaux de surface par les pesticides, les risques de lessivage et des possibilités de pollution à long terme des nappes phréatiques. Pour les essences de courte rotation où la récolte de la biomasse est effectuée à un jeune âge, le fait d'utiliser un nombre restreint de clones ne pose pas de risques majeurs (maladies, etc.). Pour éviter tout risque, nos travaux futurs mettront également l'accent sur la poursuite du programme de sélection de clones de *Salix* tout en garantissant

**Fig. 7.** Corrélations entre (a) l'accumulation du Zn et la fuite d'électrolytes et (b) la concentration du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et la fuite d'électrolytes.

une diversité génétique adéquate. À cet effet, nous allons utiliser un nombre suffisant de clones non apparentés, soit 7 à 30 clones (Foster 1993) adaptés à chaque région écologique du climat semi-aride de la zone méditerranéenne.

## Bibliographie

- Azooz, M.M. 2009. Foliar application with riboflavin (Vitamin B2) enhancing the resistance of *Hibiscus sabdariffa* L. (Deep red sepals variety) to salinity stress. *J. Biol. Sci.* **9**(2): 109–118. doi:10.3923/jbs.2009.109.118.
- Azzarello, E., Pandolfi, C., Giordano, C., Rossi, M., Mugnai, S. et Mancuso, S. 2012. Ultramorphological and physiological modifications induced by high zinc levels in *Paulownia tomentosa*. *Environ. Exp. Bot.* **81**: 11–17. doi:10.1016/j.envexpbot.2012.02.008.
- Béjaoui, Z., Albouchi, A., Lamhamedi, M.S., Abassi, M. et El Aouni, M.H. 2012. Adaptation and morpho-physiology of three *Populus deltoides* Marsh. × *P. nigra* L. clones after preconditioning to prolonged waterlogging. *Agrofor. Syst.* **86**: 433–442. doi:10.1007/s10457-012-9487-7.
- Beyer, W.N., Green, C.E., Beyer, M. et Chaney, R.L. 2013. Phytotoxicity of zinc and manganese to seedlings grown in soil contaminated by zinc smelting. *Environ. Pollut.* **179**: 167–176. doi:10.1016/j.envpol.2013.04.013. PMID:23685629.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3. PMID:942051.
- Bursal, E. et Gülçin, İ. 2011. Polyphenol contents and in vitro antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Res. Int.* **44**(5): 1482–1489. doi:10.1016/j.foodres.2011.03.031.
- Campos, P.S., Quartin, V., Ramalho, J.C. et Nunes, M.A. 2003. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *J. Plant Physiol.* **160**(3): 283–292. doi:10.1078/0176-1617-00833. PMID:12749085.
- Cuyppers, A., Smeets, K. et Vangronsveld, J. 2009. Heavy metal stress in plants. *Dans Plant stress biology: from genomics to systems biology*. Edition H. Hirt. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany. pp. 161–178. doi:10.1002/9783527628964.ch8.
- Denaix, L. 2007. Transfert sol-eau-plante d'éléments traces dans les écosystèmes cultivés contaminés. Mémoire d'Habilitation à Diriger des Recherches, Département Environnement et Agronomie, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau, France.
- Di Baccio, D., Tognetti, R., Minnocci, A. et Sebastiani, L. 2009. Responses of the *Populus × euramericana* clone I-214 to excess zinc: carbon assimilation, structural modifications, metal distribution and cellular localization. *Environ. Exp. Bot.* **67**(1): 153–163. doi:10.1016/j.envexpbot.2009.05.014.
- Disante, K.B., Fuentes, D. et Cortina, J. 2010. Sensitivity to zinc of Mediterranean woody species important for restoration. *Sci. Total Environ.* **408**(10): 2216–2225. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.12.045. PMID:20189221.
- D'Souza, R.M. et Devaraj, V.R. 2012. Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in hyacinth bean under zinc stress. *Afr. Crop Sci. J.* **20**(1): 17–29.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2002. The state of food and agriculture. FAO, Rome.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2017. Sustainable woodfuel for food security. A smart choice: green, renewable and affordable. FAO, Rome.
- Foster, G.S. 1993. Selection and breeding from extreme genotypes. *Dans Clonal forestry I: genetics and biotechnology*. Sous la direction de M.R. Ahuja et W.J. Libby. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 50–67. doi:10.1007/978-3-642-84175-0\_5.
- Fukao, Y., Ferjani, A., Tomioka, R., Nagasaki, N., Kurata, R., Nishimori, Y., Fujiwara, M. et Maeshima, M. 2011. iTRAQ analysis reveals mechanisms of growth defects due to excess zinc in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **155**(4): 1893–1907. doi:10.1104/pp.110.169730. PMID:21325567.
- Hoagland, D.R. et Arnon, D.I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Circ. - Calif. Agric. Exp. Stn.* **347**(2): 1–32.
- Islam, E., Liu, D., Li, T., Yang, X., Jin, X., Mahmood, Q., Tian, S. et Li, J. 2008. Effect of Pb toxicity on leaf growth, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. *J. Hazard. Mater.* **154**(1–3): 914–926. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.10.121. PMID:18162296.
- Jain, R., Srivastava, S., Solomon, S., Shrivastava, A.K. et Chandra, A. 2010. Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum* spp.). *Acta Physiol. Plant.* **32**(5): 979–986. doi:10.1007/s11738-010-0487-9.
- Katerji, N., van Hoorn, J.W., Hamdy, A., Mastrorilli, M. et Karzel, E.M. 1997. Osmotic adjustment of sugar beets in response to soil salinity and its influence on stomatal conductance, growth and yield. *Agric. Water Manage.* **34**(1): 57–69. doi:10.1016/S0378-3774(96)01294-2.
- Klang-Westin, E. et Eriksson, J. 2003. Potential of *Salix* as phytoextractor for Cd on moderately contaminated soils. *Plant Soil.* **249**(1): 127–137. doi:10.1023/A:1022585404481.
- Kopponen, P., Utriainen, M., Lukkari, K., Suntioinen, S., Kärenlampi, L. et Kärenlampi, S. 2001. Clonal differences in copper and zinc tolerance of birch in metal-supplemented soils. *Environ. Pollut.* **112**(1): 89–97. doi:10.1016/S0269-7491(00)00096-8. PMID:11202657.
- Lamb, D.T., Ming, H., Megharaj, M. et Naidu, R. 2010. Relative tolerance of a range of Australian native plant species and lettuce to copper, zinc, cadmium, and lead. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **59**(3): 424–432. doi:10.1007/s00244-010-9481-x. PMID:20213195.
- Li, M., Hu, C., Zhu, Q., Chen, L., Kong, Z. et Liu, Z. 2006. Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae). *Chemosphere.* **62**(4): 565–572. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.06.029. PMID:16085277.
- Lu, L.L., Tian, S.K., Yang, X.E., Peng, H.Y. et Li, T.Q. 2013. Improved cadmium uptake and accumulation in the hyperaccumulator *Sedum alfredii*: the impact of citric acid and tartaric acid. *J. Zhejiang Univ., Sci., B.* **14**(2): 106–114. doi:10.1631/jzus.B1200211. PMID:23365009.
- Lux, A., Vaculík, M., Martinka, M., Lišková, D., Kulkarni, M.G., Stirk, W.A. et Van Staden, J. 2011. Cadmium induces hypodermal periderm formation in the roots of the monocotyledonous medicinal plant *Merwillia plumbea*. *Ann. Bot.* **107**(2): 285–292. doi:10.1093/aob/mcq240. PMID:21118841.
- Mackay, D. et Fraser, A. 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environ. Pollut.* **110**(3): 375–391. doi:10.1016/S0269-7491(00)00162-7. PMID:15092817.
- Mo, C. et Neilson, B. 1994. Standardization of oyster soft tissue dry weight measurements. *Water Res.* **28**(1): 243–246. doi:10.1016/0043-1354(94)90140-6.
- Ouni, Y., Mateos-Naranjo, E., Abdely, C. et Lakhdar, A. 2016. Interactive effect of salinity and zinc stress on growth and photosynthetic responses of the perennial grass, *Polypogon monspeliensis*. *Ecol. Eng.* **95**: 171–179. doi:10.1016/j.ecoleng.2016.06.067.
- Purdy, J.J. et Smart, L.B. 2008. Hydroponic screening of shrub willow (*Salix* spp.) for arsenic tolerance and uptake. *Int. J. Phytorem.* **10**(6): 515–528. doi:10.1080/15226510802115000.
- Ramade, F. 1992. Précis d'écotoxicologie. Edition Masson, Paris.
- Reichman, S.M. 2002. The responses of plants to metal toxicity: a review focusing on copper, manganese and zinc. Occasional Paper No. 14. Australian Minerals & Energy Environment Foundation, Melbourne. pp. 22–26.
- Ren, F.C., Liu, T.C., Liu, H.Q. et Hu, B.Y. 1993. Influence of zinc on the growth, distribution of elements, and metabolism of one-year-old American ginseng plants. *J. Plant Nutr.* **16**(2): 393–405. doi:10.1080/01904169309364539.
- Rout, G.R. et Das, P. 2009. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. *Dans Sustainable agriculture. Sous la direction de E. Lichtfouse, M. Navarrete, P. Debaeke, S. Véronique et C. Alberola*. Springer, Dordrecht, Netherlands. pp. 873–884. doi:10.1007/978-90-481-2666-8\_53.
- Sagardoy, R., Morales, F., López-Millán, A.F., Abadía, A. et Abadía, J. 2009. Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. *Plant Biol.* **11**(3): 339–350. doi:10.1111/j.1438-8677.2008.00153.x. PMID:19470105.
- Shahid, M., Pourrut, B., Dumat, C., Nadeem, M., Aslam, M. et Pinelli, E. 2014. Heavy-metal-induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **232**: 1–44. doi:10.1007/978-3-319-06746-9\_1. PMID:24984833.
- Sidhu, G.P.S., Singh, H.P., Batish, D.R. et Kohli, R.K. 2017. Tolerance and hyperaccumulation of cadmium by a wild unpalatable herb *Coronopus didymus* (L.) Sm. (Brassicaceae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **135**: 209–215. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.10.001. PMID:27744137.
- Sivasankar, R., Kalaikandhan, R. et Vijayarengan, P. 2012. Phytoremediating capability of four plant species under zinc stress. *Int. J. Res. Environ. Sci. Technol.* **2**(1): 1–9.
- Stadtman, E.R. et Levine, R.L. 2000. Protein oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **899**: 191–208. PMID:10863540.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., Hassoun, E. et Bagchi, M. 2000. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **19**(3): 201–213. PMID:10983887.
- Szöllösi, R., Varga, I.S., Erdei, L. et Mihalik, E. 2009. Cadmium-induced oxidative stress and antioxidative mechanisms in germinating Indian mustard (*Brassica juncea* L.) seeds. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **72**(5): 1337–1342. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.04.005. PMID:19423166.
- Velikova, V., Yordanov, I. et Edreva, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci.* **151**(1): 59–66. doi:10.1016/S0168-9452(99)00197-1.
- Versieren, L., Evers, S., AbdElgawad, H., Asard, H. et Smolders, E. 2017. Mixture toxicity of copper, cadmium, and zinc to barley seedlings is not explained by antioxidant and oxidative stress biomarkers. *Environ. Toxicol. Chem.* **36**(1): 220–230. doi:10.1002/etc.3529. PMID:27311849.
- Vinod, K., Awasthi, G. et Chauchan, P.K. 2012. Cu and Zn tolerance and responses of the biochemical and physicochemical system of wheat. *J. Stress Physiol. Biochem.* **8**(3): 203–213.
- Wilkins, D.A. 1978. The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root growth. *New Phytol.* **80**(3): 623–633. doi:10.1111/j.1469-8137.1978.tb01595.x.
- Woodrow, L., Jiao, J., Tsujita, M.J. et Grodzinski, B. 1989. Whole plant and leaf steady state gas exchange during ethylene exposure in *Xanthium strumarium* L. *Plant Physiol.* **90**(1): 85–90. doi:10.1104/pp.90.1.85. PMID:16666773.
- Zhivotovsky, O.P., Kuzovkina, J.A., Schulthess, C.P., Morris, T., Pettinelli, D. et Ge, M. 2010. Hydroponic screening of willows (*Salix* L.) for lead tolerance and accumulation. *Int. J. Phytorem.* **13**(1): 75–94. doi:10.1080/15226511003671361.