



HAL
open science

Mécanismes et modélisation de l'accumulation foliaire du nickel par l'hyperaccumulateur *Leptoplax emarginata*

David Coinchelin

► **To cite this version:**

David Coinchelin. Mécanismes et modélisation de l'accumulation foliaire du nickel par l'hyperaccumulateur *Leptoplax emarginata*. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Lorraine - INPL, 2011. Français. NNT : 2011INPL010N . tel-01502547

HAL Id: tel-01502547

<https://theses.hal.science/tel-01502547>

Submitted on 5 Apr 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires
Ecole doctorale Ressources, Procédés, Produits et Environnement
Laboratoire Sols et Environnement UMR 1120 INPL (ENSAIA)/INRA

THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'INPL

Spécialité : Sciences Agronomiques

David Coinchelin

**Mécanismes et modélisation de
l'accumulation foliaire du nickel par
l'hyperaccumulateur *Leptoplax emarginata***

Soutenue publiquement le 15 février 2011 devant un jury composé de :

Jean-Louis Morel , Professeur, INPL (ENSAIA), Nancy	Président
Laurence Denaix , Directeur de recherche, INRA, Bordeaux	Rapporteur
Pierre Berthomieu , Professeur, SupAgro, Montpellier	Rapporteur
Thierry Simonneau , Directeur de recherche, INRA, Montpellier	Examineur
Frédérique Cadière , ingénieure ADEME, Angers	Examineur
François Bartoli , Directeur de recherche, CNRS, Nancy	Directeur de thèse
Guillaume Echevarria , Professeur, INPL (ENSAIA), Nancy	Co-directeur de thèse

Préambule

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe « Phytoremédiation des sols contaminés » du Laboratoire Sols et Environnement (www.lse.inpl-nancy.fr/), sous la direction de François Bartoli et la codirection de Guillaume Echevarria. Ce travail a bénéficié des financements de l'Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL), du conseil régional de Lorraine et de l'agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME).

Remerciements

Ces trois années (et quelques mois) furent l'occasion pour moi d'échanger et d'apprendre auprès de trois chercheurs qui furent des modèles tout au long de ma formation. A ces « trois », je tiens à leur exprimer toute ma gratitude. C'est avec beaucoup de respect que je remercie tout d'abord **François Bartoli**, mon directeur de thèse. Sa grande disponibilité, son optimisme et son aide m'ont permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions. Nos discussions, souvent passionnées, sur la science, la politique, le syndicalisme, la musique et de nombreux autres sujets ont été sources d'enrichissement personnel et complétèrent parfaitement ma formation de chercheur. Aujourd'hui je peux dire que, bien plus qu'un directeur de thèse, François a été mon *mentor*. Un grand merci aussi à **Christophe Robin** très présent tout au long de mon parcours, depuis mon stage de master jusqu'à ma soutenance de thèse. Ses conseils techniques et rédactionnels furent précieux. Merci pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux et pour le temps qu'il a passé à suivre mes expérimentations. Enfin, je remercie **Didier Stemmelen** sans qui je n'aurais pu terminer ma thèse dans les temps. Il a su me familiariser avec la modélisation et m'épauler sur ce sujet, et ce malgré un agenda très chargé. A ces trois, encore un grand merci !

Mes sincères remerciements vont à **Jean-Louis Morel**, directeur du LSE, qui m'a accordé sa confiance en m'acceptant au sein de l'unité et qui m'a fait l'honneur de présider mon jury de thèse. Son écoute et ses conseils m'ont permis de prendre du recul sur mon travail et mon statut de doctorant, et m'ont aidé à construire mon projet professionnel. Je remercie également **Guillaume Echevarria**, mon codirecteur de thèse, pour la confiance qu'il m'a accordé depuis qu'il m'a accepté en master. Merci aussi pour ses nombreux conseils. *Děkuji !*

Toute ma reconnaissance va aussi aux autres membres de mon jury : **Pierre Berthomieu** et **Laurence Denaix** qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce mémoire, **Frédérique Cadière** et **Thierry Simonneau** pour avoir pris le temps d'examiner mon travail. Merci aux membres de mon comité de pilotage : **Isabelle Desportes**, **Claude Doussan**, **Thibault Sterckeman**, et à nouveau **Christophe Robin** et **Thierry Simonneau**.

Mes sincères remerciements vont aussi à toutes les personnes ayant collaboré à cette thèse. Merci à **Didier Le Thiec** et **Christophe Rose** pour les analyses en MEB. Merci aussi à **Michel Chalot** et **Damien Blaudez** d'avoir pris le temps de répondre à mes questions.

Un grand merci aux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer, **Chloé, Katia** et **Mathilde**, bonne chance pour la suite de votre parcours.

Je voudrais remercier tout le personnel du LSE, pour leur accueil et leur gentillesse. Un merci particulier pour l'équipe technique. Merci à **Bernard** pour son aide précieuse au potager. Merci à **Jean-Claude** pour le temps passé à imprégner mes sols et à concevoir mes dispositifs expérimentaux. Merci aussi pour son humour ^^ ! Merci à **Romain** pour son aide en fin de thèse qui m'a permis de me consacrer pleinement à la rédaction, *Let's Fuck'n'Roll*. Merci à **Alain** pour nos nombreuses discussions sur les milieux « undergrounds » (*hipsters connection*) et les alternatives économiques et sociétales. Enfin, un ENORME merci à **Adeline** et **Stéphane** pour leur gentillesse et leur amitié. Ce fut un grand plaisir de travailler avec vous et de partager de bons moments en privé qui, je l'espère, continueront après la thèse.

Un merci rempli d'émotions pour mes amis doctorants du labo. Merci à **Benjaminounet** (mon passionné d'histoire préféré), **Sophie « Chouffe »** (ma thésarde préférée) et **Frank Darniche** (mon fan de reggae préféré) pour m'avoir accompagné durant ces trois ans. Je ne suis pas près de vous oublier bande de loosers et je pourrais « presque » refaire 3 ans avec vous trois... Merci aussi à **Lucie Love, Jean-Marc** et **Fabien** qui nous ont rejoints peu de temps après. Que d'aventures nous avons vécu tous les sept n'est-il pas ? Entre le RU, le jardin, les soirées, le Napoléon, le pied-poing, le Norma, l'art de la démesure et du mauvais goût, l'Histoire de France pour les nuls... oui que d'aventures !

Merci aussi aux anciens doctorants : **Marie-France, Abdou, Tanegmart** et **Jérôme**. Merci aux petits nouveaux pour avoir égayé mes derniers mois de thèse : **Hermine, Nouhou, Sarah, Audrey, Childos, Cédric** et **Sophie**. A vous, bonne chance ^^ . Merci aussi à **Noëlle** de la GISTeam pour sa bonne humeur. Merci à **Françoise** pour tout le travail effectué sur les mesures en MET et leurs traitements, merci aussi pour sa gentillesse. Merci aussi à **Stéphanie** et **Catherine** pour le temps passé à me former aux techniques analytiques et pour leurs nombreux conseils. Merci aux secrétaires, **Séverine, Liliane, Isabelle** et **Sylvia** qui m'ont permis de passer une thèse sans me soucier des « joies » administratives.

Enfin, mes pensées vont à ma famille et mes amis. Merci à mes parents pour la confiance qu'ils m'ont toujours accordé. Merci aux DARQ's pour les refrains qui m'ont accompagné et qui m'accompagneront toujours. *Caus' you know ! For the day of the night*. Mille mercis à Alexandra qui m'a soutenue durant ces trois ans et qui me soutiendra encore longtemps je l'espère. Un gros bisou à notre fille Lilly, mon petit ouistiti.

Table des matières

Introduction bibliographique	9
1 Les contaminations métalliques des sols	10
2 La réponse des plantes aux ETM.....	13
3 La phytoextraction des ETM.....	16
3.1 Principe de la phytoextraction	16
3.2 Les limites de la phytoextraction	16
3.3 Un besoin d'outils d'aide à la décision	17
4 Modèles de prélèvement des ETM par une plante.....	18
4.1 Modèles statistiques – Fonctions de pédotransfert.....	18
4.2 Modèles mécanistes de type Barber-Cushman	20
4.3 Modèles biophysiques basés sur le type de transport et le couplage production de biomasse aérienne/transpiration	21
5 Objectifs de l'étude et plan du mémoire	24

Chapitre 1	27
Prélèvement combiné d'eau et de nickel pour une plante hyperaccumulatrice de Ni, <i>Leptoplax emarginata</i>, et pour une plante exclusive, le blé de printemps	

1 Introduction	28
2 Matériels et méthodes	31
2.1 Plantes étudiées	31
2.1.1 <i>Leptoplax emarginata</i>	31
2.1.2 Blé de printemps.....	32
2.2 Milieu poreux de culture	32
2.3 Cinétiques de phytoaccumulation (cultures en pots).....	34
2.3.1 Fertilisation et contaminations du milieu poreux	34
2.3.2 Préparation des pots	34
2.3.3 Germination et repiquage	35
2.3.4 Dispositif de culture	35
2.3.5 Suivi de la transpiration et irrigation	36
2.3.6 Prélèvements et analyses	36
2.3.7 Calcul des productions de biomasses, des flux de transpirations et de Ni	37
2.4 Expérience complémentaire	37
2.5 Traitements statistiques.....	38
3 Résultats.....	39
3.1 Evolution de la solution du sable	39
3.1.1 Concentrations en nickel et pH.....	39
3.1.1 Ions majeurs	41
3.2 Croissance des plantes	41
3.2.1 Biomasses racinaires et foliaires	41

3.2.2	Caractéristiques écophysologiques	44
3.2.3	Production de biomasse foliaire et transpiration	46
3.3	Teneurs en nickel dans les plantes	48
3.4	Coefficient de réflexion apparent du Ni, σ_{Ni}	51
3.5	Facteur de bioconcentration du Ni.....	53
4	Discussion	53
4.1	Nickel en solution.....	53
4.2	Croissance et teneurs en nutriments dans la solution.....	54
4.3	Croissance et teneurs en Ni dans la solution	54
4.4	Phytoaccumulation du Ni.....	55
4.4.1	Blé.....	55
4.4.2	<i>Leptoplax emarginata</i>	55
4.5	Coefficients de réflexion σ_{Ni}	56
4.5.1	Blé.....	56
4.5.2	<i>Leptoplax emarginata</i>	56
4.6	Facteur de bioconcentration TSCF _{Ni} pour <i>L. emarginata</i>	57
5	Conclusion	58

Chapitre 2..... 60

Suivi et modélisation de l'accumulation foliaire du nickel par *Leptoplax emarginata*

1	Introduction	61
2	Matériels et méthodes	64
2.1	<i>Leptoplax emarginata</i>	64
2.2	Sol sableux	64
2.3	Culture en pots de <i>L. emarginata</i>	66
2.3.1	Préparation des pots et repiquage	66
2.3.2	Conditions de culture	67
2.3.3	Suivi de la culture	68
2.3.4	Prélèvements et analyses	68
2.3.5	Traitements statistiques.....	69
2.4	Isothermes d'adsorption	69
2.5	Modélisation.....	69
2.5.1	Description du modèle	69
2.5.2	Optimisation des paramètres du modèle.....	71
3	Résultats expérimentaux	71
3.1	Résultats de la culture de <i>L. emarginata</i>	71
3.1.1	Solutions du sol	71
3.1.2	Biomasses foliaires de <i>L. emarginata</i>	73
3.1.3	Transpiration.....	76
3.1.4	Concentrations foliaires en nickel.....	78

3.2	Facteur de bioconcentration $TSCF_{Ni}$	78
4	Modélisation.....	79
4.1	Optimisations successives des paramètres du modèle	80
4.1.1	Isothermes d'adsorption du nickel.....	80
4.1.2	Optimisation des paramètres du modèle à l'aide des données des solutions du sol sans plantes.....	81
4.1.3	Optimisation des paramètres du modèle à l'aide des données des solutions du sol cultivé avec <i>L. emarginata</i>	82
4.1.4	Synthèse des optimisations des paramètres du modèle et choix de la meilleure calibration.....	84
4.2	Validation du modèle	84
4.3	Analyse de sensibilité du modèle	86
5	Discussion	89
5.1	Suivi de la solution du sol	89
5.2	Optimisation des paramètres du modèle.....	89
5.3	Validation du modèle et analyse de sensibilité.....	91
6	Conclusion et perspectives.....	92

Chapitre 3..... 94

Distributions spatiales du nickel foliaire, de l'échelle de la feuille à celle du tissu, en relation avec les caractéristiques écophysologiques et les éléments minéraux majeurs

1	Introduction	95
2	Matériels et méthodes	97
2.1	Cultures de <i>Leptoplax emarginata</i>	97
2.1.1	Matériel végétal et milieux de culture	97
2.1.2	Préparation des pots de culture et conditions de culture	97
2.1.3	Suivi des cultures.....	98
2.2	Prélèvements et analyses	98
2.2.1	Etude de la croissance et de l'écophysologie de <i>Leptoplax emarginata</i> cultivée dans le sol fertilisé, contaminé ou non	99
2.2.2	Etude de la distribution spatiale du nickel foliaire en fonction des caractéristiques écophysologiques des feuilles (<i>P1</i>)	99
2.2.3	Microscopie électronique à balayage et analyses EDX	100
2.2.4	Microscopies photonique et électronique à transmission, préparation des coupes fines et ultrafines de feuilles	101
3	Résultats.....	102
3.1	Caractéristiques écophysologiques de <i>Leptoplax emarginata</i> cultivée dans le sol contaminé ou non	102
3.2	Distribution spatiale du nickel foliaire en fonction de l'âge et des caractéristiques écophysologiques des feuilles	104
3.2.1	Profils de paramètres de croissance et d'échanges gazeux.....	104

3.2.2	Distribution spatiale du nickel foliaire	108
3.3	Observations des feuilles de <i>Leptoplax emarginata</i> en microcopies photoniques et électroniques	108
3.3.1	Densités de stomates	108
3.3.2	Coupes transversales de feuilles.....	112
3.4	Distribution spatiale du nickel foliaire en relation avec les éléments majeurs	112
3.4.1	Localisation du nickel et des éléments majeurs dans les tissus foliaires (MEB-EDX) ..	112
3.4.2	Relations entre le nickel et les principaux éléments minéraux.....	113
3.4.3	Localisation du Ni dans les cellules des tissus foliaires (MET-EDX)	120
4	Discussion et conclusion	122
4.1	Distributions spatiales du nickel à l'échelle des feuilles	122
4.1.1	Relations entre les distributions spatiales du nickel et celles des caractéristiques écophysiologiques	122
4.1.2	Relations entre le nickel et les éléments minéraux majeurs à l'échelle des feuilles	123
4.2	Distributions spatiales du Ni à l'échelle des tissus foliaires	124
4.2.1	Relations entre le nickel et le soufre.....	124
4.2.2	Relations avec le nickel et les autres éléments minéraux.....	126
	Conclusion générale et perspectives.....	128
	Références bibliographiques	137
	Liste des figures	145
	Liste des tableaux	148

Introduction bibliographique



Pollution atmosphérique

Erosions, tassements, salinisations, désertifications, pertes de fertilité, contaminations, imperméabilisations.... Voilà le triste constat que l'on peut faire, aujourd'hui dans le monde, quant à l'état de nos sols. Or le sol nourrit le monde et participe au cycle de l'eau qu'il épure, le sol est une réserve de biodiversité, le sol est un puits pour le carbone. C'est aussi un témoin de l'histoire, un symbole culturel et religieux. Cette ressource non renouvelable à échelle humaine est également le support indispensable à nos activités, pourtant ces mêmes activités (industrialisation, agriculture intensive, urbanisation...) participent à sa dégradation croissante. En dégradant ce milieu l'Homme met en danger tout un écosystème, l'Homme se met en danger !

1 Les contaminations métalliques des sols

Les contaminants dans un sol peuvent être transférés vers les nappes d'eau souterraines, mais aussi être absorbés par des plantes, c'est toute la chaîne alimentaire qui risque être alors contaminée. Les contaminations aux **éléments traces métalliques*** (ETM, anciennement métaux lourds) en sont un bon exemple, ces éléments pouvant être facilement absorbés par des plantes, comme les plantes alimentaires. Ainsi, une des principales voies d'exposition humaine aux ETM se fait par l'alimentation, cette exposition pouvant avoir des conséquences très lourdes sur la santé (cf. [rapport n°261 du Sénat](#) et Tableau 1).

La croûte terrestre est composée de 80 éléments, 12 éléments majeurs (teneur dans la croûte terrestre supérieure à 0,1%), et 68 éléments traces (teneur inférieure à 0,1%), métaux ou métalloïdes, qui sont les ETM . Les 12 principaux ETM sont le chrome (Cr), le nickel (Ni), le zinc (Zn), le cuivre (Cu), le cobalt (Co), le plomb (Pb), le bore (B), l'arsenic (As), le molybdène (Mo), le thallium (Tl), le mercure (Hg) et le sélénium (Se).

Certains ETM sont pourtant des oligo-éléments essentiels à la vie comme le zinc, le cuivre, le manganèse ou le nickel, mais ils ne sont essentiels qu'à de faibles quantités et s'avèrent toxiques à des teneurs élevées. D'autres ETM comme le cadmium, le plomb ou le mercure, sont quant à eux des contaminants stricts hautement toxiques même à de faibles teneurs. Il est vrai que, contrairement à des contaminants synthétiques comme les produits phytosanitaires, tous les ETM sont naturellement présents dans les sols (fond pédo-géochimique). Mais du fait de nombreuses activités anthropiques ils s'accumulent dans les horizons supérieurs du sol, horizons où se développent les racines des plantes qui peuvent ainsi facilement en prélever de grandes quantités.

On estime qu'en Europe, sur les 1,8 millions de sites potentiellement contaminés, plus d'un tiers des contaminants seraient des ETM (source Agence Européenne de l'Environnement, 2006). De quels moyens disposons-nous pour réduire les risques liés aux contaminations métalliques ? Réduire les sources anthropiques d'ETM est bien sûr indispensable mais difficile, les ETM étant liés à de nombreuses activités (Tableau 1). Et que faire des zones déjà contaminées ? Pour répondre à cette question il nous faut d'abord distinguer deux types de contamination, les **contaminations locales*** et les **contaminations diffuses***.

Les **contaminations locales** sont liées à des sources fixes de contaminants (déversement accidentel, fuite de canalisation, dépôt de déchets...) et se limitent à de petites surfaces. En France on dénombre plus de 4000 sites pollués ou potentiellement pollués appelant à une action des pouvoirs publics (source Basol 2007) dont 7 des 10 polluants les plus fréquents sont des ETM.

Les **contaminations diffuses** sont générées par un apport provenant d'une ou plusieurs sources mobiles et s'étendent sur de vastes surfaces (dépôts atmosphériques, dépôts de sédiments, pratiques agricoles, épandages de déchets...).

Tableau 1. Applications industrielles et effets sur la santé humaine de quelques polluants métalliques (Cd, Pb, Zn et Ni) (liste non exhaustive) (sources : [fiches de données toxicologiques de l'INERIS](#)).

	Utilisations	Effets sur la santé
Cadmium et ses dérivés	Métallisant de surface, alliages Accumulateurs électriques Fabrication de pigments Stabilisateurs de matières plastiques Photographie	Gastro-entérite, vomissements, diarrhées Myalgie, Dyspnée, Cyanose Pathologies rénales Troubles pulmonaires (dont cancers) Troubles des métabolismes
Plomb et ses dérivés	Batteries électriques Alliages Enrobage de câbles Soudure, imprimerie, tuyauterie Peintures, munitions Fabrication du papier	Troubles digestifs Lésions tubulaires Lésions du système nerveux Troubles hépatiques
Zinc et ses dérivés	Alliages, zingage Pharmaceutique et cosmétique Fongicides Lubrifiants Alimentation d'animaux d'élevage	Détresse respiratoire Modification du système gastro-intestinal Altération du système immunitaire Trouble du développement embryonnaire Troubles « moteur »
Nickel et ses dérivés	Alliages, nickelage Catalyseurs Mordants pour textiles Batteries Colorants du verre et de la porcelaine Masques à gaz	Maux de tête, vertiges, nausées, vomissements, insomnies Pathologies respiratoires (dont cancers) Cyanose, tachycardie Perturbations visuelles, débilité

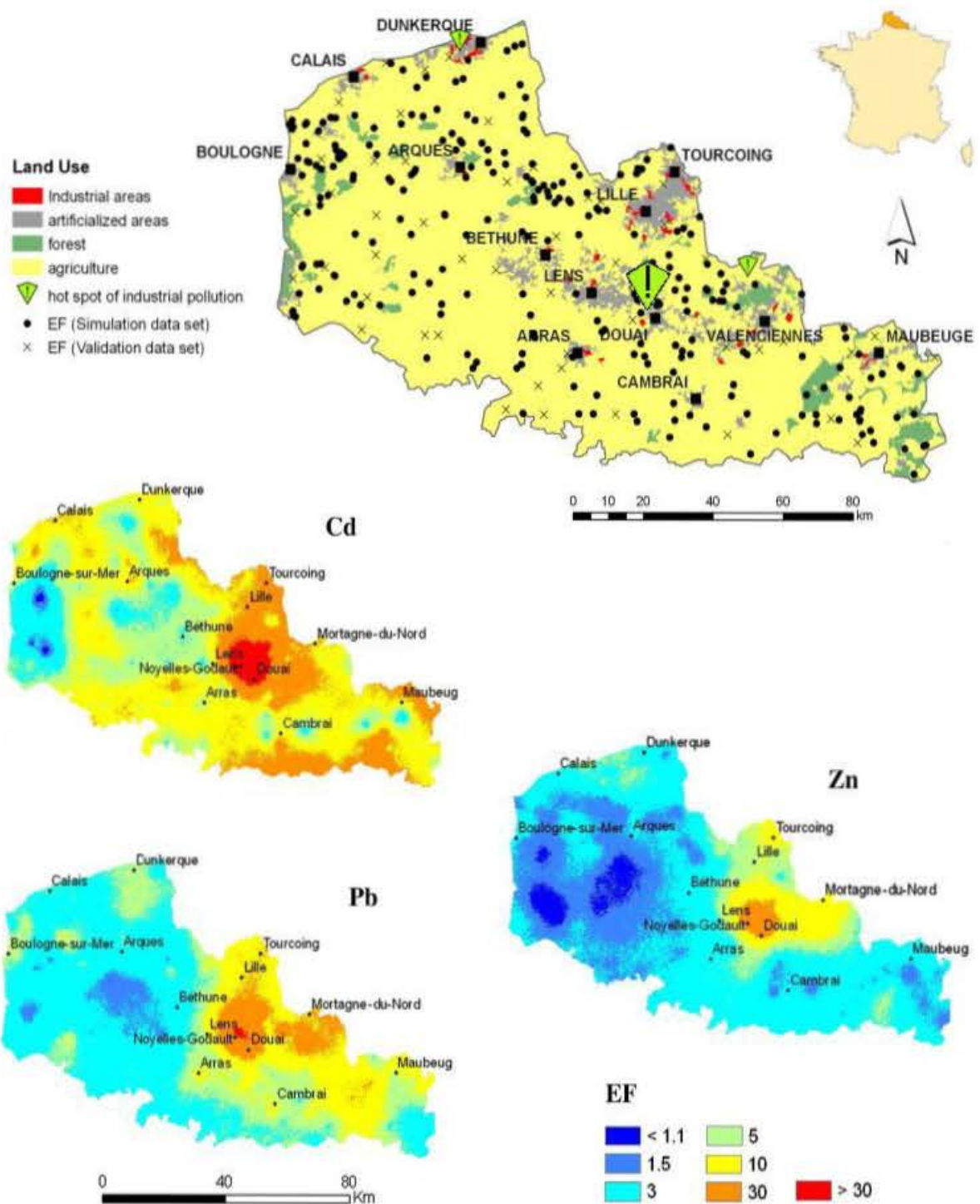


Figure 1. Enrichissement en ETM des sols du Nord de la France, d'après Bourennane *et al.* (2010). Mise en évidence d'une contamination diffuse à l'échelle d'une région à partir d'une seule source industrielle. EF représente le degré d'enrichissement en ETM par rapport au fond pédo-géochimique.

Dans le cas de contaminations locales, les teneurs en ETM dépassent souvent les seuils sanitaires réglementaires, mais les surfaces relativement faibles permettent tout de même la remédiation de la zone contaminée. La remédiation se fait hors site, donc après excavation, par des procédés physico-chimiques de dépollution très énergivores et très coûteux (lavage acide, procédés électrochimiques). Cependant, une pression foncière forte justifiera facilement leur choix et dans le cas contraire le site sera soumis à l'isolement et à la surveillance. En France, plus de 2500 sites ont été référencés comme appelant à une action des pouvoirs publics car on y a constaté une pollution des sols ou des nappes d'eau souterraine (source [BASOL](#), 2007). Sur ces 2500 sites, 7 des 10 polluants les plus constatés sont des ETM (Pb, Cr, Cu, As, Zn, Ni et Cd). Ces polluants sont présents principalement dans les sites métallurgiques et, dans une moindre mesure, dans les zones de dépôts de déchets.

Dans la plupart des zones rurales françaises, les contaminations diffuses en ETM demeurent faibles, mais l'augmentation des teneurs en Cd, Zn et Ni dans les horizons supérieurs de sols agricoles sont tout de même à surveiller car ces métaux passent facilement dans la chaîne alimentaire (Mench & Baize, 2004). Pour quelques cas, des contaminations diffuses très prononcées sont présentes à la périphérie de certains sites industriels, où les surfaces contaminées peuvent s'étendre sur plusieurs centaines de km² (Figure 1). Ainsi, que ce soit à titres préventif ou curatif, la dépollution et/ou l'isolement des zones rurales s'avèrent difficiles à appliquer, du fait des vastes surfaces mises en jeu. Par ailleurs, les procédés physico-chimiques de dépollution altèrent énormément les propriétés du sol, les rendant donc impraticables sur un sol à usage agricole ou forestier. Quels sont alors les alternatives possibles pour remédier aux contaminations diffuses ?

2 La réponse des plantes aux ETM

En observant comment la « nature » se protégeait des fortes teneurs en ETM dans les sols, des chercheurs eurent l'idée dans les années 80 d'utiliser les propriétés de certaines plantes pour extraire les ETM. En effet, les plantes ont adopté différentes stratégies pour se protéger des concentrations élevées en ETM dans les sols qui sont (1) l'**exclusion** et (2) l'**hyperaccumulation** (Baker, 1981).

Dans le premier cas, les plantes « exclusives » possèdent des « barrières » dans leurs racines pour limiter l'absorption racinaire et la translocation d'ETM des racines vers les parties aériennes. Elles peuvent aussi produire des molécules organiques (phytochélatines) capables de complexer l'ETM afin de le stocker dans la racine sans risque de toxicité (Hart *et al.*, 2006; Seregin & Kozhevnikova, 2008). Mais, en cas de concentration en ETM trop élevée, les "barrières" et la production de phytochélatines perdent de leur efficacité et la plante est intoxiquée, ce qui peut conduire à sa mort. Notons que les céréales sont des plantes « exclusives ».

Dans le second cas, les plantes hyperaccumulatrices absorbent et stockent de grandes quantités d'ETM dans leurs parties aériennes sans symptôme de toxicité. Cette forte accumulation est rendue possible grâce à une succession de mécanismes de détoxification (Figure 2) régulés par les modes de transport, notamment le **transport actif***, la spéciation de l'ETM souvent complexé à des molécules organiques produites par la plante, et les modes d'accumulation dans les tissus foliaires (Seregin & Kozhevnikova, 2008; Milner & Kochian, 2008; Verbruggen *et al.*, 2009). Par définition, elles possèdent dans leurs tissus foliaires plus de 0,1 % de Ni, Co ou Pb, plus de 1 % de Zn ou Mn ou encore plus de 0,01 % de Cd.

Le transport actif désigne le transport d'une molécule qui nécessite, directement ou indirectement, de l'énergie chimique (ATP) pour traverser la membrane d'une cellule.
--

On dénombre environ 450 espèces de plantes hyperaccumulatrices, soit environ 0,2 % des angiospermes (plantes à fleur). Parmi ces 450 espèces, 25 % appartiennent à la famille des *Brassicaceae* (famille du chou, colza, moutarde...). La plupart de ces plantes sont endémiques à des sols métallifères comme les sols calaminaires riches en zinc, plomb et cadmium, ou les sols sur serpentines riches en nickel. Notons que, malgré des caractéristiques à première vue inhospitalières : fortes teneurs en Ni et Mg, peu de nutriments ou conditions sèches (Brady *et al.*, 2005), les sols sur serpentines sont « bénéfiques » au développement de plantes hyperaccumulatrices car les trois quart des hyperaccumulateurs accumulent du nickel (Tableau 2). Ces derniers peuvent contenir jusqu'à 27 000 mg kg⁻¹ de Ni (Brésil) alors que les sols à travers le monde contiennent en général des taux de Ni compris entre 0,2-1000 mg kg⁻¹ (Bani, 2009). En France, les teneurs moyennes en Ni dans les horizons de surfaces de sols agricoles sont d'environ 20 mg Ni kg⁻¹ (Mench & Baize, 2004) tandis que celles des sols serpentiniques sont près de quarante fois plus élevées, avec plus de 800 mg kg⁻¹ de Ni (Vosges, Chardot *et al.*, 2007).

Tableau 2. Seuils d'hyperaccumulation et nombres d'espèces hyperaccumulatrices par ETM, d'après Verbruggen *et al.* (2009).

Trace element	Concentration criterion (% in leaf dry matter)	Number of taxa	Number of families represented
Antimony	≥ 0.1	2	2
Cadmium	≥ 0.01	4	2
Cobalt	≥ 0.1	(26)	11
Copper	≥ 0.1	(35)	15
Lead	≥ 0.1	14	7
Manganese	≥ 1.0	10	6
Nickel	≥ 0.1	390	42
Thallium	≥ 0.1	1	1
Zinc	≥ 1.0	14	6

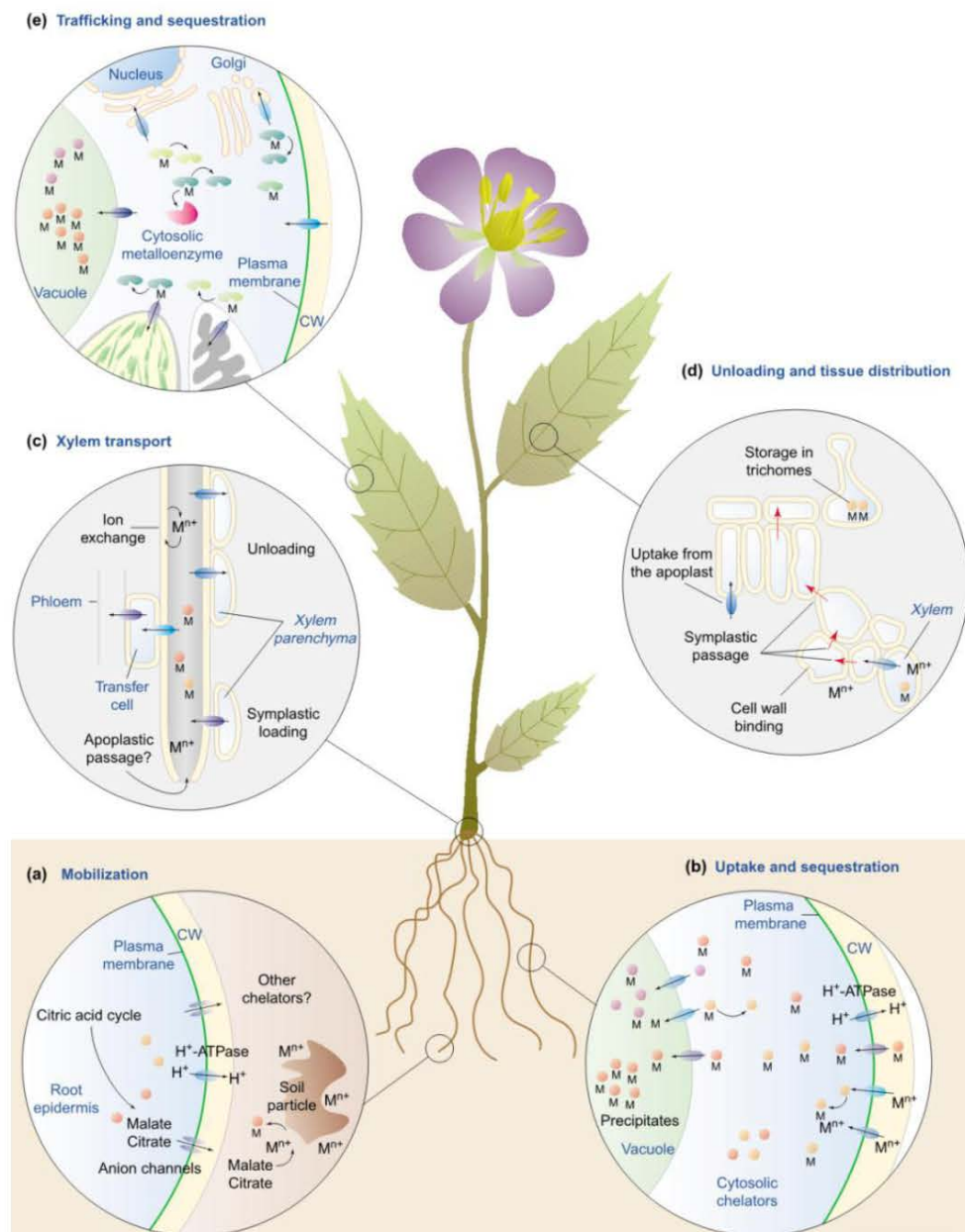


Figure 2. Exemple de processus impliqués dans le transfert d'un ETM dans la rhizosphère, son absorption et séquestration dans les racines, son transfert dans le xylème et son accumulation dans les parties aériennes, d'après Clemens *et al.* (2002).

3 La phytoextraction des ETM

3.1 Principe de la phytoextraction

Des cultures successives de plantes hyperaccumulatrices permettront donc de prélever les ETM du sol et de les stocker dans leurs parties aériennes, épuisant peu à peu le stock de contaminants. Ce procédé s'appelle la **phytoextraction** (Salt *et al.*, 1995a). A la fin d'une culture, les parties aériennes sont récoltées et recyclées ce qui fait que la phytoextraction peut également être appliquée à l'extraction minière de métaux précieux comme l'or ou le nickel sur des sites naturellement riches en ces éléments : il s'agit alors de « phytomining » (Robinson *et al.*, 2003a; Chaney *et al.*, 2007; Sheoran *et al.*, 2009). Des cultures extensives de l'hyperaccumulateur *Alyssum murale* sur des sols serpentiniques d'Albanie ont permis d'extraire près de 23 kg de Ni par hectare (Bani *et al.*, 2007). Ces quantités, à première vue faibles, seraient pourtant viables aux vues des cours actuels des métaux.

Les intérêts de la phytoextraction sont avant tout un coût de mise en œuvre relativement faible comparativement aux procédés physico-chimiques, une valorisation possible des ETM extraits et le respect des propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol. Notons que dans le sol, seule une fraction de l'ETM sera **biodisponible*** pour la plante. L'ETM devra d'abord passer en solution car les plantes ne prélèvent les ETM que sous une forme dissoute dans la solution du sol. Cette mise en solution des ETM, **la disponibilité***, est fortement influencée par les conditions physico-chimiques du sol (voir paragraphe 4.1). La phytoextraction ne pourra s'effectuer que sur la fraction disponible de l'ETM, cette « limite » n'est cependant pas un frein au procédé car c'est cette même fraction qui pose un risque sanitaire et qu'il faut donc extraire.

<p>La biodisponibilité caractérise l'aptitude d'un élément à être transféré d'un compartiment quelconque du sol vers un organisme vivant. La disponibilité caractérise l'aptitude d'un élément d'être transféré des phases solides du sol vers la solution.</p>

3.2 Les limites de la phytoextraction

Malgré d'intenses recherches sur la phytoextraction, on note peu d'essais en plein champ et d'applications commerciales concluantes. La phytoextraction n'est pas encore opérationnelle et ce pour de nombreuses raisons (do Nascimento & Xing, 2006; Robinson *et al.*, 2006; Van Nevel *et al.*, 2007). Il y a les limites intrinsèques aux plantes hyperaccumulatrices comme

leurs faibles biomasses. En effet, l'hyperaccumulation est un mécanisme très énergivore pour la plante qui va utiliser son énergie pour transporter et séquestrer les ETM au détriment de la production de biomasse. Ces faibles biomasses, même si elles présentent de fortes concentrations, vont limiter les quantités extractibles d'ETM. Il faudra alors mettre en œuvre de nombreuses cultures sur plusieurs années pour extraire des quantités suffisantes d'ETM et abaisser ainsi leurs teneurs dans le sol contaminé. Une voie discutable d'amélioration serait l'utilisation de plantes génétiquement modifiées pour augmenter les biomasses des hyperaccumulateurs ou transformer des plantes non-accumulatrices à fortes biomasses en plantes tolérantes aux ETM. Autre limite, les plantes hyperaccumulatrices sont majoritairement spécifiques à un seul ETM alors que les pollutions sont souvent multiéléments. Dans ce cas, si les pratiques agronomiques le permettent, des cultures mixtes de plantes hyperaccumulatrices pourraient être envisagées. Pour envisager l'usage de la phytoextraction sur un site défini, il faut aussi pouvoir évaluer son efficacité à partir **d'outils d'aide à la décision*** car les essais à long terme au champ ne sont pas envisageables (Van Nevel *et al.*, 2007).

Un outil d'aide à la décision est un outil informatique pour aider un décideur (dans la gestion d'un sol contaminé, le décideur sera le législateur ou le dépollueur) à analyser un problème (sol contaminé en ETM) et à lui fournir des solutions (techniques de dépollution).

3.3 Un besoin d'outils d'aide à la décision

Pour la phytoextraction, l'outil d'aide à la décision doit pouvoir évaluer dans un premier temps l'effet du procédé sur la teneur en ETM dans le sol (est-il possible de réduire la teneur en ETM à un seuil sanitaire acceptable ? si oui, en combien de temps ?) puis si il est envisageable, d'évaluer son coût comparativement à ceux d'autres technologies (Robinson *et al.*, 2003a). Le développement de ce genre d'outil doit se baser sur des **modèles prédictifs*** de prélèvement d'ETM par des plantes.

Un modèle prédictif est un modèle mathématique utilisé pour anticiper des situations, dans lequel des variables connues, dites « explicatives » (teneurs en ETM dans le sol, caractéristiques du sol, climat...), vont être utilisées pour déterminer des variables inconnues, dites « à expliquer » (comme les quantités d'ETM dans la plante).

Ces modèles doivent ainsi prédire (i) la capacité d'une plante à réduire la quantité d'ETM du sol contaminé en deçà d'un seuil donné et (ii) le temps nécessaire pour y parvenir (le nombre de cultures). Notons que la phytoextraction ne s'applique qu'aux parties aériennes facilement récoltables, les racines concentrées en ETM ne pouvant pas être facilement ex-

traites du milieu pollué. Il est donc nécessaire de pouvoir prédire la quantité d'ETM qui sera accumulée dans les parties aériennes de plantes hyperaccumulatrices et, en complément, la quantité d'ETM résiduelle du sol contaminé. Notons qu'afin de prendre en compte les interactions du système sol/plante avec le climat et les pratiques agronomiques, les modèles de prélèvement d'ETM peuvent être intégrés dans des modèles « simplifiés » de simulation de culture comme [le modèle STICS développé par l'INRA](#).

4 Modèles de prélèvement des ETM par une plante

Cette partie a pour objectif de présenter quelques approches de modélisations utilisées pour la prédiction du prélèvement d'ETM. Certains modèles se limitent à une simple équation reliant la concentration en ETM dans la plante à quelques paramètres du sol alors que d'autres sont relativement élaborés car ils cherchent à décrire différents mécanismes et interactions impliqués dans le prélèvement d'ETM, afin de les combiner dans le modèle.

4.1 Modèles statistiques – Fonctions de pédotransfert

Comme nous l'avons vu précédemment, pour être biodisponible un ETM devra passer en solution. La disponibilité des ETM est fortement influencée par les conditions physico-chimiques du sol. Par exemple, une diminution de pH entraînera une forte augmentation de la mise en solution des ETM adsorbés sur les phases solides du sol (Figure 3, Tableau 3). Pour prédire la disponibilité d'un ETM (et donc la quantité d'ETM qui pourra être prélevée par la plante), il est possible de simplifier le système sol aux principaux paramètres physico-chimiques influençant le plus la mobilité comme la nature des **phases sorbantes** (Figure 3), le **pH**, la **capacité d'échange cationique*** (CEC) ou le **potentiel d'oxydo-réduction** (Eh) (Tableau 3).

La CEC (capacité d'échange cationique) correspond à la quantité totale de cations qu'un sol peut retenir sur ces complexes adsorbants à un pH donné. Les cations dissous dans la solution du sol sont attirés par les sites chargés négativement soit de façon permanente (argiles), soit de façon variable selon le pH de la solution (oxyhydroxydes, matières organiques).

Les fonctions de pédotransfert sont donc des outils statistiques où la teneur en ETM dans la plante est corrélée de façon multivariable à la teneur en ETM dans le sol et à quelques paramètres du sol : $[ETM]_{\text{plante}} = f([ETM]_{\text{sol}} ; \text{pH} ; \text{CEC} ; \%_{\text{argile}} ; \dots)$

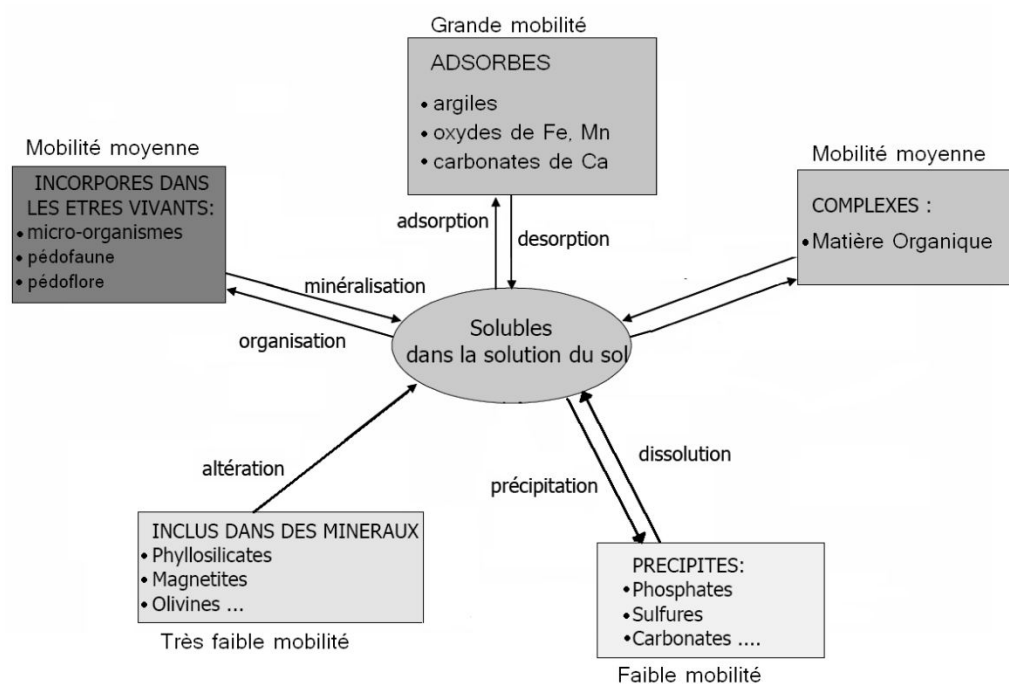


Figure 3. Localisation des ETM dans/sur les différentes phases solides du sol, processus mis en jeu et niveau de mobilité, d'après Denais (2007).

Tableau 3. Principaux facteurs liés au sol contrôlant la disponibilité des ETM, d'après la synthèse réalisée par Migeon (2009). CEC = capacité d'échange cationique ; Eh = potentiel d'oxydo-réduction.

		Disponibilité très faible	Disponibilité faible	Disponibilité moyenne	Disponibilité élevée	Disponibilité très élevée
pH	Alcalin	Cr, Hg, Cu, Ni, Co	Pb, Zn, Cd, As			Se, mo
	Acide	Se, Mo		Cu, Pb, Cr, As	Zn, Cd, Hg, Co, Ni	
Eh	Oxydant	Cr	Pb	Cu, Co, Hg, Ni, Zn, Cd, As	Mo, Se	
	Réducteur	Cr, Hg, Cu, Se, Mo, Cd, Pb, As	Zn, Co, Ni			
CEC	Elevée	Cu, Ni, Pb	As, Co, Cr, Hg, Ni, Cd, Mo, Se, Zn			
	Faible				As, Co, Cr, Hg, Ni, Cd, Mo, Se, Zn	Cu, Ni, Pb

L'usage de ces fonctions reste généralement limité à la gamme de sols échantillonnés pour l'établissement de ces relations statistiques. Par ailleurs, elles ne prennent pas en compte les fonctions physiologiques de la plante comme la croissance racinaire ou la nutrition qui peuvent varier selon les types de sols et changer ainsi le prélèvement des ETM (Denaix, 2007). **Ainsi, les fonctions de pédotransfert, « trop simples », ne seraient pas universelles.**

4.2 Modèles mécanistes de type Barber-Cushman

Des modèles basés sur l'**approche mécaniste*** de Barber-Cushman (Barber & Cushman, 1981) ont été utilisées pour modéliser le prélèvement d'éléments majeurs comme N, P ou K, de micronutriments comme Zn ou Mn.

L'approche mécaniste décrit le transfert d'un ETM du sol à la plante hyperaccumulatrice par une succession plus ou moins exhaustive de processus (mise en solution, transport dans la rhizosphère, adsorption racinaire, absorption racinaire...). Elle consiste ensuite à identifier, décrire et hiérarchiser ces différents processus puis de les intégrer afin de simuler le système dans son intégralité (ici le système sol-plante).

Pour simplifier, le modèle de Barber-Cushman se base sur deux processus, (i) le transport radial du soluté du milieu poreux vers la racine prenant en compte la diffusion et la convection et (ii) le prélèvement racinaire du soluté, qui peut être décrit par une **fonction de Michaelis-Menten***. La capacité du sol à compenser ce que la plante prélève de la solution est caractérisé par le « pouvoir tampon du sol », estimant la répartition des solutés entre la phase solide et la solution ; ce pouvoir tampon est généralement décrit par une constante, le coefficient de partition solide/liquide K_d d'une isotherme d'adsorption linéaire (Ingwersen *et al.*, 2006).

La cinétique de Michaelis-Menten représente l'évolution de la vitesse d'entrée des ions dans une cellule en fonction de leur concentration en solution. La vitesse d'entrée (ou influx) augmente jusqu'à une certaine concentration à partir de laquelle l'influx est alors maximal et saturé.

Le modèle de Barber-Cushman est un outil puissant pour étudier et interpréter des expérimentations de fertilisation. Il a été quelques fois utilisé pour prédire l'hyperaccumulation d'ETM (Whiting *et al.*, 2003; Sterckeman *et al.*, 2004; Puschenreiter *et al.*, 2005; Perrigüey, 2006). Cependant, de nombreux paramètres, en particulier racinaires, limitent son applicabilité en tant que modèle de prédiction du prélèvement. Par exemple, le prélèvement décrit par une équation de Michaelis-Menten est déterminé en culture hydroponique où les propriétés d'absorption d'ETM par les racines ne sont pas les mêmes que celles des racines de plantes

cultivées dans un milieu poreux. Par ailleurs, la fonction de Michaelis-Menten se base sur la saturation de l'influx d'ETM dans la racine, déterminé expérimentalement en soumettant la plante à des teneurs « extrêmes » en ETM mais sur des temps très courts pendant lesquelles les changements physiologiques de la plante due à la teneur élevée en ETM ne sont pas perceptibles. D'un autre côté, la surface racinaire et un rayon de racine, entrées nécessaires du modèle, s'avèrent difficiles à mesurer dans un système sol/plante. Bien que ce modèle de Barber-Cushman ait été validé pour la phytoaccumulation d'ETM, le fait que leur robustesse soit soumise à questions (Sterckeman *et al.*, 2004; Perriguet, 2006), **sa complexité et les nombreuses hypothèses sur lesquelles se basent ce modèle ne permettraient pas de l'utiliser comme un modèle prédictif simple.**

De plus, les modèles mécanistes de type Barber-Cushman ne prennent pas en compte tout le fonctionnement écophysio­logique de la plante, pourtant particulièrement crucial pour expliquer et réguler la phytoaccumulation d'ETM.

4.3 Modèles biophysiques basés sur le type de transport et le couplage production de biomasse aérienne/transpiration

Bien qu'également mécanistes, les modèles biophysiques basés sur le type de transport couplé de l'eau et du soluté, de la solution du sol au xylème, et sur le couplage production de biomasse aérienne/**transpiration*** sont beaucoup plus simples et surtout prennent largement en compte le fonctionnement biologique de la plante. C'est pourquoi nous les avons choisis.

La transpiration est la perte d'eau par évaporation à la surface des feuilles. Cette perte engendre une tension (aspiration) vers le haut de l'eau dans la plante et contribue ainsi à faire monter la sève brute par le xylème (vaisseaux conducteurs) des racines jusqu'aux feuilles. La transpiration permet ainsi l'absorption racinaire d'eau et de solutés (sève brute) et leurs circulations dans la plante.

Afin de les introduire, nous rappelons quelques bases d'écophysio­logie et de prélèvement couplé d'eau et de soluté (ETM) par la plante. La transpiration est couplée à la production de biomasse et est le moteur de la translocation des solutés des racines aux parties aériennes *via* le xylème (Figure 2 et Figure 4). Il a été montré qu'une augmentation du flux de transpiration engendrait une augmentation de l'accumulation d'ETM dans les parties aériennes des céréales (Grifferty & Barrington, 2000; Tani & Barrington, 2005a, 2005b; Van der Vliet *et al.*, 2007; Uraguchi *et al.*, 2009), des arbres (Cosio *et al.*, 2006), des plantes accumulatrices (Salt *et al.*, 1995b; Liu *et al.*, 2010) ou des hyperaccumulateurs (Xu *et al.*, 2006).

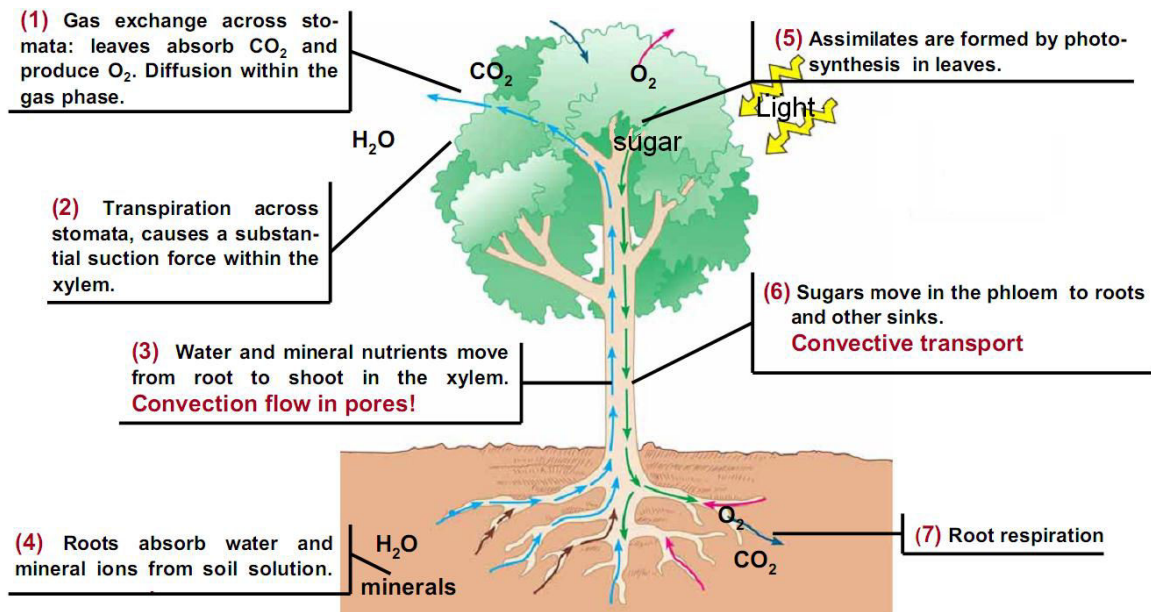


Figure 4. Mouvement de l'eau et des solutés dans la plante induit par la transpiration couplée à la croissance ; redistribution du carbone induit par l'assimilation foliaire du CO_2 couplée à la transpiration, puis par la photosynthèse, d'après une communication de Steudle (2010).

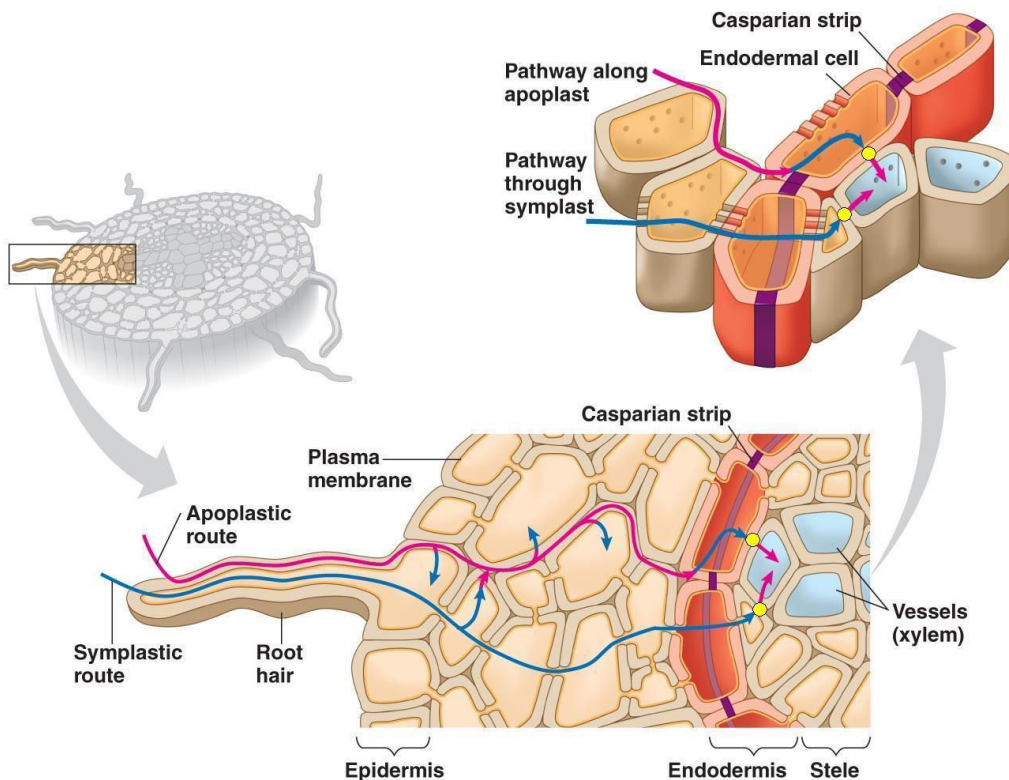


Figure 5. Il existe deux voies de passages pour l'eau et les solutés, la voie apoplasmique (espace entre les parois cellulaires) et la voie symplasmique (dans les cellules). Dans l'endoderme, une barrière (la bande de Casparij) empêche le passage apoplasmique des solutés qui doivent alors emprunter la voie symplasmique pour entrer dans la stèle.

Le transport combiné d'eau et de solutés dans la racine est complexe, avec un transfert de la solution du sol aux racines selon des voies parallèles, apoplasmiques et symplasmiques (Steudle & Peterson, 1998; Hopmans & Bristow, 2002) (Figure 5). Le facteur de bioconcentration lié à la transpiration (TSCF, « transpiration stream concentration factor ») correspond au rapport des concentrations en soluté dans le xylème et la solution du sol ($TSCF = C_x/C_s$). Ce facteur permet de caractériser le type de transport prédominant du soluté, de la solution du sol au xylème (Russell & Barber, 1960).

Lorsque TSCF est égal à 1, les solutés sont transportés passivement avec le flux d'eau. Un TSCF inférieur à 1 indique que le soluté a été adsorbé sur ou dans les cellules racinaires, très perméables à l'eau mais beaucoup moins au soluté. Ce type de transport caractérise les plantes « exclusives ». Au contraire, un TSCF supérieur à 1 traduit un transfert facilité du soluté par rapport à l'eau, grâce à des transporteurs actifs. Ce type de transport actif constitue un trait majeur des plantes hyperaccumulatrices : l'**hydrolyse de l'ATP*** alimente en énergie des protéines de transport (pompes) qui permettent le transfert des ETM contre leur gradient électrochimique dans le xylème. Cette énergie utilisée pour le transport des ETM, ainsi que pour leurs séquestrations dans les tissus foliaires (autre trait majeur des plantes hyperaccumulatrices), n'est donc plus utilisable pour la production de biomasse, d'où les petites tailles généralement constatées chez les hyperaccumulateurs (Clemens *et al.*, 2002; Verbruggen *et al.*, 2009).

L'**ATP** (adénosine triphosphate) est une réserve d'énergie utilisable par les cellules, qui est produite par respiration cellulaire (transformation des sucres produits lors de la photosynthèse). L'**hydrolyse de l'ATP** (transformation de l'ATP en ADP, adénosine diphosphate) fournit de l'énergie pour le transport actif, la synthèse de molécules complexes comme les protéines.

Dalton *et al.*, (1975) proposent un modèle biophysique de prélèvement simultané d'eau et de solutés pour une racine unique, assimilée à une membrane semi-perméable :

$$J_s = (1-S).C_s.J_v \quad [0-1]$$

où J_s est le flux de soluté passant à travers la membrane racinaire, J_v le flux d'eau passant à travers la membrane racinaire, C_s la concentration du soluté dans la solution du sol et S un coefficient de sélectivité complexe qui intègre notamment la capacité de la racine à être plus ou moins perméable aux solutés, $(1-S)$ s'apparentant au TSCF.

Le facteur de bioconcentration TSCF peut donc être utilisé pour prédire le prélèvement d'ETM (Hopmans & Bristow, 2002; Robinson *et al.*, 2003a; Ingwersen & Streck, 2005). Cependant, la mesure de la concentration en soluté dans le xylème (C_x) ou la mesure du flux de soluté (J_s) sont des paramètres délicats à obtenir, particulièrement si l'on veut conserver les plantes intactes avec leurs flux de transpiration. C'est pourquoi il est possible de déterminer ce TSCF de façon indirecte à partir d'un bilan effectué au cours d'une période de temps de culture donnée (par exemple Trapp, 2000) :

$$M = TSCF.VT.C \quad [0-2]$$

où M est la quantité de métal accumulé dans la partie aérienne de la plante pendant cette période, VT le volume d'eau transpirée pendant cette même période de temps, C la concentration du soluté dans la solution du sol. A notre connaissance, ce coefficient n'a été déterminé qu'une seule fois pour le prélèvement d'ETM (Van der Vliet *et al.*, 2007), pour un pas de temps très court de 9 heures grâce à l'utilisation du ^{109}Cd .

5 Objectifs de l'étude et plan du mémoire

Nous avons vu dans les parties précédentes qu'il y avait un besoin de modèles prédictifs simples de prélèvement des ETM par des plantes hyperaccumulatrices. Les modèles mécanistes de type Barber-Cushman s'avèrent trop complexes pour en faire des outils d'aide à la décision. De plus, ils ne prennent pas suffisamment en compte le fonctionnement écophysio-physiologique de la plante. A l'opposé, le modèle biophysique que nous avons choisi est un modèle mécaniste, non spatialisé, qui prend en compte (i) le transfert couplé d'eau et de soluté (ETM) de la solution du sol au xylème et (ii) le couplage transpiration/production de biomasse foliaire. Néanmoins, si l'on veut modéliser la phytoaccumulation d'ETM, il est nécessaire de coupler ce modèle biophysique original à un modèle de disponibilité de l'ETM considéré.

Notre objectif a donc été de concevoir un modèle simplifié de phytoaccumulation d'ETM en associant le modèle biophysique choisi à un modèle non spatialisé de disponibilité de l'ETM en conditions stationnaires (humidité volumétrique constante), adapté de celui d'Ingwersen *et al.* (2006) (Figure 6).

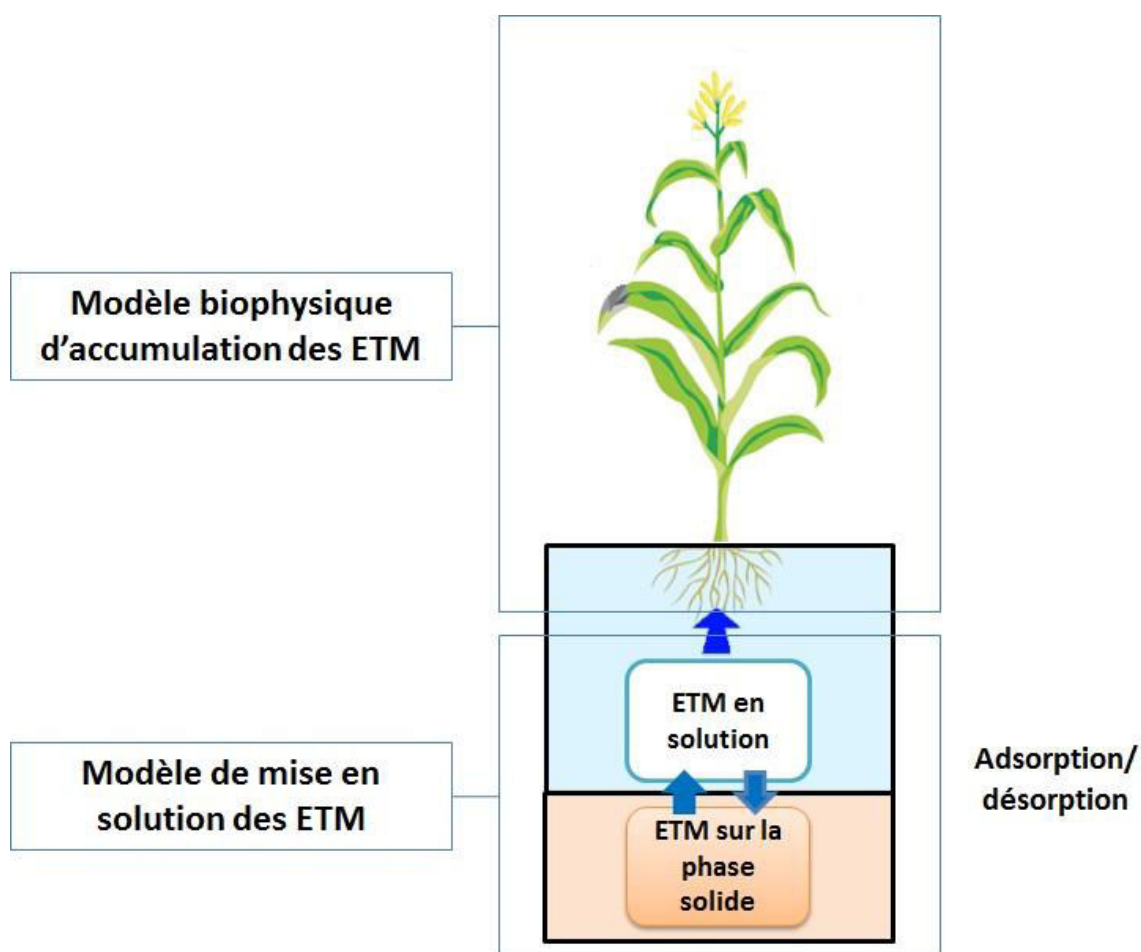


Figure 6. Schéma conceptuel du modèle simplifié de phytoaccumulation d'ETM couplant un modèle biophysique et un modèle non spatialisé de la disponibilité de l'ETM dans la rhizosphère.

Nous avons décidé de mettre au point ce modèle pour le couple nickel/*Leptoplax emarginata*. La plante hyperaccumulatrice de nickel *L. emarginata* a été choisie du fait de sa forte biomasse et donc potentiellement de sa forte transpiration, comparativement à de nombreuses plantes hyperaccumulatrices (Chardot *et al.*, 2005). Par ailleurs, cette plante est une bonne candidate à la fois pour la phytoextraction et le « phytomining » du fait de sa forte accumulation de nickel dans ses parties aériennes (jusqu'à 3,4% de Ni dans la matière sèche lorsqu'elle est dans son milieu naturel (Reeves *et al.*, 1980) et sa capacité à accumuler d'autres métaux comme le cadmium et le zinc (Peer *et al.*, 2006). *Leptoplax emarginata*, plante endémique des sols sur serpentine grecs, est une sœur génétique des espèces hyperaccumulatrices du genre *Bornmuellera* au sein des Alysseae, la lignée *Bornmuellera*-*Leptoplax* étant, à son tour, sœur de deux espèces endémiques méditerranéennes non hyperaccumulatrices *Ptilotrichum rupestre* et *P. cyclocarpum* (Cecchi *et al.*, 2010).

Afin de concevoir ce modèle, nous allons, dans un premier chapitre, étudier l'impact du mode de transfert couplé d'eau et de nickel de la solution du sol au xylème, et de la transpiration (couplée à la production de biomasse foliaire) sur l'absorption et la phytoaccumulation du nickel par l'hyperaccumulateur *L. emarginata* comparativement à une plante « exclusive », le blé. Comment ces deux plantes aux stratégies de défense et de tolérance opposées faces aux ETM régulent-elles leur prélèvement combiné d'eau et de Ni ? Nous allons également déterminer le $TSCF_{Ni}$ pour les deux espèces, l'hypothèse étant que ce facteur de bioconcentration du nickel sera supérieur à 1 pour la plante hyperaccumulatrice (prédominance du transport actif de Ni) et très nettement inférieur à 1 pour le blé (rétention du Ni dans les racines). Ce facteur de bioconcentration est-il constant au cours de la croissance d'une plante ? Varie-t-il avec la concentration en nickel dans la solution du sol ? Pour répondre à ces questions, nous avons suivi les cinétiques de transpiration et d'accumulation foliaire du Ni pour *L. emarginata* et le blé dans du sable contaminé en Ni.

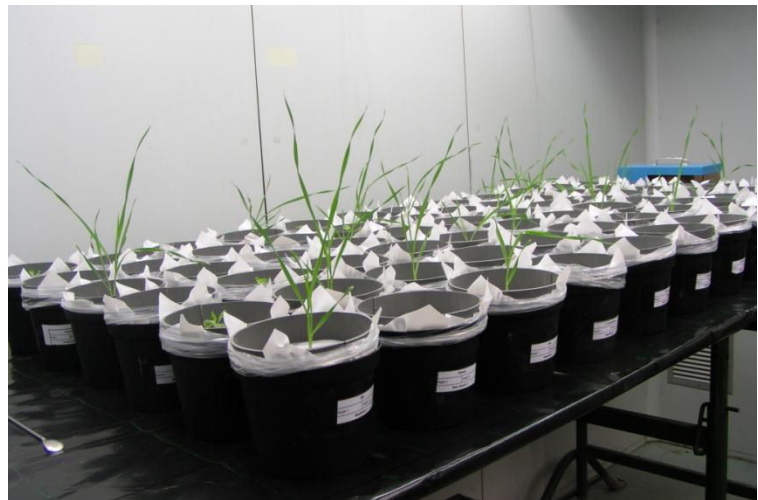
Dans un second chapitre, après une présentation de notre modèle combiné, nous l'optimiserons et nous chercherons à le valider pour une cinétique conjointe d'évolution de la concentration en Ni dans la solution du sol et d'accumulation foliaire du Ni par *L. emarginata* cultivée dans un sol sableux contaminé en Ni. Une discussion sur les résultats de cette modélisation permettra de mieux cerner son originalité, sa performance et les perspectives à envisager afin de pouvoir l'appliquer sur le terrain.

Dans un dernier chapitre, nous avons cherché à relier la localisation du nickel dans les feuilles et leurs tissus de l'hyperaccumulateur sélectionné selon les positions sur la tige, leurs âges, leurs caractéristiques écophysiologicals et les compositions en nutriments dans les tissus.

Enfin, nous conclurons et suggérerons des perspectives à moyen terme à ce travail de thèse.

Chapitre 1

Prélèvement combiné d'eau et de nickel pour une plante hyperaccumulatrice de Ni, *Leptoplax emarginata*, et pour une plante exclusive de référence, le blé de printemps.



Culture en phytotron de Leptoplax emarginata et de blé

1 Introduction

L'objectif de ce chapitre est d'étudier le prélèvement combiné de l'eau et du nickel ainsi que le mode d'accumulation du nickel par l'hyperaccumulateur de Ni *Leptoplax emarginata*, et par une plante « exclusive » de référence, le blé de printemps. Pour cela, notre attention s'est portée sur une modélisation biophysique de l'accumulation du nickel dans les feuilles, selon son mode de transfert (limité pour les plantes « exclusives » ou facilité pour les hyperaccumulateurs) et en fonction de la transpiration, cette dernière étant intimement couplée à la production de biomasse foliaire. La transpiration est le moteur du prélèvement et du mouvement de l'eau dans la plante, mouvement d'eau permettant le transport des solutés, dans le sol, à travers la racine et dans le xylème (translocation des racines aux parties aériennes). Couplée à la production de biomasse aérienne, elle constitue un paramètre clef de la prédiction du prélèvement de métaux *via* des modèles biophysiques utilisant le facteur de bioconcentration lié à la transpiration (Hopmans & Bristow, 2002; Robinson *et al.*, 2003a; Ingwersen & Streck, 2005).

Le facteur de bioconcentration lié à la transpiration, TSCF (« transpiration stream concentration factor », par simplification nous utiliserons l'abréviation anglaise de ce facteur dans le reste du chapitre) est défini comme étant le rapport des concentrations en soluté dans le xylème (C_x) et dans la solution du sol (C_s) (Russell & Barber, 1960; Russell, 1977) :

$$TSCF = C_x / C_s \quad [1-1]$$

La valeur de ce facteur de bioconcentration permet d'identifier le mode de transport du soluté et son intensité. Quand le TSCF est inférieur à 1, cela indique que le soluté a été transféré de la solution du sol au xylème plus lentement que l'eau du fait de sa séquestration sur ou dans les racines (plantes « exclusives »). Quand le TSCF est égal à 1, cela indique que le soluté est transféré passivement avec le flux d'eau de la solution du sol au xylème. Un TSCF supérieur à 1 rend compte d'un transfert actif du soluté contre son gradient de concentration, rendu possible par la présence de protéines de transport et par une grande consommation d'énergie. C'est le cas des plantes hyperaccumulatrices qui combinent une forte translocation des métaux des racines aux parties aériennes et leur séquestration dans les tissus foliaires (Verbruggen *et al.*, 2009).

La détermination du TSCF a été effectuée à partir des mesures de concentration en métaux dans le xylème et dans la solution hydroponique de culture, permettant de discriminer les plantes hyperaccumulatrices et les plantes non accumulatrices ou exclusives. Ainsi, le TSCF était largement supérieur à 1 pour un hyperaccumulateur ($TSCF_{Zn} = 10,5$ and $TSCF_{Ni} = 3,9-4,4$ pour *Thlaspi caerulescens*, $TSCF_{Cd} = 1,6-4,5$ pour l'écotype accumulateur de *Sedum alfredii*, $TSCF_{Cd} = 10-20$ pour *Arabidopsis hallerii*, $TSCF_{As} = 18-73$ pour *Pteris vittata*) alors qu'il était plus faible et/ou inférieur à 1 pour un non accumulateur ($TSCF_{Zn} = 2$ pour *Thlaspi arvense*, $TSCF_{Cd} = 0,4-0,6$ pour l'écotype non-accumulateur de *Sedum alfredii*, $TSCF_{Cd} = 0,53-0,65$ pour *Brassica napus*) (Lasat *et al.*, 1998; Mari *et al.*, 2006; Nakamura *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2008; Ueno *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2009). Cependant, ces valeurs de TSCF seraient surestimées car les sèves étaient extraites à partir de plantes décapitées. En effet, les concentrations en ions dans la sève de plants de maïs décapités sont plus élevées que celles de plants de maïs intacts transpirant (Goodger *et al.*, 2005) et une décroissance de la concentration en ion dans la sève est observée quand le flux de sève augmente (effet de dilution) (Schurr, 1998). C'est la raison pour laquelle nous avons, dans ce chapitre, estimé le TSCF à partir du rapport de la quantité de métal dans les parties aériennes de la plante (Q_F) sur le produit de la concentration en métal dans la solution du sol (C_s) avec le volume d'eau transpiré (V_T) (Trapp, 2000; Robinson *et al.*, 2003a; Van der Vliet *et al.*, 2007) :

$$TSCF = Q_F / (C_s \times V_T) \quad [1-2]$$

Dans le modèle de Dalton *et al.* (1975), la racine est assimilée à une membrane séparant le compartiment « solution du sol » du compartiment « solution du xylème ». Le flux de soluté par unité de surface racinaire traversant la membrane (J_s) est la somme d'une composante diffusive $\omega\Delta\pi$, d'une composante convective $(1 - \sigma)C_sJ_v$ et d'une composante active J_s^* , où ω est la perméabilité osmotique de la membrane, $\Delta\pi$ est la différence de pression osmotique entre les deux compartiments, J_v est le flux d'eau par unité de surface racinaire à travers la membrane, C_s est la concentration du soluté dans la solution et σ est le coefficient de réflexion de la membrane qui varie entre 0 et 1. Un σ de 0 indique une sélectivité nulle, la membrane étant perméable à l'eau et au soluté ; alors qu'un σ de 1 indique une sélectivité totale, la membrane n'étant perméable qu'à l'eau.

Dalton *et al.* (1975) ont démontré que J_s ou C_x , la concentration en soluté dans le xylème, étaient reliés à J_v ou C_s , comme suit:

$$J_s = (1-S).J_v.C_s \quad [1-3]$$

$$C_x = (1-S).C_s \quad [1-4]$$

où (1-S) est similaire au TSCF, et S est le coefficient de sélectivité défini comme suit :

$$S = \frac{\sigma - C_s J_s^* / J_v}{1 + nRT\omega / J_v} \quad [1-5]$$

Durant les trente dernières années, le coefficient de réflexion σ a été principalement estimé à partir de systèmes racinaires de plantes décapitées et installés dans une chambre de pression afin de suivre les flux d'eau et de soluté dans le xylème. De par la présence d'une bande de Caspary dans l'endoderme mais aussi et surtout dans l'exoderme pour 96,5 % des angiospermes étudiées par Ma & Peterson, 2003), on peut s'attendre à des valeurs de σ très proches de 1. Cependant, on trouve généralement des coefficients de réflexion compris entre 0,2 et 0,8 (Steudle & Peterson, 1998). On note une valeur de σ_{NaCl} de 0,64 pour le maïs (Steudle *et al.*, 1987), de 0,975 pour l'orge (Dalton *et al.*, 1975), de 0,32-0,64 pour le hêtre et de 0,12-0,35 pour le chêne (Steudle & Peterson, 1998). Un coefficient de réflexion de 0,85 ou de 0,982 a été estimé, respectivement, pour le prélèvement de nutriments par du maïs (Miller, 1985) ou pour le prélèvement d'une solution nutritive diluée par le haricot (Fiscus, 1986).

Le modèle de transport composite (CTM) développé par Steudle et son équipe (Steudle *et al.*, 1993; Ma & Peterson, 2003) pourrait expliquer les faibles valeurs de σ et les différences entre espèces. Cependant, tous les coefficients de réflexion ont été estimés sur des systèmes racinaires de plantes décapitées malgré le fait que la décapitation affecte profondément le fonctionnement et la physiologie racinaire (Zimmermann *et al.*, 1992; Rygol *et al.*, 1993; Meuser & Frensch, 1998). Il y a donc un sérieux doute sur le fait que le flux d'eau à travers un système racinaire sous pression soit représentatif de ce qui se passe dans une plante intacte qui transpire, sur laquelle l'estimation de σ serait ainsi plus appropriée comme le font Zimmermann et son équipe (Zhu *et al.*, 1995; Schneider *et al.*, 1997a, 1997b), et comme nous l'avons aussi déterminé dans notre étude.

Dans un objectif finalisé de modélisation de la phytoaccumulation du Ni, nous avons cherché dans ce chapitre à (i) valider le fait que $TSCF_{Ni}$ soit supérieur à 1 pour l'hyperaccumulateur et très faible pour le blé, (ii) estimer σ_{Ni} pour l'hyperaccumulateur et le

blé à partir de plantes entières qui transpirent, et (iii) tester l'hypothèse que σ_{Ni} et $TSCF_{Ni}$ aient des valeurs relativement constantes pour l'hyperaccumulateur sélectionné, quel que soit l'âge de la plante, la concentration du Ni en solution et la méthode d'estimation. Pour cela, nous avons suivi l'absorption et la phytoaccumulation du nickel de façon cinétique, la transpiration augmentant de façon couplée avec la production de biomasse aérienne. Enfin, les approches écophysiologiques étant de bons outils d'aide à la compréhension de l'hyperaccumulation (Verbruggen *et al.*, 2009), nous les avons donc utilisées de façon intégrative pour une meilleur compréhension des mécanismes d'hyperaccumulation du nickel.

2 Matériels et méthodes

2.1 Plantes étudiées

2.1.1 *Leptoplax emarginata*

Leptoplax emarginata (Boiss) O.E Schulz est une plante hyperaccumulatrice de nickel endémique des sols ultramafiques de Grèce (Figure 7 et Figure 8). On la trouve dans le massif du Pinde au nord de la Grèce mais aussi dans la partie nord de l'île d'Eubée.



Figure 7. *Leptoplax emarginata* (feuilles + hampe florale) dans son milieu naturel (photo R. Reeves).



Figure 8. Fleurs et fruits de *Leptoplax emarginata* (photo G. Echevarria).

En milieu naturel, cette Brassicaceae peut accumuler jusqu'à 3,4 % de Ni dans sa biomasse aérienne sèche (Reeves, 1980). Par ailleurs, sa biomasse aérienne est plutôt importante pour

une plante hyperaccumulatrice ce qui en fait une bonne candidate pour la phytoextraction du nickel (à noter que la hampe florale peut atteindre deux mètres en milieu naturel) (Chardot *et al.*, 2005). Les graines utilisées pour les expérimentations ont été collectées durant l'été 2006 à une altitude de 830 m sur des sols serpentiniques riches en Ni au pied du massif du Pinde près de Trygona. Ces graines sont riches en Ni avec une teneur moyenne en Ni de 5,08 mg.g⁻¹ dans la graine sèche sans tégument (1 g de graines sèches correspondant environ à 309 graines).

2.1.2 Blé de printemps

Le blé de printemps (*Triticum aestivum* L.) a été utilisé comme plante témoin non-accumulatrice de Ni (plante « exclusive »). Le blé a été préféré à une plante non accumulatrice phylogénétiquement proche de *L. emarginata* du fait de son importance dans l'agriculture et donc pour la sécurité alimentaire. En effet, cette céréale a déjà fait l'objet de nombreuses recherches sur l'absorption des ETM et sur le couplage photosynthèse/transpiration. Aussi, le modèle biophysique que nous développons pour l'hyperaccumulateur pourrait être transposé au blé dans le cadre de la sécurité alimentaire. Notons aussi que le blé est une plante en C3 tout comme *L. emarginata*.

2.2 Milieu poreux de culture

Les plantes ont été cultivées dans des pots remplis d'un litre de sable quartzeux calibré (HN 0,4-0,8 mm, Sibelco, France) issu du site de Hostun dans le sud-est de la France (principales caractéristiques listées dans le (Tableau 4). Du fait de sa composition grossière (presque quasi-exclusive de sables grossiers > 200 µm) il est très poreux (porosité de 0,45 cm³ cm⁻³) et retient très peu l'eau, sa teneur en eau résiduelle n'étant que de 0,05 cm³ cm⁻³ lorsque le potentiel matriciel de pression est égal -2 kPa. On note la présence d'un peu de fer (méthode Mehra-Jackson), de carbonates et de carbone organique. Le pH à l'eau est alcalin (8,09), ce qui est attribuable aux carbonates. Lorsque l'on observe ce sable à l'œil nu, on note une légère coloration jaune. Son observation à la loupe binoculaire (Figure 9) met en évidence une diversité de grains de quartz de couleurs différentes, avec une majorité de grains blancs (70 %) et quelques grains orange ou rose pâle (30 %). Plus rarement, on trouve des grains noirs et des grains orange tachés de noir.

Tableau 4. Principales caractéristiques du sable quartzeux utilisé (Fe_{CBD} = extraction au dithionite dans tampon citrate-bicarbonate, (Mehra & Jackson, 1960).

Sable			
Distribution granulométrique	Argiles	7	g kg ⁻¹
	Limons	0	
	Sables	993	
Porosité totale		0,45	cm ³ cm ⁻³
Teneur en eau résiduelle à 0 kPa		0,42	cm ³ cm ⁻³
Teneur en eau résiduelle à -2 kPa		0,05	cm ³ cm ⁻³
Fe_{CBD}		0,41	g kg ⁻¹
CaCO ₃		< 1	g kg ⁻¹
pH à l'eau		8,09	
Carbone Organique		0,062	g kg ⁻¹

Tableau 5. Analyses en spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X (XPS) des grains de quartz.

Analyses XPS (% massique)	
Si	11,6
Al	5,77
Fe	0,99
Ca	1,41
C orga.	11,16
N	0
Facteur enrichissement du C orga.	1732



Figure 9. Photographie des grains de quartz blancs, oranges, roses. On distingue au centre de la photo un grain particulier plus sombre et avec des tâches noires.

Des analyses en spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X (XPS) mettent en évidence des revêtements constitués de carbone, de fer et d'aluminium aux concentrations massiques respectives de 11,16 %, 0,99 % et 5,77 % (Tableau 5), ce qui rend le sable un peu réactif. Du fait de la faible teneur en calcium (1,41 %) nous pouvons affirmer que le carbone est très peu présent sous une forme inorganique (moins de 0,5 % de C sous forme de carbonates). Le carbone organique appartient à une structure spéciale car on ne trouve pas d'azote à la surface des grains. Par ailleurs, le facteur d'enrichissement du carbone organique est de 1732, ce qui est extrêmement élevé.

2.3 Cinétiques de phytoaccumulation (cultures en pots)

2.3.1 Fertilisation et contaminations du milieu poreux

Le sable a été fertilisé avec une solution fertilisante dont la composition était (en mg l⁻¹ avec entre parenthèse le sel utilisé) : 58 N (NH₄NO₃); 40 P (KH₂PO₄) ; 50,5 K (KH₂PO₄) ; 40 Ca (Ca(NO₃)₂); 20 Mg (MgSO₄); 4 Fe (FeSO₄) ; 0,5 Mn (MnSO₄) ; 0,3 Zn (ZnSO₄) ; 0,1 B (H₃BO₃); 0,01 Cu (CuSO₄); 0,01 Mo (Na₂MoO₄). Nous avons utilisé deux niveaux de contamination en Ni dans la solution initiale fertilisante : une première solution à 1 mg l⁻¹ de Ni (NiSO₄) pour des cultures de *L. emarginata* (L1) et de blé (B1) ainsi que pour des pots témoins sans plante (T1), et une seconde solution à 10 mg l⁻¹ de Ni pour des cultures de *L. emarginata* (L10).

2.3.2 Préparation des pots

Des pots de 1,5 L ont été tapissés à l'intérieur de sacs plastiques (polyéthylène) pour éviter le drainage. Dans ces pots plastifiés, 1 L de sable sec (soit 1,4 kg) a été mélangé à 200 ml de solution fertilisante/contaminante et ce afin d'avoir une humidité volumétrique du milieu de 0,2 cm³ cm⁻³. Lorsque le mélange sable/solution était bien homogénéisé, les pots étaient recouverts d'un plastique blanc pour limiter l'évaporation du sol au cours de la culture. Seul un trou d'un diamètre de 1 cm situé au centre du plastique blanc permettait



Figure 10. Pot de culture non planté

la croissance de la plante. Afin de maintenir le plastique blanc en surface du sol, un cerceau de PVC a été positionné au-dessus et fixé à l'aide d'un adhésif au pot. Enfin, des pots témoins-évaporation contenant uniquement du sable et 200 ml d'eau déminéralisée ont été préparés pour estimer la quantité d'eau évaporée par le trou central de 1 cm de diamètre.

2.3.3 Germination et repiquage

Après avoir retiré les siliques, les graines de *L. emarginata* ont été mises à germer à 25 °C sur une plaque de germination contenant du sable quartzueux humidifié à l'eau déminéralisée. Après apparition des cotylédons, les plantules ont été repiquées dans des petits pots remplis de 200 ml de sable quartzueux fertilisé (même fertilisation que pour la culture) pour une préculture de deux semaines dans les conditions climatiques de l'expérimentation. A la fin de la préculture, des plantules avec la biomasse aérienne la plus homogène ont été sélectionnées puis repiquées dans les pots. Les graines de blé ont été mises à germer sur du papier filtre imbibé d'eau déminéralisée, à l'obscurité et à 25 °C dans des boîtes de Petri. Après apparition des premières feuilles, les plantules sont directement repiquées dans les pots de cultures.

2.3.4 Dispositif de culture

Sur six semaines de culture, des prélèvements hebdomadaires de plantes et de solutions (4 répétitions par traitement) ont été réalisés en faisant l'hypothèse d'une homogénéité de population pour chaque traitement. Une étude préliminaire de la température, de l'humidité et de la luminosité dans la chambre de culture avait permis de mettre en évidence une hétérogénéité spatiale de ces paramètres. Ainsi les pots ont été distribués en quatre blocs dans une chambre de culture (phytotron) avec un réplicat de chaque prélèvement hebdomadaire de plante par bloc, un réplicat de chaque pot témoin pour deux blocs et deux pots permanents de contrôle d'évaporation par bloc. Les conditions climatiques de la chambre de culture étaient une hygrométrie constante de 50 %, des températures de 20 °C le jour et de 18 °C la nuit avec une photopériode de 16 h et une intensité lumineuse de jour de 325 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ces conditions correspondent à un déficit de pression de vapeur d'eau de 1,17 kPa le jour.

2.3.5 Suivi de la transpiration et irrigation

Pour chaque pot planté, la quantité d'eau perdue par évapotranspiration (ETP) était déterminée quotidiennement par pesées au début de chaque période nocturne. Après la pesée, chaque pot était irrigué de façon à revenir au poids initial et d'ainsi conserver une humidité volumétrique du pot relativement stable. La solution d'irrigation était la solution fertilisante contenant un pourcentage de la concentration initiale en Ni dans la solution contaminante et ce afin de conserver une concentration en Ni relativement constante au cours de la culture. Une étude préliminaire et l'analyse de la littérature ont permis de déterminer ces pourcentages qui étaient de 50 % pour l'hyperaccumulateur (soit une solution à 0,5 mg de Ni l⁻¹ pour *LI* et 5 mg de Ni l⁻¹ pour *LIO*) et de 5 % pour le blé (soit une solution de 0,05 mg de Ni l⁻¹). L'analyse des ions majeurs au cours de la culture nous a poussé à changer la solution nutritive d'irrigation pour le blé à partir du 28^{ème} jour, la nouvelle solution ayant alors la composition suivante (en mg l⁻¹) : 100 N ; 80 P ; 100 K. Les pots témoins de suivi de la concentration en Ni dans la solution (*TI*) ainsi que les pots témoin-évaporation étaient également pesés puis irrigués avec de l'eau déminéralisée. Pour un bloc donné, la quantité d'eau perdue par évaporation (*Ev*) était déterminée en moyennant la quantité d'eau perdue des 2 pots témoins-évaporation. Ainsi, la quantité d'eau transpirée quotidiennement (*T*) était déduite en soustrayant *Ev* et le poids de biomasse fraîche produite le même jour (calculé à l'aide de la courbe de production de biomasse fraîche en fonction du temps).

2.3.6 Prélèvements et analyses

Les prélèvements hebdomadaires ont eu lieu au début de la période nocturne après irrigation. Pour chaque plante, les surfaces foliaires (*SF*) ont été déterminées par analyse d'image (Logiciel WinFOLIA[®]) puis l'humidité foliaire, le poids de la tige et de la biomasse foliaire (*BF*) ont été estimées après un séchage de 48 h dans une étuve à 70 °C. Les racines ont été récupérées et rincées à l'eau déminéralisée pour éliminer les particules de sable adhérent. Après un léger séchage à l'air ambiant, elles ont été trempées sous agitation 1 minute dans un bain de 150 ml de Na₂H₂EDTA à 0,01 M pour désorber le Ni adsorbé à la surface des racines (Kalis *et al.*, 2006). Les solutions de désorption ont été analysées en spectrométrie de masse (ICP-MS). Les racines ont ensuite été rincées plusieurs fois à l'eau déminéralisée avant d'être mises à sécher 48 h dans une étuve à 70 °C et pesées (biomasse racinaire, *BR*).

Lorsque les racines et les feuilles étaient sèches, elles ont été pesées et broyées finement dans un mortier en agate. Des portions de 0,5 g de poudre ont été minéralisées par HNO₃ et H₂O₂ (8:2, v/v) en réacteur clos au four à micro-ondes (Mars 5, CEM Corporation Inc, Matthews, NC, USA). Les teneurs en Ni dans les minéralisats ont été déterminées par spectrométrie d'émission, ICP-AES (Liberty RL, Carian, Inc, Palo Alto, CA, USA).

La solution du sable a été extraite par dépression (à -30 kPa à l'aide d'une pompe à vide) à partir de 200 ml de sable humide. Une partie de cette solution a été filtrée et acidifiée pour analyse du Ni en ICP-AES, l'autre partie a été juste filtrée pour mesurer le pH et analyser des ions majeurs (Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, NH₄⁺, PO₄³⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻) en chromatographie ionique (IC25 Ion Chromatograph, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA).

2.3.7 Calcul des productions de biomasses, des flux de transpirations et de Ni

Une des hypothèses de cette expérience était que les plantes pour chaque traitement appartenaient à une population homogène en termes de croissance et de caractéristiques écophysiological. Cette hypothèse a été validée pour toutes les plantes à l'aide de l'analyse de la variance (ANOVA) sur les volumes d'eau transpirée au cours du 7^{ème} jour de culture. Cette validation d'homogénéité nous a permis de calculer des taux hebdomadaires de production de biomasses racinaires et foliaires et des flux hebdomadaires de transpiration, de prélèvement de Ni, d'adsorption de Ni à la surface racinaire, de séquestration racinaire de Ni et de translocation de Ni. Ces taux et flux ont été calculés en faisant la différence des moyennes du paramètre considéré entre deux périodes de prélèvement, puis en normalisant cette différence à une semaine. Enfin, les facteurs de bioconcentration TSCF_{Ni} et les coefficients de réflexion σ_{Ni} ont été déterminés à partir des taux hebdomadaires de transpiration et de prélèvement de Ni, comme expliqué dans la partie résultats.

2.4 Expérience complémentaire

Nous avons réalisé une expérience complémentaire avec *L. emarginata* cultivée dans les mêmes conditions que la culture de *LI* mais avec seulement dix jours de culture et pas de suivi cinétique. Les plantes étaient quotidiennement irriguées avec de la solution fertilisante ex-

cepté pour le 8^{ème} jour où un ajout de 2 ml de solution de Ni à 100 mg l⁻¹ a été réalisé avant complétement avec de la solution fertilisante. En fin de culture les plantes ont été incisées à 1 cm au-dessus du collet. La première goutte a été éliminée à l'aide d'un papier absorbant puis un tuyau en Tygon[®] a été placé sur la tige afin de récupérer pendant 6 heures la sève qui exsude par pression racinaire dans un vial de 2 ml (Figure 11). Les concentrations en Ni dans la sève (C_x) et dans la solution du sol (C_s) ont permis de calculer le facteur de bioconcentration $TSCF_{Ni}$ microscopique ($TSCF = C_x/C_s$) afin de le comparer avec le $TSCF_{Ni}$ macroscopique calculé par bilan.



Figure 11. Tuyau Tygon[®] placé sur une tige incisée afin de récupérer la sève dans un vial

2.5 Traitements statistiques

Les analyses statistiques et les régressions ont été réalisées à l'aide du logiciel XLSTAT 2010. L'effet des traitements et du type de plante sur les paramètres étudiés ont été testés en réalisant des analyses de la variance à un facteur suivi du test *post hoc* de Bonferroni avec un risque d'erreur α de 0,05 et $p < 0,05$.

3 Résultats

3.1 Evolution de la solution du sable

3.1.1 Concentrations en nickel et pH

La Figure 12 montre l'évolution de la concentration en Ni et du pH de la solution du sable au cours de la culture. On observe que la concentration en Ni était relativement constante pour l'hyperaccumulateur *L1*, avec un C_s moyen sur la culture de $70 \pm 4 \mu\text{g Ni l}^{-1}$, alors qu'elle diminuait fortement pour *L10* avec un C_s moyen de 1134 ± 247 et $334 \pm 73 \mu\text{g Ni l}^{-1}$ en début et en fin de culture, respectivement. Dans les deux cas C_s était très nettement inférieur à la concentration de la solution contaminante initiale (1 mg Ni l^{-1} et 10 mg Ni l^{-1} pour *L1* et *L10*, respectivement). Le pH de *L1* était relativement constant au cours de la culture alors que l'on observe une légère mais significative acidification pour *L10* du 14^{ème} au 35^{ème} jour de culture (pH de 7,7 à 7,2) et une forte acidification au cours de la même période pour *B1* (pH de 7,7 à 5,9). Cette acidification de *B1* a entraîné une forte augmentation de C_s de 66 à $218 \mu\text{g Ni l}^{-1}$. Le pH et C_s sont tous deux statistiquement les mêmes entre *L1* et les pots témoins *T1*.

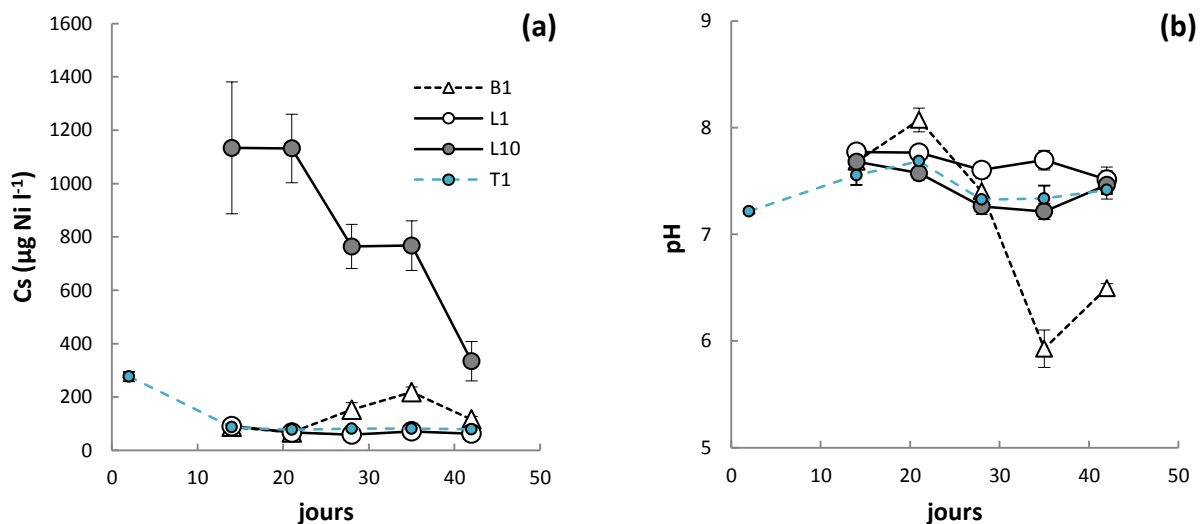


Figure 12. Valeurs moyennes des concentrations en Ni, C_s (a) et pH des solutions du sable (b) pour chaque prélèvement du témoin *T1*, des hyperaccumulateurs *L1*, *L10* et du blé *B1*. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne ($n = 4$).

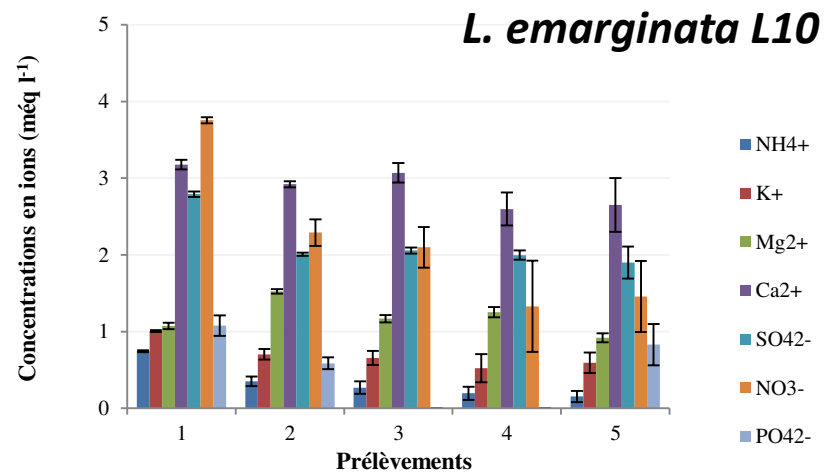
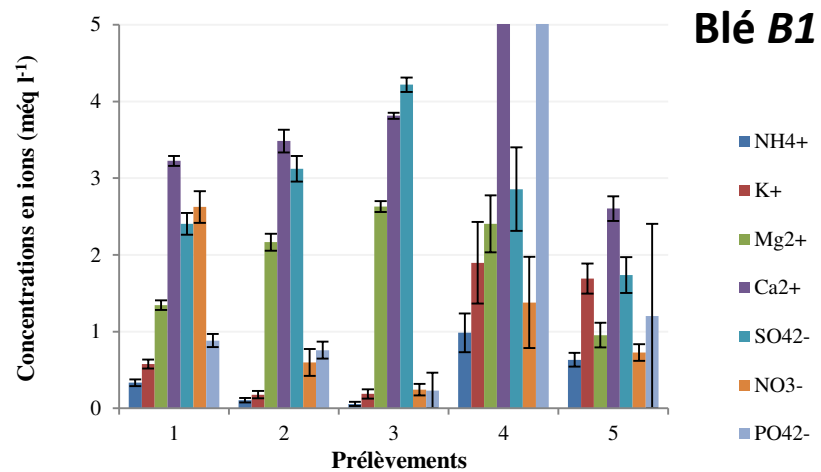
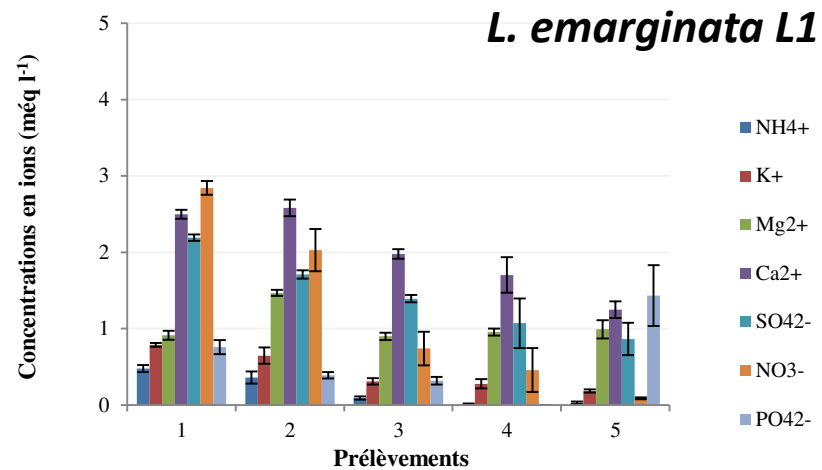
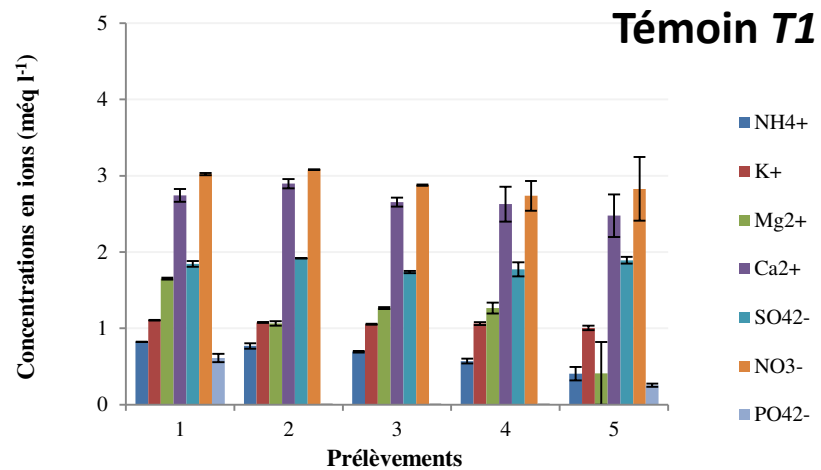


Figure 13. Concentrations des cations et anions majeurs dans la solution du sable pour chaque prélèvement hebdomadaire de solution (le prélèvement 1 débutant après le 14^{ème} jour de culture). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (n = 4).

3.1.1 Ions majeurs

Pour les pots témoins sans plantes *TI*, on observe une légère diminution de la teneur en NH_4^+ au cours du temps alors que les concentrations en K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , SO_4^{2-} et NO_3^- étaient relativement constantes (Figure 13). A la différence des témoins, on note un fort prélèvement de nutriments pour l'hyperaccumulateur *LI* du fait de la forte décroissance des teneurs en K^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , NH_4^+ et NO_3^- du 14^{ème} jour (prélèvement 1) à la fin de la culture. Cette très nette diminution est révélée malgré les ajouts quotidiens de solution fertilisante (cf. § 2.3.5). Nous observons le même phénomène pour l'hyperaccumulateur *LIO* avec NH_4^+ , PO_4^{2-} , NO_3^- et SO_4^{2-} . Contrairement à *LI*, la concentration en Ca^{2+} de *LIO* restait relativement constante. Pour Mg^{2+} , que ce soit *LI* ou *LIO* la concentration restait relativement constante au cours du temps. L'évolution des teneurs en ions pour le blé est plus complexe avec, pour Ca^{2+} , K^+ , NH_4^+ et PO_4^{2-} , une augmentation des concentrations du 14^{ème} au 35^{ème} jour (prélèvements 1 à 4) due à un changement de solution nutritive, et une diminution pendant la dernière semaine.

3.2 Croissance des plantes

3.2.1 Biomasses racinaires et foliaires

Les hyperaccumulateurs *LI* possédaient une seule tige et des feuilles relativement grosses alors que les hyperaccumulateurs *LIO* possédaient des ramifications et des feuilles plus petites (Figure 14) ce qui fait que les proportions de tige dans le poids total de la biomasse aérienne étaient plus grandes pour *LIO* (17 % au 42^{ème} jour) que pour *LI* (11 % au 42^{ème} jour) (données non montrées).

La croissance foliaire et racinaire était plus rapide pour le blé que pour les deux modalités de *L. emarginata* (Figure 15a, b, c). Le même constat peut être fait sur le volume cumulé d'eau transpirée, VT, dont l'évolution peut être corrélée à celles de BF et SF (Figure 15d). On observe pour *LI* un ralentissement de croissance entre le 28^{ème} et le 35^{ème} jour puis une augmentation entre le 35^{ème} et le 42^{ème} jour de culture. Quoiqu'il en soit, les valeurs des biomasses, des surfaces foliaires et des volumes cumulés d'eau transpirée étaient généralement significativement plus élevées pour *LI* que pour *LIO* (Tableau 6 et Tableau 7), mis à part pour les 21 et 35^{ème} jours de culture.



Figure 14. Différences morphologiques entre les quatre répétitions de L1 (premier plan) et les quatre répétitions de L10 (arrière-plan) lors du dernier prélèvement (42^{ème} jour de culture).

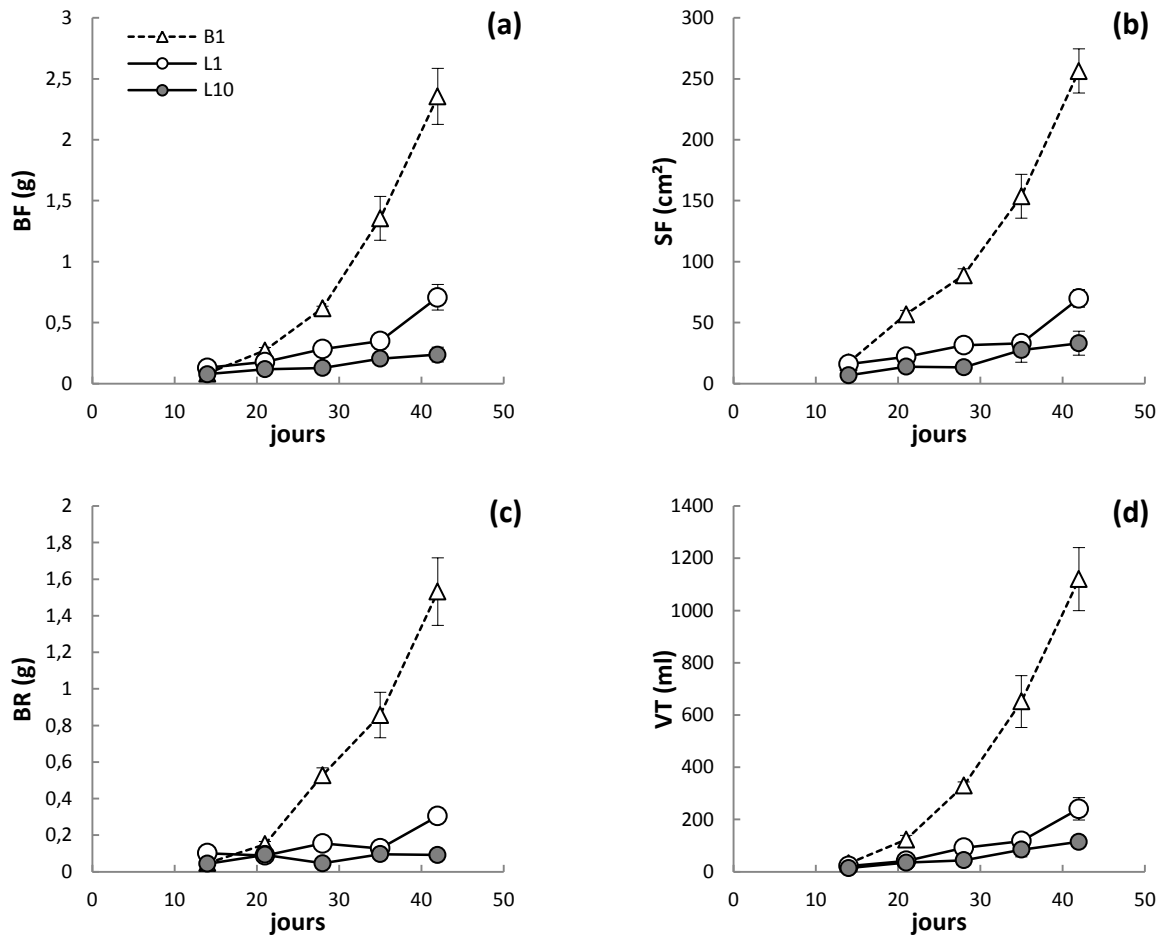


Figure 15. Cinétiques de croissance et de transpiration : valeurs moyennes des biomasses foliaires sèches, BF (a), des surfaces foliaires, SF (b), des biomasses racinaires sèches, BR (c) et des volumes cumulés d'eau transpirée, VT (d) pour chaque prélèvement des hyperaccumulateurs L1 et L10, et du blé B1. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (n = 4).

Tableau 6. Moyennes des surfaces foliaires, des biomasses foliaires et racinaires sèches, et des humidités foliaires pour les hyperaccumulateurs *L1* et *L10* prélevés au cours de leurs cinétiques de croissance et de phytoaccumulation du nickel. Les nombres entre parenthèses représentent l'erreur standard de la moyenne (n = 4). Pour chaque paramètre, dans une même ligne (même jour de culture) la présence de lettres différentes indiquent une différence statistique (test de Bonferroni, $\alpha = 0,05$; $p < 0,04$).

Jours de culture	Surface foliaire, SF (cm ²)		Biomasse foliaire sèche, BF (mg)		Biomasse racinaire sèche, BR (mg)		Humidité foliaire (g eau 100 g ⁻¹ de BF)	
	L1	L10	L1	L10	L1	L10	L1	L10
14	15,9 (0,4) a	6,8 (0,9) b	0,13 (0,01) a	0,08 (0,01) b	0,10 (0,02) a	0,04 (0,01) b	385 (20) a	318 (21) a
21	22,0 (3,5) a	13,9 (2,3) a	0,18 (0,02) a	0,12 (0,01) a	0,09 (0,02) a	0,09 (0,02) a	378 (38) a	408 (28) a
28	31,4 (5,2) a	13,3 (1,6) b	0,28 (0,04) a	0,13 (0,02) b	0,15 (0,02) a	0,05 (0,01) b	434 (17) a	448 (37) a
35	33,0 (5,5) a	27,5 (10,1) a	0,35 (0,06) a	0,2 (0,05) a	0,13 (0,02) a	0,10 (0,02) a	416 (19) a	471 (101) a
42	69,8 (7,2) a	33,0 (9,9) b	0,71 (0,10) a	0,24 (0,06) b	0,30 (0,03) a	0,09 (0,01) b	363 (22) a	415 (12) a

Tableau 7. Moyennes des transpirations journalières par unité de surface foliaire et des volumes cumulés d'eau transpirée pour les hyperaccumulateurs *L1* et *L10* prélevés au cours de leurs cinétiques de croissance et de phytoaccumulation du nickel. Les nombres entre parenthèses représentent l'erreur standard de la moyenne (n = 4). Pour chaque paramètre, dans une même ligne (même jour de culture) la présence de lettres différentes indiquent une différence statistique (test de Bonferroni, $\alpha = 0,05$; $p < 0,03$).

Jours de culture	Transpiration journalière, T (ml cm ⁻²)		Volume cumulé d'eau Transpirée, VT (ml)	
	L1	L10	L1	L10
14	0,17 (0,03) a	0,19 (0,05) a	21,6 (6,6) a	13,6 (2,7) a
21	0,16 (0,03) a	0,24 (0,04) a	41,2 (8,8) a	34,9 (3,4) a
28	0,22 (0,03) a	0,23 (0,03) a	91,6 (12,9) a	43,9 (8,3) b
35	0,15 (0,02) a	0,17 (0,02) a	117 (22) a	84,4 (27,0) a
42	0,11 (0,01) a	0,15 (0,03) a	241 (43) a	114 (21) b

Les teneurs en eau dans les biomasses foliaires de *L1* et *L10* étaient statistiquement identiques et relativement constantes au cours de la culture (Tableau 6), les teneurs en eau moyennes sur la culture étaient de $395 \pm 11 \%$ et $412 \pm 24 \%$ pour *L1* et *L10*, respectivement. Au contraire, la teneur en eau du blé diminuait au cours du temps avec une teneur moyenne de $690 \pm 17 \%$ au 14^{ème} jour et $510 \pm 6 \%$ à la fin de la culture (Figure 16).

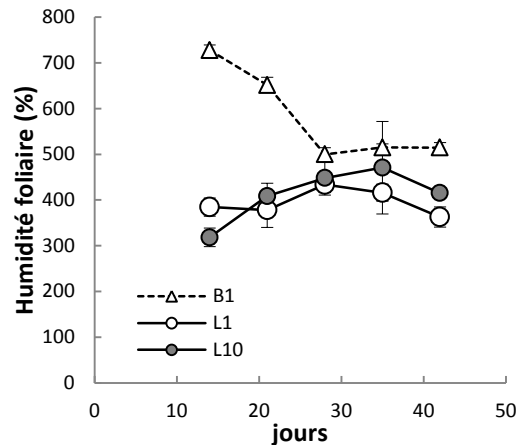


Figure 16. Evolution, au cours des cinétiques de croissance, des humidités foliaires moyennes des hyperaccumulateurs *L1* et *L10*, et du blé *B1*. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (n = 4).

3.2.2 Caractéristiques écophysiologicals

Le rapport de la biomasse racinaire sèche, BR, sur la biomasse aérienne sèche, BA (poids des feuilles + tige) était statistiquement le même pour les deux hyperaccumulateurs (sauf au 28^{ème} jour) et avait tendance à légèrement diminuer pour les deux modalités avec un rapport en fin de culture proche de 0,4 (Tableau 8 ; Figure 17a). On note que la production racinaire à partir du 28^{ème} jour était plus forte chez le blé mais quelle que soit la plante le rapport était toujours inférieur à un. Mis à part en début de culture, avec une surface foliaire spécifique (SFS, rapport de la surface foliaire, SF, sur la biomasse foliaire sèche, BF) de $124 \pm 7 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ et de $90,8 \pm 9 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ pour *L1* et *L10*, respectivement, et en fin de culture avec une SFS de $101 \pm 8 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ pour *L1* et $135 \pm 7 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ pour *L10*, la SFS était statistiquement la même pour les deux modalités d'hyperaccumulateur et était relativement constante au cours de la culture (SFS d'environ $110 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$) (Tableau 8 ; Figure 17b). Au contraire, pour le blé *B1*, nous observons une réduction de moitié de la SFS entre le début et la fin de la culture avec une forte diminution entre le 21^{ème} et le 35^{ème} jour suivi d'une stabilisation.

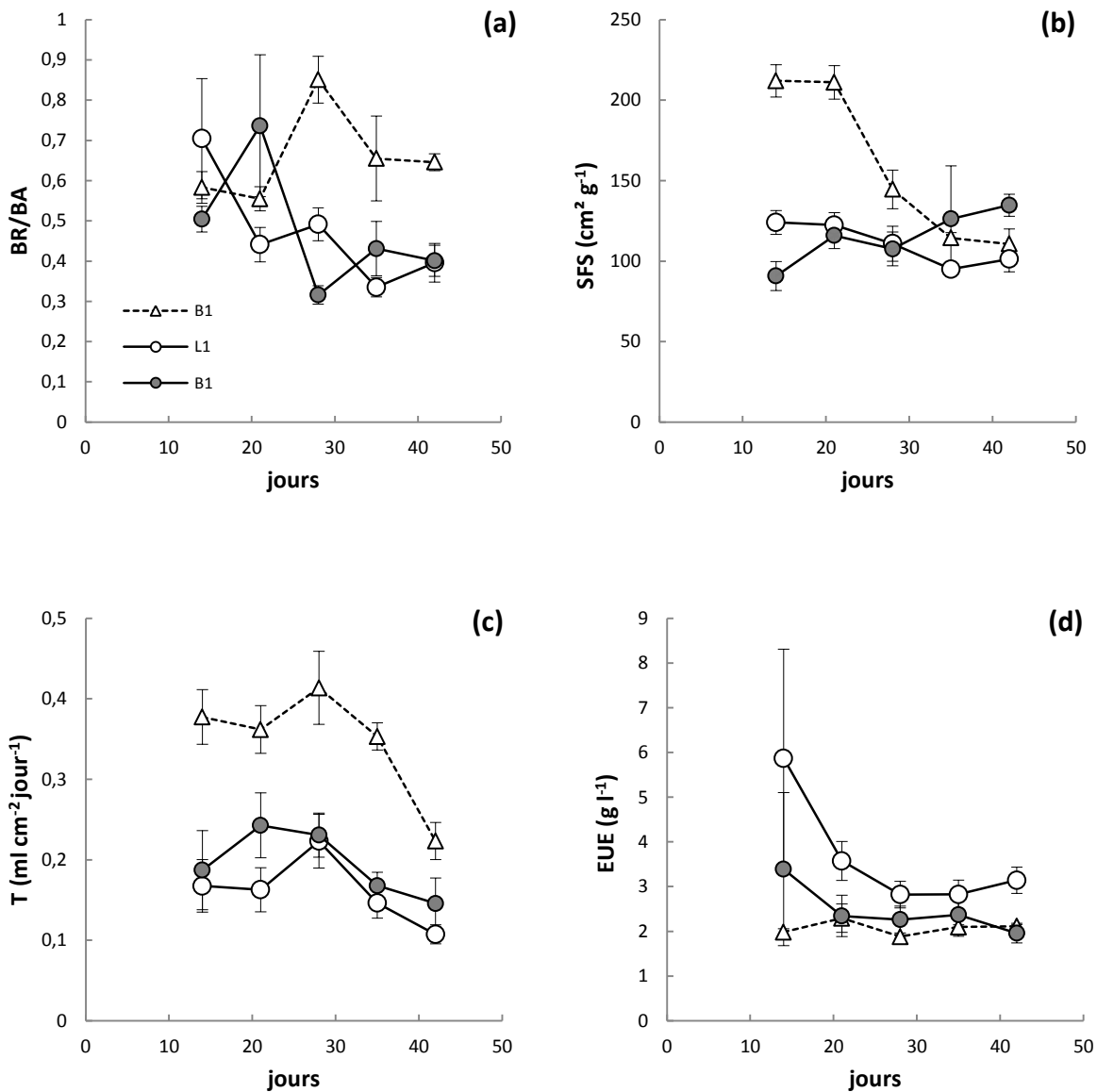


Figure 17. Evolutions, au cours des cinétiques de croissance et de phytoaccumulation du nickel, des valeurs moyennes des rapports de la biomasse racinaire sur la biomasse aérienne, BR/BA (a), des surfaces foliaires spécifiques, SFS (b), des taux de transpiration quotidiens normés à la surface foliaire, T (c) et des coefficients d'efficacité d'utilisation de l'eau pour la production de biomasse foliaire, EUE (d) pour chaque prélèvement des hyperaccumulateurs *L1* et *L10* et du *B1*. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne ($n = 4$).

Le taux de transpiration (volume d'eau transpirée le jour du prélèvement sur la surface foliaire ce même jour) était toujours supérieur pour le blé que pour *L1* et *L10*, avec toujours une diminution de la transpiration du 21^{ème} ou 28^{ème} jour jusqu'à la fin de la culture (Figure 17c). Au cours de la culture que le taux de transpiration était statistiquement identique pour *L1* et *L10*, tout comme l'efficacité de l'utilisation de l'eau pour la production de biomasse foliaire, EUE (le rapport de la biomasse aérienne produite du début de culture jusqu'au prélèvement concerné sur le volume cumulé d'eau transpirée pendant cette même période) (Tableau 8).

On observe tout de même une tendance à ce que l'EUE soit légèrement plus grande pour *L1* que pour *L10* (Figure 17d). Alors que pour le blé, l'EUE était constante au cours de la culture ($EUE_{moyenne}$ sur la culture de $2,02 \pm 0,06 \text{ g l}^{-1}$) on observe que l'EUE des deux hyperaccumulateurs diminuait beaucoup entre le 14^{ème} et le 28^{ème} jour pour *L1* et le 14^{ème} et le 21^{ème} jour pour *L10*. Cependant, si on ne tient pas compte du premier prélèvement, aux vues des erreurs importantes, on note que l'EUE était relativement stable au cours de la culture ($EUE_{moyenne}$ sur les quatre derniers prélèvements de $3,09 \pm 0,17 \text{ g l}^{-1}$ et $2,23 \pm 0,18 \text{ g l}^{-1}$ pour *L1* et *L10*, respectivement).

3.2.3 Production de biomasse foliaire et transpiration

Pour le blé *B1*, l'évolution de l'EUE hebdomadaire, dBA/dVT (rapport du poids de biomasse aérienne produite en une semaine sur le volume d'eau transpiré durant cette même semaine), est similaire à celle de l'EUE (Figure 18a). Pour *L1*, on note une forte diminution du dBA/dVT entre le 2^{ème} et le 3^{ème} prélèvement puis une légère augmentation de ce rapport alors que pour *L10*, dBA/dVT diminue presque tout au long de la culture. Par ailleurs, on observe une forte augmentation du volume hebdomadaire d'eau transpirée (dVT) pour *B1* alors que l'évolution du dVT est plus complexe pour *L1* et *L10* avec parfois des diminutions du dVT au cours de la culture (Figure 18b).

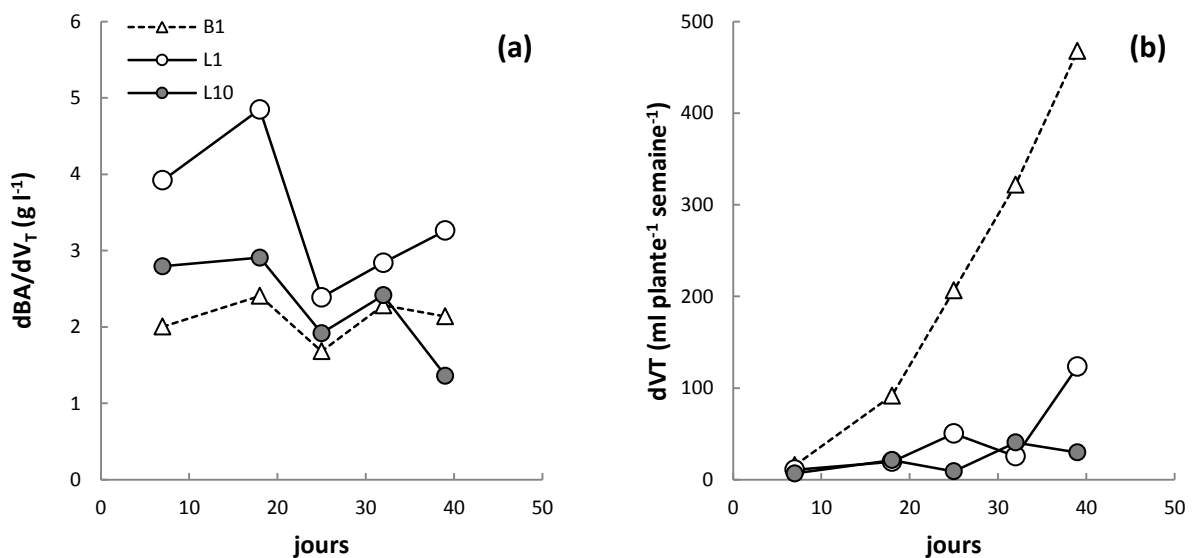


Figure 18. Rapport hebdomadaire de la production de biomasse aérienne sur le volume d'eau transpirée entre deux prélèvements (a) et volume hebdomadaire d'eau transpirée entre deux prélèvements (b).

Tableau 8. Moyennes des rapports biomasse racinaire sur biomasse aérienne, des surfaces foliaires spécifiques, des rapports d'efficacité d'utilisation de l'eau pour la production de biomasse foliaire et des transpirations journalières par unité de surface foliaire pour les hyperaccumulateurs *L1* et *L10* prélevés au cours de leurs cinétiques de croissance et de phytoaccumulation du nickel. Les nombres entre parenthèses représentent l'erreur standard de la moyenne (n = 4). Pour chaque paramètre, dans une même ligne (même jour de culture) la présence de lettres différentes indiquent une différence statistique (test de Bonferroni, $\alpha = 0,05$; $p < 0,03$).

Jours de culture	Rapport biomasse racinaire sur biomasse aérienne, BR/BA		Surface foliaire spécifique, SFS (cm ² g ⁻¹)		Efficacité d'utilisation de l'eau, EUE (g ml ⁻¹)		Transpiration journalière, T (ml cm ⁻²)	
	L1	L10	L1	L10	L1	L10	L1	L10
14	0,70 (0,15) a	0,50 (0,03) a	124 (7) a	90,8 (9,0) b	5,87 (2,44) a	3,39 (1,71) a	0,17 (0,03) a	0,19 (0,05) a
21	0,44 (0,04) a	0,74 (0,18) a	122 (8) a	116 (8) a	3,57 (0,44) a	2,34 (0,46) a	0,16 (0,03) a	0,24 (0,04) a
28	0,49 (0,04) a	0,32 (0,02) b	111 (11) a	108 (11) a	2,82 (0,30) a	2,26 (0,30) a	0,22 (0,03) a	0,23 (0,03) a
35	0,34 (0,02) a	0,43 (0,07) a	95,0 (3,3) a	126 (33) a	2,83 (0,32) a	2,37 (0,48) a	0,15 (0,02) a	0,17 (0,02) a
42	0,40 (0,05) a	0,40 (0,04) a	101 (8) a	135 (7) b	3,14 (0,29) a	1,96 (0,22) b	0,11 (0,01) a	0,15 (0,03) a

Tableau 9. Moyennes des concentrations en Ni dans les feuilles, dans les racines et sur les racines pour les hyperaccumulateurs *L1* et *L10* prélevés au cours de leurs cinétiques de croissance et de phytoaccumulation du nickel. Les nombres entre parenthèses représentent l'erreur standard de la moyenne (n = 4). Pour chaque paramètre, dans une même ligne (même jour de culture) la présence de lettres différentes indiquent une différence statistique (test de Bonferroni, $\alpha = 0,05$; $p < 0,03$).

Jours de culture	Concentration en Ni dans les feuilles, C _F (µg Ni g ⁻¹)		Concentration en Ni dans les racines, C _R (µg Ni g ⁻¹)		Concentration en Ni adsorbé sur les racines (µg Ni g ⁻¹)	
	L1	L10	L1	L10	L1	L10
14	156 (17) a	749 (58) b	89,0 (5,9) a	226 (11) b	1,97 (0,15)	- (-)
21	210 (22) a	2215 (143) b	102 (5) a	49,7 (7,7) b	2,81 (0,31) a	41,7 (19,3) b
28	190 (10) a	2250 (244) b	18,3 (1,1) a	86,4 (10,4) b	8,58 (2,51) a	41,4 (11,0) b
35	225 (34) a	2170 (245) b	34,4 (8,3) a	116 (24) b	4,07 (0,93) a	74,6 (18,8) b
42	165 (16) a	2229 (87) b	16,8 (4,4) a	15,5 (14,1) a	4,06 (0,29) a	46,0 (4,2) b

3.3 Teneurs en nickel dans les plantes

Les teneurs moyennes en Ni dans les feuilles et les racines de *LI* et *L10* sont répertoriées dans le Tableau 9. A partir du 21^{ème} jour, la concentration en Ni dans les feuilles de *L10* (C_F de $2216 \pm 86 \mu\text{g Ni g}^{-1}$) dépassait le seuil d'hyperaccumulation du Ni donné par Brooks *et al.* (1977) qui est de $1000 \mu\text{g Ni g}^{-1}$ (Figure 19a). C_F était plus faible pour *LI* (C_F de $189 \pm 10 \mu\text{g Ni g}^{-1}$) et extrêmement faible pour *BI* (C_F de $0,32 \pm 0,03 \mu\text{g Ni g}^{-1}$ du 21^{ème} jour à la fin de la culture). En complément, les quantités de Ni dans les feuilles (Q_F) augmentaient non linéairement pour les trois plantes (Figure 19b).

Contrairement à C_F , la concentration en Ni dans les racines (C_R) diminuait au cours de la culture pour les trois plantes (Figure 19c). L'évolution de C_R était plutôt chaotique pour *L10* comparé à *LI* et *BI*, avec toujours une valeur de C_R plus forte pour le blé que pour *LI*. La diminution de C_R pour *LI* et *L10* est attribuable à la dilution due à la production de biomasse racinaire et à la translocation de Ni des racines aux feuilles car les quantités de Ni dans les racines (Q_R) diminuaient légèrement pendant la culture. Au contraire, pour le blé on note une forte augmentation de Q_R (Figure 19d).

Le facteur de translocation (C_F/C_R) était toujours supérieur à 1 pour les hyperaccumulateurs et diminuait au cours de la culture. C_F/C_R pour *LI* était de 1,7 – 2,0 aux 14^{ème} et 21^{ème} jours de culture et de 6,5 – 10,4 du 21^{ème} à la fin de la culture. Pour *L10*, C_F/C_R était de 3,3 en début de culture, de 18,7 – 44,6 du 21^{ème} au 35^{ème} jour et de 143,3 à la fin de la culture. De manière similaire, les proportions de Ni transloqué aux feuilles augmentaient du 14^{ème} au 28^{ème} jour pour *LI* ou du 14^{ème} au 21^{ème} jour pour *L10* et étaient extrêmement dominantes après ($92,7 \pm 0,8 \%$ du nickel de la plante pour *LI* et $97,3 \pm 0,6 \%$ du nickel de la plante pour *L10*) avec, en complément, une très faible proportion de Ni adsorbé aux racines ($1,5 \pm 0,6 \%$ pour *LI* et $1,1 \pm 0,2 \%$ pour *L10*) et de Ni séquestré dans les racines ($5,8 \pm 0,6 \%$ pour *LI* et $1,6 \pm 0,4 \%$ pour *L10*) (Figure 20a et b). Au contraire, pour le blé, C_F/C_R était très faible et relativement constant (rapport C_F/C_R de 0,005) avec, en complément, une très faible proportion de Ni transloqué dans les feuilles ($0,7 \pm 0,1 \%$), une grande proportion de Ni adsorbé sur les racines ($9,0 \pm 1,6 \%$) et une proportion dominante de Ni séquestré dans les racines ($90,3 \pm 1,7 \%$) (Figure 20c).

Pour *BI*, la forte augmentation de C_s mesurée entre le 21^{ème} et le 35^{ème} jour, corrélée à l'acidification de la solution pendant cette même période, est aussi corrélée à une diminution de la concentration en Ni adsorbé sur les racines de $13,8 \pm 0,7 \mu\text{g Ni g}^{-1}$ à $5,6 \pm 0,9 \mu\text{g Ni g}^{-1}$. Notons aussi que la concentration de Ni adsorbé sur les racines durant les 14 premiers jours de culture était 8 fois plus importante pour *BI* ($C_{\text{adsorbé}} = 16,9 \pm 1,0 \mu\text{g Ni g}^{-1}$) que pour *L1* ($C_{\text{adsorbé}} = 2,0 \pm 0,2 \mu\text{g Ni g}^{-1}$), avec les mêmes valeurs de pH et les mêmes concentrations en Ni (C_s) dans leurs solutions de sable rhizosphérique.

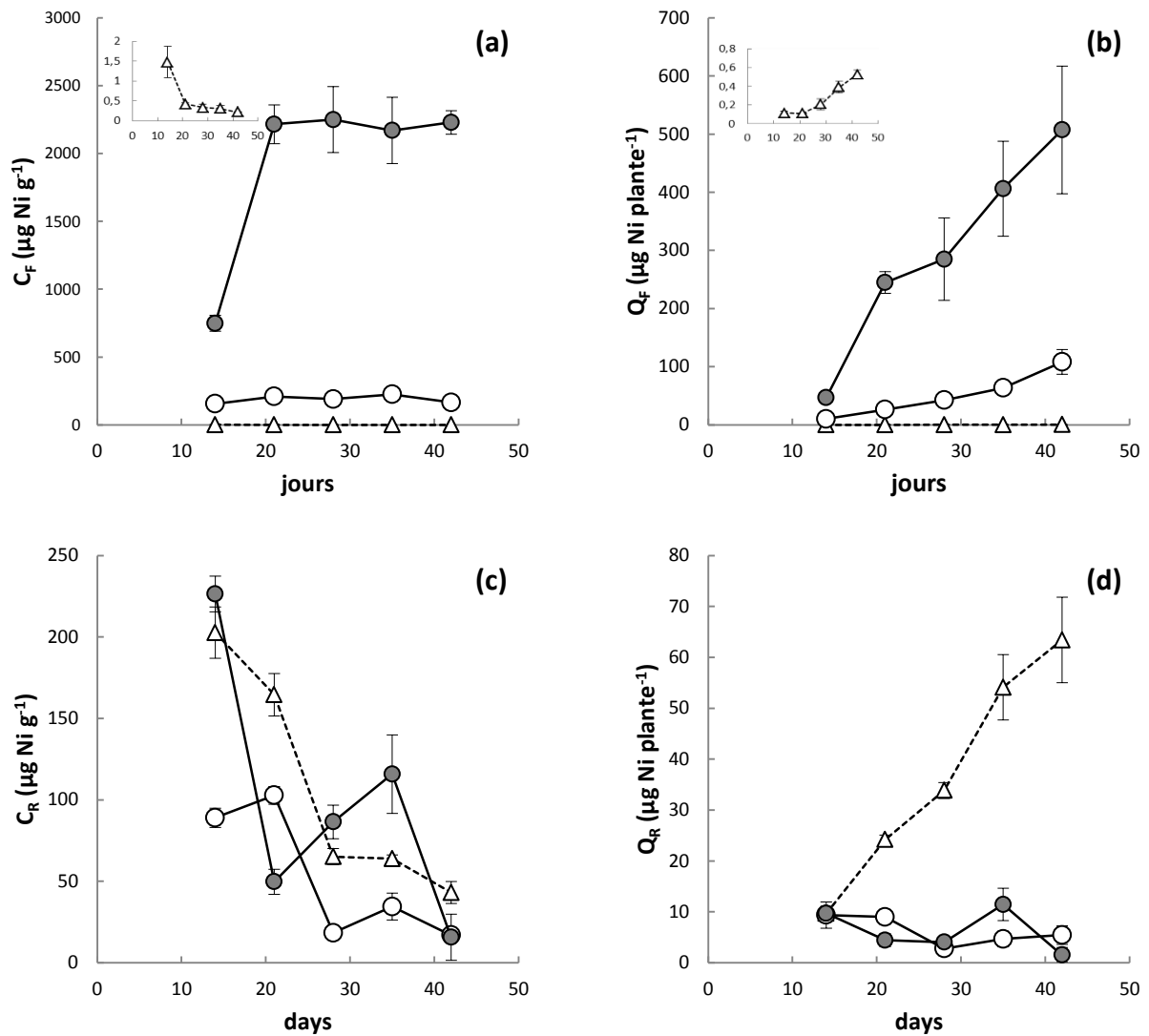


Figure 19. Evolutions, au cours des cinétiques de croissance et de phytoaccumulation du nickel, des valeurs moyennes des concentrations en Ni dans les feuilles, C_F (a) et dans les racines, C_R (c), ainsi que des valeurs moyennes des quantités de Ni dans les feuilles, Q_F (b) et les racines, Q_R (d) pour chaque prélèvement des hyperaccumulateurs *L1* et *L10* et du blé *BI*. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne ($n = 4$).

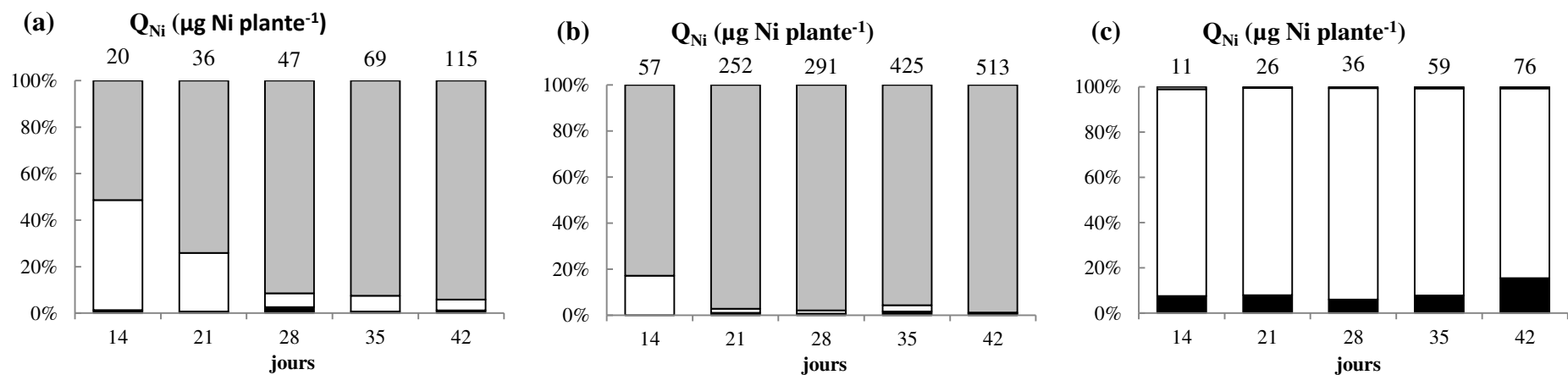


Figure 20. Evolutions des proportions de Ni dans les feuilles (gris), dans les racines (blanc) et adsorbés dans les racines (noir) par rapport à la quantité totale de Ni mesurée dans la plante pour *L1* (a), *L10* (b) et *B1* (c) prélevés au cours de leurs cinétiques de croissance et de phytoaccumulation du nickel. Le chiffre au-dessus de chaque histogramme représente la quantité moyenne de Ni en μg mesurée dans toute la plante.

3.4 Coefficient de réflexion apparent du Ni, σ_{Ni}

Nous avons calculé le coefficient de réflexion apparent du Ni, σ_{Ni} , comme le rapport du flux racinaire de Ni (flux de Ni séquestré sur et dans la racine) sur le flux total entrant dans la plante. σ_{Ni} était proche de 1 pour le blé, quel que soit le prélèvement (σ_{Ni} de $0,99 \pm 0,002$, Figure 21a). Au contraire, pour les hyperaccumulateurs *L1* et *L10*, il était très faible et très variable (σ_{Ni} de $0,02 \pm 0,152$ pour *L1* et $0,02 \pm 0,054$ pour *L10*). En début de culture, σ_{Ni} variait de 0,49 (*L1*) à 0,17 (*L10*) et diminuait après, jusqu'à une valeur négative. Cela est attribuable au stockage provisoire du Ni dans les racines en début de culture, en particulier pour *L1*, suivi par une forte redistribution du Ni engendrant la vidange du nickel présent dans la racine. En fin de culture, σ_{Ni} variait de 0,03 pour *L1* et -0,02 pour *L10*.

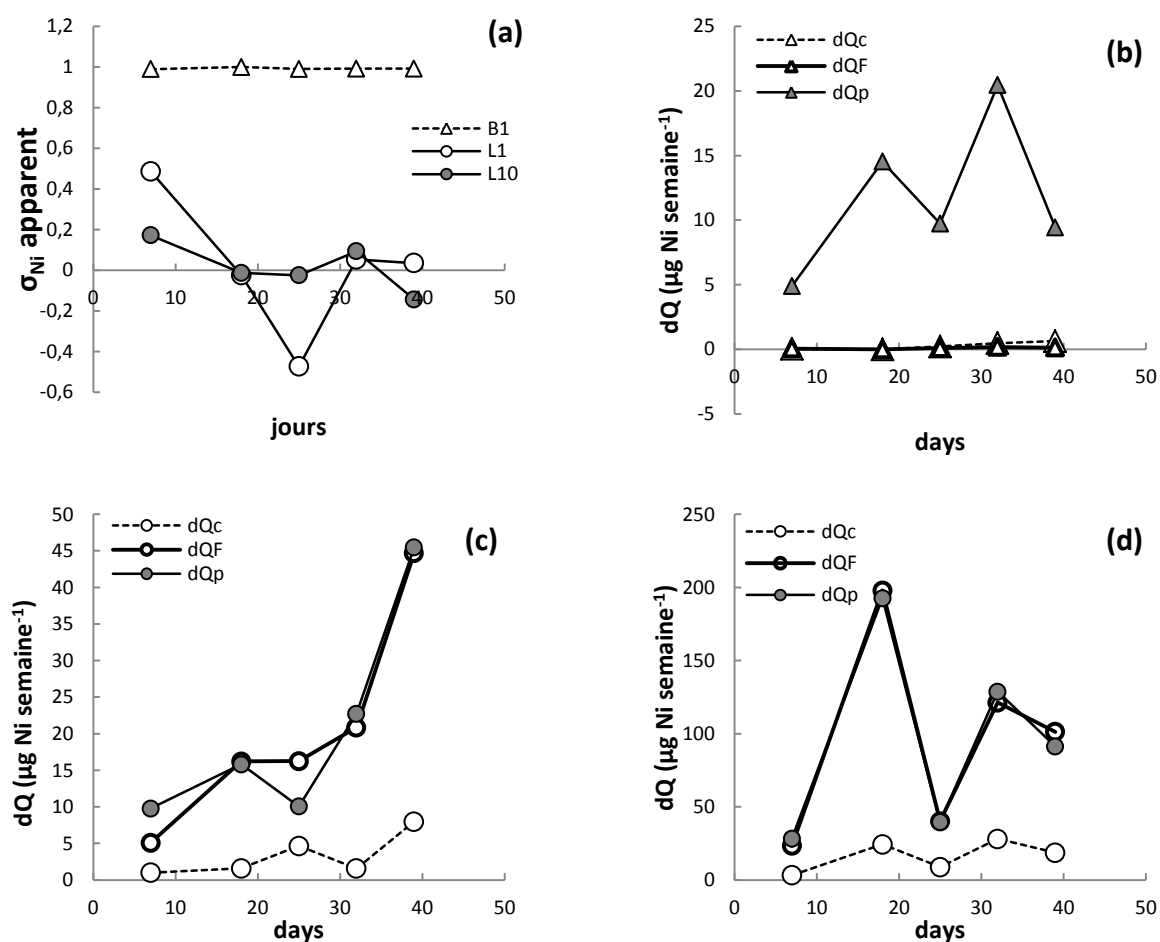


Figure 21. Evolutions, au cours des cinétiques de croissance et de phytoaccumulation du nickel, du coefficient de réflexion apparent σ_{Ni} déterminé comme le rapport des flux de Ni entre la racine et toute la plante (a), du flux convectif de Ni entrant dans la racine (dQ_c), du flux de Ni transloqué des racines aux feuilles (dQ_F) et du flux total de Ni entrant dans la racine (dQ_p) pour le blé *B1* (b), ainsi que pour les hyperaccumulateurs *L1* (c) et *L10* (d).

Nous avons également calculé la composante convective $(1 - \sigma_{Ni}) \cdot C_s \cdot dVT$ du flux de nickel absorbé par la plante (cf. introduction de ce chapitre). La concentration en Ni dans la solution utilisée ici est la moyenne des deux concentrations en Ni C_s mesurées au début et à la fin de la semaine de culture considérée. Ce flux convectif de Ni entrant dans la racine (dQ_c) était comparé au flux total de Ni prélevé ($dQ_p = dQ_R + dQ_F$) et au flux de Ni transloqué aux feuilles (dQ_F) (Figure 21b, c et d). Pour le blé, les valeurs de dQ_c et dQ_F étaient très faibles comparé à celle de dQ_p (très forte séquestration racinaire du Ni), dQ_c étant plus grand que dQ_F à partir de la seconde période de croissance (Figure 21b). Au contraire, les valeurs de dQ_F et dQ_p étaient similaires pour *L1* et *L10* (très forte translocation du Ni) (Figure 21c et d). Pour les deux hyperaccumulateurs, dQ_F était très grand comparé à dQ_c , mais les deux flux avaient les mêmes fluctuations et la proportion de dQ_p par rapport à dQ_F était relativement constante au cours de la culture, avec des valeurs de dQ_p/dQ_F de $17 \pm 4 \%$ pour *L1* et $18 \pm 2 \%$ pour *L10*.

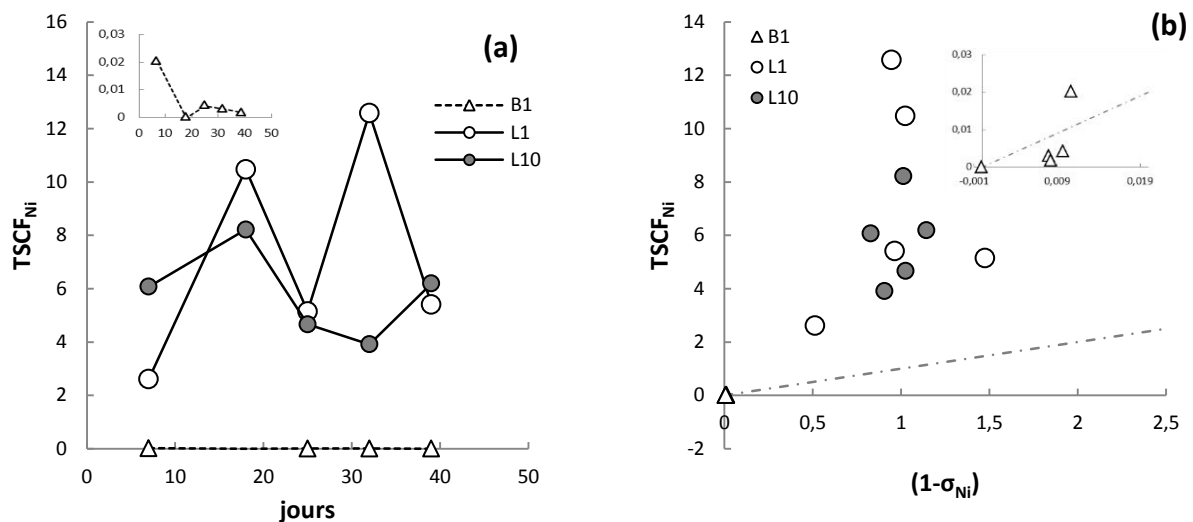


Figure 22. Evolutions, au cours des cinétiques de croissance et de phytoaccumulation du nickel, du facteur de bioconcentration lié à la transpiration $TSCF_{Ni}$ calculé à partir d'un bilan sur les flux d'eau et de Ni (a) et relation entre $TSCF_{Ni}$ et $(1 - \sigma_{Ni})$.

3.5 Facteur de bioconcentration du Ni

Bien que le facteur de bioconcentration $TSCF_{Ni}$ ($dQ_F/(C_s \cdot dVT)$) fluctuait au cours du temps, en particulier pour *L10*, on note qu'il était plus grand que 1 pour *L1* ($TSCF_{Ni}$ de $7,2 \pm 1,8$) et *L10* ($TSCF_{Ni}$ de $5,8 \pm 0,7$), et était extrêmement faible pour le blé *B1* ($TSCF_{Ni}$ de $0,006 \pm 0,004$) (Figure 22a), comme nous l'avions supposé. De plus, le rapport $TSCF_{Ni}/(1 - \sigma_{Ni})$ était plus grand que 1 pour les deux hyperaccumulateurs et proche de 1 ou inférieur pour le blé (Figure 22b). Le $TSCF_{Ni}$ microscopique ($TSCF_{Ni, \text{micro}}$ de $21,7 \pm 4,4$ avec un C_x moyen et un C_s moyen de 4655 et 225 $\mu\text{g Ni l}^{-1}$, respectivement) était 2,4 fois plus grand que le $TSCF_{Ni}$ macroscopique ($TSCF_{Ni}$ de $9,0 \pm 2,3$) qui était du même ordre de grandeur que les $TSCF_{Ni}$ de *L1* et *L10*. Comme nous le pensions, le TSCF est surestimé pour les plantes décapitées comparativement à des plantes entières qui transpirent.

4 Discussion

4.1 Nickel en solution

Dans cette étude sur le prélèvement du nickel et sa redistribution en fonction de la transpiration et du type de plante (hyperaccumulatrice ou exclusive), les cultures ont été réalisées sur un sable quartzueux fertilisé et contaminé artificiellement en Ni. Les concentrations en Ni dans les solutions des pots, pour les trois modalités de contamination, se sont avérées être plus de dix fois inférieures aux concentrations en Ni des solutions utilisées pour la fertilisation et la contamination et ce, même pour les pots témoins sans plantes. Dans le cas du sable, cette forte diminution des teneurs en Ni serait attribuable (i) à la précipitation du fer sous forme de ferrihydrite $\text{Fe}(\text{OH})_3$ du fait du pH élevé (pH de 7 à 7,5), la ferrihydrite adsorbant fortement le nickel en solution (Green-Pederson *et al.*, 1997) et (ii) à la réactivité des revêtements ferriques du quartz.

Le fait que le nickel soit aussi fortement adsorbé sur les phases solides du sable révèle un pouvoir tampon de ce dernier. Nous ferons donc l'hypothèse que tout le nickel adsorbé peut être biodesorbable lors de la phytoextraction.

4.2 Croissance et teneurs en nutriments dans la solution

Les effets des nutriments et du nickel sur la croissance et les caractéristiques écophysiologiques ont été étudiés. Nous avons observé que les humidités foliaires étaient identiques pour les deux hyperaccumulateurs. Les surfaces foliaires spécifiques (SFS) des plantes hyperaccumulatrices, malgré des valeurs statistiquement différentes entre *L1* et *L10* au début et à la fin de la culture, étaient du même ordre de grandeur. Nous n'avons pas observé de différences marquées d'humidité et de SFS entre les deux hyperaccumulateurs, ce qui pourrait notamment s'expliquer par des teneurs en nutriments identiques dans leurs solutions. Par contre, pour le blé, on note une diminution en début de culture de la SFS et de l'humidité foliaire. Cela est corrélé à un manque de nutriments au cours de la culture (en particulier NO_3^- , PO_4^{2-} et K^+), dû à une croissance trop rapide du blé pour le stock de nutriment, qui a ensuite été compensé par un changement de la solution d'irrigation (stabilisation de la SFS en fin de culture, Figure 18b). Il avait été déjà établi que la surface foliaire spécifique et la teneur en eau dans les feuilles étaient de bons marqueurs des ressources en nutriments dans le milieu de culture (Poorter *et al.*, 1990; Wilson *et al.*, 1999), les surfaces foliaires faibles (c'est-à-dire des feuilles épaisses) étant caractéristiques des plantes cultivées sur des milieux pauvres en nutriments.

4.3 Croissance et teneurs en Ni dans la solution

La croissance et la transpiration étaient très souvent significativement plus faibles pour *L10* que pour *L1* (Tableau 6 et Tableau 7) et des différences morphologiques ont été trouvées entre ces deux populations d'hyperaccumulateurs. Les biomasses plus faibles, les feuilles plus petites de *L10* par rapport à celles de *L1* et la présence de ramifications chez *L10* seraient attribuables à la concentration en Ni dans la solution du sable qui était douze fois plus grande pour *L10* que pour *L1* (Figure 13). L'inhibition de la croissance due à l'effet toxique d'un ETM a été souvent reportée (Seregin & Kozhevnikova, 2006), et la diminution de l'efficacité d'utilisation de l'eau pour la production de biomasse foliaire (EUE), même si dans notre cas elle n'est pas statistiquement significative, a déjà été observée quand la concentration en ETM dans la solution du sol augmentait (Menon *et al.*, 2007). Un changement de fonctionnement écophysiologique a été identifié vers les 21^{ème} et 28^{ème} jours de culture pour les deux hyperaccumulateurs. On note un changement d'EUE (Figures 18d et 19d) et du taux de transpiration

(Figure 18c) ainsi qu'un changement dans le prélèvement et la redistribution de nickel (Figure 21a, b et Figure 22a). La nécessité de redistribuer la grande quantité de Ni temporairement stocké dans les racines de *L. emarginata* aurait pu entraîner une augmentation de l'utilisation de l'eau pour transporter le nickel au détriment de l'eau utilisée pour la photosynthèse.

4.4 Phytoaccumulation du Ni

4.4.1 Blé

Le blé était caractérisé par une forte adsorption racinaire du Ni, attribuable aux exsudats racinaires, et par une forte séquestration du Ni dans les racines. En contrepartie, le facteur de translocation, la concentration foliaire en Ni et le facteur de bioconcentration lié à la transpiration, $TSCF_{Ni}$, étaient très faibles. Ces observations qui valident nos hypothèses de fonctionnement des plantes exclusives ont été de nombreuses fois reportées dans la littérature. Le stockage d'ETM dans les racines du blé est très connu, en particulier au moment du tallage (Hart *et al.*, 2006; Seregin & Kozhevnikova, 2006, 2008; Van der Vliet *et al.*, 2007). De façon comparable à nos résultats, le prélèvement de Cd par le blé était également caractérisé par des valeurs très faibles du facteur de translocation (0,06-0,22), de la concentration foliaire en Cd (5-29 $\mu\text{g Cd g}^{-1}$) et du $TSCF_{Cd}$ (0,07) (Greger & Lofstedt, 2004; Van der Vliet *et al.*, 2007).

4.4.2 *Leptoplax emarginata*

A l'inverse du blé, la plante hyperaccumulatrice de nickel *Leptoplax emarginata* était caractérisée par une très faible quantité de Ni adsorbé à la surface racinaire, un stockage provisoire du Ni dans les racines pendant les trois premières semaines de culture puis un faible stockage racinaire (Figure 21a et b), et en contrepartie, un facteur de translocation toujours supérieur à 1 qui augmentait au cours de la culture et une concentration foliaire du Ni élevée qui dépassait le seuil d'hyperaccumulation pour *L10* (Figure 20a). La forte translocation d'ETM des racines aux feuilles est caractéristique des hyperaccumulateurs (Robinson *et al.*, 2003b; Peer *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2002, 2006; Seregin & Kozhevnikova, 2006, 2008; Xing *et al.*, 2008). Dans cette étude, la concentration foliaire de Ni était au maximum de 2216 $\mu\text{g Ni g}^{-1}$ (*L10*) mais, sur le terrain, Reeves *et al.* (1980) ont reporté des concentrations foliaires de 34400 $\mu\text{g Ni g}^{-1}$ pour *L. emarginata* sur des sols serpentiniques très riches en Ni.

4.5 Coefficients de réflexion σ_{Ni}

4.5.1 Blé

Nous avons trouvé une valeur du coefficient de réflexion σ_{Ni} proche de 1 pour le blé, quel que soit l'âge de la plante (σ_{Ni} moyen sur la culture de $0,993 \pm 0,002$), du fait de la forte rétention de Ni à la surface et dans les tissus racinaires. Cette rétention pourrait être possible grâce à la complexation du Ni par des phytochélatines, comme cela a été démontré pour le cadmium (Hart *et al.*, 2006 ; Seregin & Kozhevnikova, 2008), permettant ainsi la détoxification du Ni et donc sa séquestration dans les racines. Seregin & Kozhevnikova (2008) ont montré que le Ni dans les cellules du cortex racinaire était surtout localisé dans l'exoderme du fait de la présence de la première bande de Caspary.

4.5.2 *Leptoplax emarginata*

Lors des trois premières semaines des cinétiques de croissance, le nickel a été stocké provisoirement dans les racines, ainsi les valeurs du coefficient de réflexion σ_{Ni} étaient de 0,49 et 0,17 pour *L1* et *L10*, respectivement, ce qui reste tout de même très faible comparativement au blé. Après trois semaines de culture, les coefficients de réflexion du Ni, σ_{Ni} , étaient très proche de 0 (Figure 23a), ce qui caractérise une forte perméabilité de la racine à la fois au nickel et à l'eau. Quelle est l'origine de ces très faibles valeurs de σ_{Ni} n'apparaissant qu'après trois semaines de culture ? Nous avons observé un changement de fonctionnement écophysio- logique vers le 21^{ème} jour de culture, avant lequel la transpiration augmentait et l'efficacité d'utilisation de l'eau diminuait et après lequel la transpiration diminuait et l'EUE se stabilisait (Figure 18c et Figure 18d). Cette augmentation du flux d'eau a peut-être accéléré le transfert du Ni de la solution au xylème, limitant ainsi sa réactivité avec les cellules racinaires et abaissant donc le coefficient de réflexion. Mais on constate aussi, pendant cette période, la redistribution du Ni temporairement stocké dans la racine (Figure 20d). Une hypothèse, qui reste à démontrer, serait que durant cette période (les 21 premiers jours de culture), la spéciation du Ni a changé en passant de Ni^{2+} à un complexe Ni-ligand due à la production d'acide organique par la plante. Montargès-Pelletier *et al.* (2008) ont démontré que le citrate était le premier chélatant du Ni dans *Leptoplax emarginata* ou *Alyssum murale*, rendant le Ni plus mobile pour une translocation facilitée de ce dernier. Il a aussi été montré que l'histidine serait le principal chélatant du Ni (avec le malate et d'autres molécules à faibles poids moléculaires)

dans le xylème d'*Alyssum murale* où sa concentration augmentait avec le prélèvement de Ni (Kramer *et al.*, 1996; McNear *et al.*, 2010). Nous avons également trouvé des rapports convection/translocation totale des flux de Ni de 17–18 %, ce qui révèle un transport actif du Ni dominant pour les hyperaccumulateurs si nous faisons l'hypothèse d'une très faible diffusion du Ni à travers les membranes racinaires.

La très faible valeur de σ_{Ni} serait aussi attribuable à la structure racinaire de *Leptoplax emarginata*. D'abord, nous avons observé une faible capacité d'adsorption du Ni à la surface racinaire pour l'hyperaccumulateur. Ensuite, la racine de *L. emarginata* est caractérisée par l'absence d'une bande de Caspary sur l'hypoderme (données non publiées d'Ivan Zelko, 2010), ce qui est assez rare chez les angiospermes (moins de 3,5 % des angiospermes caractérisés par Perumalla *et al.* (1990)). Comme pour la structure racinaire d'autres hyperaccumulateurs ou non accumulateurs de la famille des *Brassicaceae* (Enstone *et al.*, 2003; Antosiewicz & Wierzbicka, 1999; Seregin & Kozhevnikova, 2008; Zelko *et al.*, 2008; Fernandez-Garcia *et al.*, 2009; Baxter *et al.*, 2009), *L. emarginata* possède une autre caractéristique dans sa structure racinaire : un « épaissement phi » sur l'endoderme (données non publiées d'Ivan Zelko, 2010) (qui apparaîtrait aussi chez le blé soumis à un stress métallique, Degenhardt & Gimmler, 2000). Notons que des mutants (ESB 1) de l'hyperaccumulateur *Arabidopsis thaliana*, aussi caractérisé par l'absence d'exoderme, produisaient deux fois plus de subérine (Bande de Caspary sur l'endoderme) que des plants sauvages d'*A. thaliana*, engendrant une réduction du flux de transpiration, une diminution (Ca, Mn et Zn) ou une augmentation (Na, S, K, As, Se et Mo) de l'accumulation foliaire de certains éléments mais aucun changement pour la phytoaccumulation du Ni et du Cd (Baxter *et al.*, 2009).

4.6 Facteur de bioconcentration $TSCF_{Ni}$ pour *L. emarginata*

Pour notre gamme de concentration en Ni dans la solution (70–1100 $\mu\text{g Ni g}^{-1}$) nous avons trouvé des facteurs de bioconcentration du Ni, $TSCF_{Ni}$, pour les deux modalités de *L. emarginata* du même ordre de grandeur ($TSCF_{Ni}$ moyens de 5,8–7,2), quel que soit l'âge de la plante ou la manifestation d'un changement de fonctionnement écophysio-logique. Ces valeurs de $TSCF_{Ni}$ mettent en évidence une concentration en Ni dans le xylème bien plus élevée que celle de la solution du sable rhizosphérique. Le transfert du Ni, de la solution au xylème, contre son gradient de concentration, est rendu possible par un transfert facilité au niveau du

xylème *via* des transporteurs actifs (Lasat *et al.*, 1998). Enfin, comme nous le supposions, l'estimation du $TSCF_{Ni}$ microscopique sur des plantes non-transpirantes engendre une surestimation de ce facteur.

5 Conclusion

Le facteur de bioconcentration lié à la transpiration, TSCF, est un bon paramètre pour caractériser la stratégie de défense d'une plante contre la présence d'ETM dans le sol. Pour le blé qui est une plante exclusive, le $TSCF_{Ni}$ était inférieur à 0,02. Ce résultat montre que le blé limite très fortement l'accumulation de Ni dans ses parties aériennes grâce à une forte rétention du métal dans ses racines. Cette forte capacité de rétention du Ni a été aussi mise en évidence par un coefficient de réflexion très proche de 1. Les causes de cette rétention seraient (i) un fort potentiel d'adsorption du Ni à la surface racinaire, (ii) la présence d'une bande de Caspary sur l'hypoderme, (iii) la production de phytochélatines qui détoxifient le Ni afin de le stocker sans danger dans les cellules racinaires, et (iv) un grand volume racinaire de stockage (5 à 7 couches de cellules corticales).

A l'inverse du blé, nous avons trouvé pour la plante hyperaccumulatrice de nickel *Leptoplax emarginata* des valeurs moyennes de $TSCF_{Ni}$ allant de 5,8 à 7,2, ces valeurs largement supérieures à 1 indiquant un mode de transport actif associé à une grande consommation d'énergie et corrélé avec une translocation prédominante du Ni des racines vers les organes foliaires. L'étude du prélèvement combiné de l'eau et du nickel a ainsi mis en évidence un transfert facilité du nickel de la solution du sable aux feuilles de *L. emarginata*. Cette translocation exceptionnelle de nickel des racines aux feuilles serait dû en partie à la grande perméabilité des racines à la fois à l'eau et au nickel (et en complément à la faible capacité de rétention des racines) comme le montre les valeurs très faibles des coefficients de réflexion. Il serait aussi largement attribuable à un fort transport actif, qui représenterait d'après le formalisme de Dalton *et al.* (1975), plus de 80 % du flux de Ni dans la racine en faisant l'hypothèse d'un flux diffusif de Ni négligeable à travers les membranes racinaires. Les très faibles coefficients de réflexion seraient attribuables à l'absence de bande de Caspary sur l'hypoderme, ce qui est extrêmement rare, et à la formation de complexes nickélicifères rendant le Ni encore plus mobile.

Il semblerait que *L. emarginata* soit capable de réguler l'absorption racinaire de Ni et la translocation des racines aux feuilles comme le laisse supposer nos résultats sur les variations de transpiration et d'efficacité d'utilisation de l'eau pour la production de biomasse foliaire ainsi que sur le stockage provisoire du Ni dans les racines en début de culture. Cette élasticité écophysiological n'est pour l'instant qu'une hypothèse qui reste à valider, notamment par un suivi comparatif de plantes dans un milieu contaminé et non-contaminé.

En conclusion, une telle approche écophysiological de l'hyperaccumulation d'ETM dans les plantes hyperaccumulatrices et exclusives est une approche prometteuse, à développer à la fois pour une meilleure connaissance des mécanismes d'hyperaccumulation et d'exclusion d'ETM mais aussi pour une meilleure prédiction de la phytoaccumulation d'ETM, que ce soit dans le cadre de l'ingénierie de la phytoremédiation ou du phytomining ou dans celui d'une meilleure gestion des céréales cultivés sur des sols faiblement contaminés.

En effet, dans une optique de modélisation « simple » de la phytoaccumulation, basée sur le couplage production de biomasse foliaire/transpiration, le TSCF apparaît clairement comme un paramètre clef de la prédiction car très intégrateur des processus d'absorption racinaire du métal, de ses modes de transport (exclusif ou actif) et de la faiblesse ou de l'intensité de sa translocation des racines aux feuilles, et donc représentatif d'une plante donnée. En effet, pour *L. emarginata* ce facteur de bioconcentration lié à la transpiration était toujours du même ordre de grandeur et largement supérieur à 1, quel que soit l'âge de la plante et la concentration en Ni dans la solution du sable. Nous avons vu que sa valeur déterminée à l'échelle microscopique sur des plantes décapitées n'était pas représentatif du prélèvement sur une plante transpirante, le flux de transpiration ayant une influence sur la concentration en métal dans le xylème. Sa détermination est donc à privilégier à l'échelle macroscopique (bilan) car la valeur moyenne ainsi mesurée intègre les variations de transpiration au cours de la culture. Cependant, nous avons tout de même observé des variations du $TSCF_{Ni}$ au cours de la culture, ce qui pose un problème quant au choix d'une valeur unique de $TSCF_{Ni}$ pour la plante hyperaccumulatrice choisie, pour une gamme de concentrations en Ni dans la solution, et pour différents stades de croissance de la plante.

Dans l'optique d'une modélisation simplifiée de la phytoaccumulation, nous avons pu régler ce problème en travaillant de façon cumulée sur nos données de cinétiques de croissance et de phytoaccumulation, ce qui rend la détermination de $TSCF_{Ni}$ plus intégrative et plus robuste, comme nous le verrons dans le chapitre consacré à la modélisation.

Chapitre 2

Suivi et modélisation de l'accumulation foliaire du nickel par *Leptoplax emarginata*.

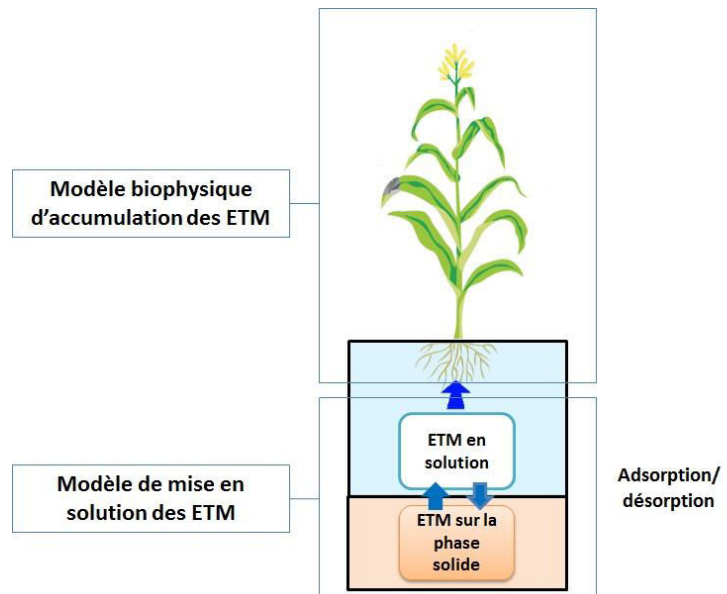


Schéma conceptuel du modèle de phytoaccumulation des ETM

1 Introduction

L'objectif de ce chapitre est de modéliser l'accumulation foliaire du nickel par la plante hyperaccumulatrice *Leptoplax emarginata*, ainsi que l'évolution des concentrations en Ni dans la solution du sol et sur la phase solide. Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction bibliographique de ce document, le développement de la phytoextraction doit se baser, entre autre, sur le développement d'outils d'aide à la décision basés eux-mêmes sur des modèles prédictifs simples du prélèvement de métaux par des plantes (Nevel *et al.*, 2007). Ces modèles doivent à la fois prédire la capacité d'une plante à réduire la quantité de métal du sol contaminé en deçà d'un seuil donné et le temps nécessaire pour y parvenir. Nous avons vu en introduction qu'il existait de nombreux modèles, plus ou moins complexes, simulant le prélèvement des métaux. Par exemple, les fonctions de pédotransfert se limitent à une simple équation reliant la concentration en métal dans la plante aux principaux paramètres physico-chimiques du sol alors que des modèles mécanistes comme le modèle de Barber-Cushman décrivent les mécanismes de transport du métal dans le sol ainsi que son absorption racinaire. Cependant, ces deux types de modèle ne semblent pas adaptés à une prédiction simple et fiable du prélèvement de métaux, les premiers étant trop « simplistes » et donc non généralisables (Denaix, 2007), les seconds trop complexes à mettre en œuvre et, dans les deux cas, la non-prise en compte de la physiologie de la plante est un frein à leur robustesse.

Certains modèles de prélèvement des métaux par des plantes se basent sur la fonction physiologique qu'est la transpiration. De tels modèles intègrent donc les effets des conditions climatiques, des ressources en eau et en nutriments du sol sur le prélèvement des métaux. Par exemple, une augmentation du déficit de pression de vapeur d'eau (DPV) entraînera une augmentation du taux de transpiration, en maintenant relativement constante la production de biomasse aérienne (découplage production de biomasse aérienne/transpiration), qui induira alors une augmentation du prélèvement d'ETM (Grifferty & Barrington, 2000 ; Tani & Barrington, 2005a, b ; Salah & Barrington, 2006). Ou encore, une diminution de la teneur en eau du sol entraînera une diminution de la transpiration (Ray & Sinclair, 1998; Ray *et al.*, 2002) ce qui pourra engendrer une diminution du prélèvement du métal car il y a moins d'eau pour le transporter à travers le sol et la plante.

Des paramètres comme le coefficient de réflexion σ ou le facteur de bioconcentration lié à la transpiration TSCF (« transpiration stream concentration factor », que l'on nommera par

simplicité sous son abréviation anglaise dans le reste du chapitre) sont des bons indicateurs des mécanismes d'absorption et de transport des solutés par une plante. Ils peuvent alors être des paramètres clefs d'une modélisation biophysique de l'accumulation foliaires de métaux, très largement prépondérante dans le cas des plantes hyperaccumulatrices. Le TSCF est défini comme le rapport des concentrations en soluté entre le xylème et la solution du sol, son utilisation permet, entre autre, de s'affranchir de la mesure délicate de la surface ou de la longueur racinaire, variable d'entrée nécessaire à de nombreux modèles mécanistes d'absorption racinaire de solutés. Il peut être déterminé indirectement par un bilan en eau et en ETM sur une culture (Trapp, 2000 ; Robinson *et al.*, 2003a), comme nous l'avons fait dans le premier chapitre. Cependant, nous avons vu qu'il pouvait varier au cours de la culture, ce qui pose un problème quant au choix d'une valeur unique de TSCF comme variable d'entrée d'un modèle.

Comme nous l'avons déjà évoqué, un « bon » modèle de phytoextraction doit prédire la quantité de métal accumulé mais aussi l'évolution de la teneur en métal dans le sol, à la fois dans sa phase solide et dans sa solution. Or le TSCF ne décrit que l'évolution de la concentration d'ETM de la solution du sol au xylème, *via* différents mécanismes complexes d'hyperaccumulation ou d'exclusion et en estimant que la concentration d'ETM dans la solution du sol est constante. Il ne prend pas en compte la quantité d'ETM prélevée et stockée dans les racines participant pourtant aussi à l'épuisement de l'ETM dans la phase liquide. Ainsi, l'utilisation du TSCF sous-estimera la quantité d'ETM extrait de la solution même si, dans le cas de la phytoextraction par des plantes hyperaccumulatrices, cette sous-estimation sera faible car ces dernières cultivées sur un milieu poreux accumulent plus de 90% du métal prélevé dans leurs parties aériennes (Knight *et al.*, 1997; McGrath *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2001; Wenzel *et al.*, 2003; Gonzaga *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010). Le principal point faible est que le TSCF ne prend pas en compte le réapprovisionnement en ETM de la solution par la phase solide. Ainsi, un modèle de prélèvement utilisant le TSCF devra être associé à un modèle de disponibilité du métal dans le sol, comme celui d'Ingwersen *et al.* (2006) (Figure 23).

Le modèle d'Ingwersen *et al.* (2006) a été conçu pour simuler la déplétion et le réapprovisionnement d'un métal dans la solution du sol. Il se base sur une équation d'adsorption/désorption à l'équilibre ainsi que sur une cinétique de désorption du métal des phases solides à la solution du sol. La perte du métal en solution due au drainage et/ou au prélèvement racinaire de la plante perturbe cet équilibre, ce qui induit une désorption du métal de la phase solide vers la phase liquide (Figure 23). Il a été validé pour l'hyperaccumulateur

Thlaspi caerulescens ou l'accumulateur *Brassica Juncea* cultivés dans des micro-lysimètres contenant du sol contaminé par du cadmium, à la condition que deux types de phases solides appartenant à la rhizosphère et au sol non-rhizosphérique soient prises en compte.

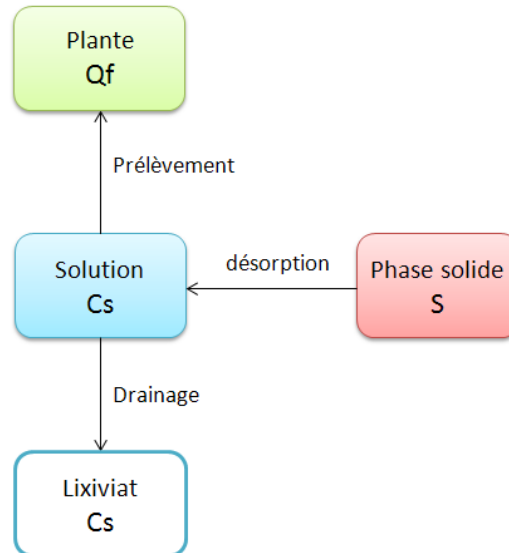


Figure 23. Schéma conceptuel du modèle d'Ingwersen *et al.* (2006) à un seul compartiment.

Il n'a aussi été validé que sur les concentrations en métal des eaux de drainage (lixiviats extraits par dépression à la base des micro-lysimètres) et non pas sur le prélèvement du métal par les plantes. Les teneurs en Cd dans les plantes n'ont été mesurées qu'à la fin des cultures et le prélèvement du Cd au temps t , $\varphi(t)$, a été estimé à partir d'une règle de trois entre la transpiration et la quantité de Cd dans la plante en fin de culture :

$$\varphi(t) = \varphi_{total} \times T(t) / T_{total} \quad [2-1]$$

équation dans laquelle, φ_{total} représente la quantité totale de Cd prélevé, T_{total} la quantité totale d'eau transpirée et $T(t)$ la quantité d'eau transpirée au temps t . Cette estimation basée sur la transpiration ne prend donc pas en compte l'évolution de la concentration du Cd en solution mais sous-entend que cette concentration reste constante au cours de la culture, ce qui n'est pas le cas.

Dans ce chapitre nous allons adapter le modèle d'Ingwersen *et al.* (2006) à un seul compartiment phase solide (dans notre cas la rhizosphère) en le couplant à l'équation biophysique d'accumulation foliaire de métal dans laquelle figure le facteur de bioconcentration $TSCF_{Ni}$.

Ceci nous permettra de prédire à la fois l'évolution de la teneur en Ni dans la phase liquide du sol et l'accumulation de Ni dans les parties aériennes de *L. emarginata*. Dans un premier temps, nous identifierons les différents paramètres du modèle. Le facteur $TSCF_{Ni}$ sera déterminé en exploitant de façon cumulée les données des cultures des hyperaccumulateurs *LI* et *L10* évoquées au cours du chapitre 1. Les autres paramètres du modèles seront déterminés à partir de : (i) des données d'isothermes d'adsorption du nickel sur un sol sableux, (ii) des données de suivi de solution de ce sol sableux témoin fertilisé et contaminé en Ni sans plantes, (iii) des données de suivi du même sol fertilisé et contaminé mais cultivé avec l'hyperaccumulateur. Enfin, nous validerons le choix de la méthode d'identification grâce à un suivi cinétique d'une culture de *L. emarginata* sur un sol sableux fertilisé et contaminé en nickel, et à une étude de sensibilité de chacun des paramètres. L'adaptation du modèle d'Ingwersen *et al.* (2006) et son développement ont pu être réalisés avec la collaboration de Didier Stemmelen (Laboratoire d'Énergétique et de Mécanique Théorique et Appliquée, CNRS/INPL/UHP).

2 Matériels et méthodes

2.1 *Leptoplax emarginata*

Leptoplax emarginata (Boiss) O.E Schulz est une plante hyperaccumulatrice de nickel grecque dont la biomasse aérienne importante pour une plante hyperaccumulatrice (Chardot *et al.*, 2005), la capacité d'accumulation élevée du Ni (Reeves, 1980) et la capacité à accumuler d'autres métaux (Peer *et al.*, 2006) en font une bonne candidate pour la phytoextraction (voir sa description dans le chapitre 1, § 2.1.1). Les graines utilisées pour cette expérimentation ont été collectées en 2006 sur des sols serpentiniques riches en Ni au pied du massif du Pinde près de Trygona.

2.2 Sol sableux

Un sol sableux issu de l'horizon supérieur (Ap) d'un podzol cultivé en maïs dans la région des Landes (site expérimental du domaine de l'Hermitage de l'INRA) a été utilisé pour les

cultures en pots (principales caractéristiques listées dans le Tableau 10). Les sables grossiers sont majoritaires dans ce sol (85% de sables grossiers > 200 μm), engendrant une porosité élevée de $0,54 \text{ cm}^3 \text{ cm}^{-3}$. Cependant, contrairement au sable quartzeux du chapitre 1, il contient quelques argiles (environ 4 %) et ces argiles sont micro-agrégés à des limons et des sables fins, ce qui expliquerait le fait que l'eau soit bien retenue, avec une teneur en eau résiduelle de $0,34 \text{ cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$ lorsque le potentiel matriciel de pression est égal à -2 kPa. On note la présence d'environ 3,5 % de matières organiques. La couleur noire de ce sol et son rapport C/N élevé indiquent que les matières organiques sont très humifiées. Notons que le carbone dans ce sol n'est qu'organique du fait de l'absence de carbonates. Le pH faiblement acide pour un podzol est dû à des chaulages répétés (le calcium est le cation prédominant de la CEC). Ce sol contient une faible quantité de nickel, $0,114 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de Ni extractible au DTPA (environ 10 % du Ni total), ce qui est négligeable en comparaison des ajouts de Ni que nous avons effectués pour l'expérience (cf. § 2.3.1).

Tableau 10. Principales caractéristiques du sol sableux utilisé (Fe_{CBD} = extraction au dithionite dans un tampon citrate-bicarbonate, Mehra & Jackson, 1960).

Sol sableux			
Distribution granulométrique	Argiles	38	g kg^{-1}
	Limons	25	
	Sables	937	
Porosité totale		0,54	$\text{cm}^3 \text{ cm}^{-3}$
Teneur en eau résiduelle à 0 kPa		0,51	$\text{cm}^3 \text{ cm}^{-3}$
Teneur en eau résiduelle à -2 kPa		0,34	$\text{cm}^3 \text{ cm}^{-3}$
Fe_{CBD}		0,74	g kg^{-1}
CaCO_3		0,0	g kg^{-1}
pH à l'eau		5,91	
Matières organiques		34,6	g kg^{-1}
Carbone organique		20	g kg^{-1}
C/N		23,1	
Cations échangeables	Ca^{2+}	3,21	cmol+ kg^{-1}
	Mg^{2+}	0,576	
	K^+	0,149	
	Na^+	0,0387	
Ni total		1,18	mg kg^{-1}
Ni (DTPA)		0,114	

L'observation du sol à la loupe binoculaire montre des grains avec des revêtements et des petits agrégats très foncés (Figure 24). L'analyse en spectrométrie de photoélectrons induits par rayon X (XPS) des surfaces des matériaux du sol montre que les grains sont du quartz (forte teneur en Si) et que les revêtements sombres sont de la matière organique (30 % de C organique sur ces surfaces soit près de 15 fois plus que dans la masse de sol, ce qui est considérable) (Tableau 11).

Tableau 11. Analyses en spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X (XPS) des grains de quartz

Analyses XPS (% massique)	
Si	20,72
Al	2,78
Fe	0
Ca	0
C organique	29,77
N	2,17
Facteur enrichissement du C orga.	15

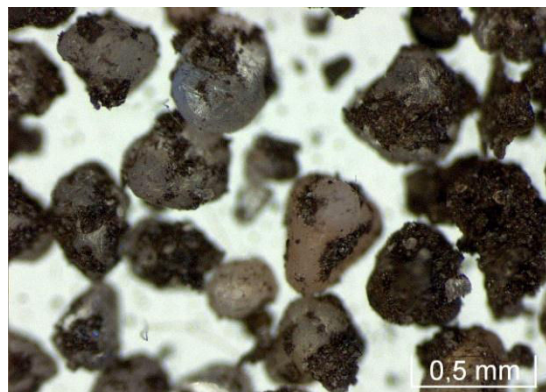


Figure 24. Photographie du sol sableux observé à la loupe binoculaire. On observe des grains de quartz et des revêtements de matières organiques.

2.3 Culture en pots de *L. emarginata*

2.3.1 Préparation des pots et repiquage

Des pots de 1,5 L ont été tapissés à l'intérieur de sacs plastiques (polyéthylène) pour éviter le drainage. Dans ces pots plastifiés, 1 L de sol sableux (soit 1,37 kg) a été mélangé à 200 ml

de solution fertilisante/contaminante et ce afin d'avoir une humidité volumétrique de $0,2 \text{ cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$. La composition de la solution fertilisante/contaminante était la suivante (en mg l^{-1} avec entre parenthèses le sel utilisé) : 58 N (NH_4NO_3); 40 P (KH_2PO_4) ; 50,5 K (KH_2PO_4) ; 40 Ca ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$); 20 Mg (MgSO_4); 4 Fe (FeSO_4) ; 0,5 Mn (MnSO_4) ; 0,3 Zn (ZnSO_4) ; 0,1 B (H_3BO_3); 0,01 Cu (CuSO_4); 0,01 Mo (Na_2MoO_4) et **100 Ni** (NiSO_4). Lorsque le mélange sol/solution était bien homogénéisé, les pots étaient recouverts d'un plastique blanc pour limiter l'évaporation du sol au cours de la culture. Seul un trou d'un diamètre de 1 cm au centre du plastique blanc permettait la croissance de la plante. Afin de maintenir le plastique blanc en surface du sol, un cerceau de PVC est positionné au-dessus et fixé à l'aide d'un adhésif au pot. Après sept jours de stabilisation du mélange sol/eau, une partie des pots a été plantée (*L100*) et une autre non, servant de témoins pour le suivi de l'évolution de la solution du sol (*T100*). Des pots témoins-évaporation contenant uniquement 1 L de sol et 200 ml d'eau déminéralisée ont été aussi préparés pour quantifier la quantité d'eau évaporée par le trou de 1 cm dans le plastique blanc.

Après avoir retiré les siliques, les graines de *L. emarginata* ont été mises à germer à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ sur une plaque de germination contenant du sable quartzueux humidifié par de l'eau déminéralisée (sable du chapitre 1). Après apparition des cotylédons, les plantules ont été repiquées dans des petits pots remplis du sable quartzueux (200 ml) fertilisé (même fertilisation que pour la culture) pour une préculture de deux semaines dans les conditions climatiques de l'expérimentation. A la fin de la préculture, les plantules ayant la biomasse aérienne la plus homogène ont été sélectionnées puis repiquées dans les pots.

2.3.2 Conditions de culture

Les pots ont été distribués en quatre blocs dans une chambre de culture (phytotron) avec une répétition par bloc de chaque prélèvement hebdomadaire d'hyperaccumulateur *L100*, une répétition pour deux blocs de chaque pot témoin et deux pots permanents de contrôle d'évaporation par bloc. Les conditions climatiques de la chambre de culture étaient de $20 \text{ }^\circ\text{C}$ le jour et $18 \text{ }^\circ\text{C}$ la nuit avec une photopériode de 16 h, sous une intensité lumineuse de $325 \text{ } \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ et une hygrométrie de 50 %. Ces conditions correspondent à un déficit de pression de vapeur d'eau (DPV) de 1,17 kPa le jour. Les cultures ont été suivies pendant cinq semaines.

2.3.3 Suivi de la culture

L'évapotranspiration (ETP) était déterminée quotidiennement par pesées au début de la période nocturne. Après chaque pesée, chaque pot était irrigué avec de l'eau déminéralisée de façon à revenir au poids initial du pot et de conserver une humidité du sol relativement stable, sauf au 8^{ème} jour de culture où les plantes ont été arrosées avec de la solution fertilisante sans Ni. Pour un bloc donné, la quantité d'eau perdue par évaporation (Ev) était déterminée en moyennant la quantité d'eau perdue des deux pots témoins-évaporation. Ainsi, la quantité d'eau transpirée quotidiennement (T) était déduite en soustrayant Ev et le poids de biomasse fraîche produite le même jour, déterminé grâce à la modélisation des courbes moyennes de production de biomasse fraîche.

2.3.4 Prélèvements et analyses

La culture dans le sol fertilisé contaminé a été suivie pendant 35 jours. Des prélèvements hebdomadaires de plantes ont été réalisés (suivi cinétique) en faisant l'hypothèse que les plantes appartenaient à la même population. Pour vérifier l'homogénéité de la population, nous avons réalisé une analyse de la variance (ANOVA) sur les volumes d'eau transpirés au cours du 7^{ème} jour de culture. Cette hypothèse a été validée pour les plantes récoltées aux 7^{ème}, 21^{ème} et 35^{ème} jours de culture. Les données pour les plantes prélevées au 14^{ème} jour n'ont donc pas été exploitées. Les prélèvements hebdomadaires ont eu lieu au début de la période nocturne après irrigation.

Pour chaque plante, les surfaces foliaires (SF) ont été déterminées par analyse d'image (Logiciel WinFOLIA[®]) puis l'humidité foliaire, le poids de la tige et de la biomasse foliaire (BF) ont été estimées après un séchage de 48 h dans une étuve à 70 °C. Lorsque les feuilles étaient sèches elles ont été pesées et broyées finement dans un mortier en agate. Des portions de 0,5 g de poudre ont été minéralisées par HNO₃ et H₂O₂ (8:2, v/v) en réacteur clos au four à micro-ondes (Mars 5, CEM Corporation Inc, Matthews, NC, USA). Les teneurs en Ni dans les minéralisats ont été déterminées par spectrométrie d'émission, ICP-AES (Liberty RL, Carian, Inc, Palo Alto, CA, USA).

La solution du sol a été extraite par centrifugation (à potentiel matriciel de pression équivalent de -30 kPa) à partir de 12 ml de sol humide. Une partie de cette solution a été filtrée et acidifiée pour analyse du Ni en ICP-AES, l'autre partie a été juste filtrée pour mesure du pH et

analyse des ions majeurs (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , NH_4^+ , PO_4^{3-} , NO_3^- , SO_4^{2-}) en chromatographie ionique (IC25 Ion Chromatograph, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA).

2.3.5 Traitements statistiques

Les analyses statistiques et les régressions ont été réalisées à l'aide du logiciel XLSTAT 2010. L'effet des traitements et du type de plante sur les paramètres étudiés ont été testés en réalisant des analyses de la variance à un facteur suivi du test *post hoc* de Bonferroni avec un risque d'erreur α de 0,5 et un niveau de probabilité $p < 0,05$.

2.4 Isothermes d'adsorption

Des isothermes d'adsorption du nickel ont été réalisées sur le sol sableux à trois pH différents. L'électrolyte utilisé était du $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 10^{-2} mol l^{-1} (Filius *et al.*, 1998) dans lequel du Ni a été ajouté sous forme de sulfate de nickel pour obtenir les concentrations suivantes de Ni en solution (en mg l^{-1}) : 0 – 0,1 – 0,5 – 1 – 5 – 10 – 50 – 100 – 200. Bien que non « indifférent » par rapport aux sites de surface, cet électrolyte a été choisi à la fois car il a été très utilisé pour la détermination d'isothermes d'ETM sur des sols et car les sites d'échanges du sol étudié étaient relativement saturés en calcium. Une série de solutions de 100 ml d'électrolyte contaminés en Ni a été acidifiée par l'ajout de 200 μl d'acide nitrique, une autre a été alcalinisée par ajout de 250 μl de soude et enfin une troisième n'a subi aucune modification de pH. Ces solutions d'électrolyte ont été agitées pendant 24 h à 20°C à la vitesse de 15 tr min^{-1} pour permettre l'équilibre du pH. Après agitation, 20 g de sol sec ont été ajoutés puis les suspensions ont été agitées dans les mêmes conditions que précédemment. Le pH de la suspension a été alors mesuré et la suspension filtrée à 0,45 μm . La concentration en Ni du filtrat a été mesurée par ICP-AES.

2.5 Modélisation

2.5.1 Description du modèle

Le modèle d'Ingwersen *et al.* (2006) part du principe que le métal dans le sol est présent à la fois dans la solution à la concentration C_s et sur la phase solide à la concentration S , et, qu'à

l'équilibre, la partition du métal entre ces deux phases liquide et solide peut être décrite par une isotherme d'adsorption. Cette isotherme d'adsorption peut être modélisée par une fonction de Freundlich généralisée (exemple Elzinga *et al.*, 1999) :

$$S = k^* [H^+]^a C_s^m \quad [2-2]$$

dans laquelle k^* est le coefficient de partition solide/liquide du nickel, m l'exposant de la loi puissance, $[H^+]$ la concentration en protons dans la solution et a le coefficient empirique de l'équation généralisée de Freundlich. Les auteurs préconisent l'utilisation d'une fonction de Freundlich généralisée à cause des changements de pH au cours de la culture. Dans notre cas, nous travaillerons avec une équation de Freundlich « simple » afin de faciliter la modélisation. Pour ce faire, nous travaillerons à pH de la solution du sol constant. La vitesse de désorption est proportionnelle à la différence de concentration entre les deux phases du sol, et est caractérisée par un coefficient de désorption α .

Tableau 12. Paramètres utilisés dans le modèle d'Ingwersen *et al.* (2006)

Paramètre	Définition	Dimension	Unités utilisés
C_s	concentration en nickel dans la solution du sol	$M.L^{-3}$	$mg\ l^{-1}$
k	coefficient de partition solide/liquide du nickel	$L^3.M^{-1}$	$l\ kg^{-1}$
m	exposant de la loi puissance d'adsorption	sans dimension	
q_w	flux d'eau drainée	$L^3.T^{-1}$	$l\ j^{-1}$
S	concentration en nickel sur la phase solide	$M.M^{-1}$	$mg\ kg^{-1}$
T	flux de transpiration quotidien	$L^3.T^{-1}$	$l\ j^{-1}$
$TSCF_{Ni}$	Facteur de bioconcentration du Ni	sans dimension	
α	coefficient de désorption du Ni	T^{-1}	j^{-1}
$\phi(t)$	prélèvement du nickel par la plante	$M.T^{-1}$	$mg\ j^{-1}$
θ	volume d'eau dans le sol	L^3	l
ρ	Poids de sol sec	M	kg

Ainsi, le système d'équations différentielles du modèle, utilisant les équations de Freundlich « simples », est le suivant (paramètres décrits dans le Tableau 12) :

$$\theta \frac{dC_s}{dt} = \rho\alpha[S - k C_s^m] - q_w C_s - \phi(t) \quad [2-3]$$

$$\theta \frac{dS}{dt} = -\rho\alpha[S - k C_s^m] \quad [2-4]$$

où l'équation [2-3] décrit le stock de nickel dissous dans la phase liquide. Ce stock s'épuise via les pertes par drainage et le prélèvement racinaire de la plante. De façon complémentaire,

l'équation [2-4] décrit le stock de nickel sorbé sur la phase solide qui peut réapprovisionner la solution. Enfin, le prélèvement de nickel par la plante $\varphi(t)$ sera décrit de façon originale par rapport au formalisme d'Ingwersen *et al.* (2006), à l'aide de l'équation suivante qui fait intervenir le facteur de bioconcentration, $TSCF_{Ni}$, la transpiration, $T(t)$, et la concentration de nickel dans la solution du sol, C_s :

$$\varphi(t) = TSCF_{Ni} \cdot T(t) \cdot C_s \quad [2-5]$$

2.5.2 Optimisation des paramètres du modèle

A partir des données expérimentales de la culture et des pots témoins sans plante ainsi que des isothermes d'adsorption, nous avons identifié et optimisé les différents paramètres du modèle. Ainsi, nous avons réalisé plusieurs protocoles afin d'identifier ces paramètres (paramètres de l'équation de Freundlich généralisée et coefficient de désorption α). Le facteur de bioconcentration $TSCF_{Ni}$ est déterminé à partir des données issues du chapitre 1. L'optimisation des paramètres du modèle a été réalisée à partir de la version 7.8 du logiciel MATLAB® (The MathWorks, Inc. Natick, MA, USA). Les valeurs des paramètres ont été identifiées par moindres carrés non linéaires en utilisant l'algorithme de Gauss-Newton.

3 Résultats expérimentaux

3.1 Résultats de la culture de *L. emarginata*

3.1.1 Solutions du sol

Au cours de la culture de *L. emarginata* dans le sol sableux (*L100*), la concentration en nickel dans la solution du sol (C_s) restait relativement constante, avec une valeur moyenne pour toute la durée de la culture de $595 \pm 24 \mu\text{g Ni l}^{-1}$ (Figure 25a). Le pH était également relativement constant au cours de la culture, avec une valeur moyenne de $6,44 \pm 0,02$ (Figure 25b). Les concentrations en Ni et les pH des solutions des pots témoins sans plantes (*T100*) étaient identiques à ceux des pots plantés *L100*. Par ailleurs, pour *L100* et *T100*, on note une forte rétention du Ni sur les phases solides car C_s était très nettement inférieur à la concentration en Ni de la solution contaminante initiale qui était de 100 mg Ni l^{-1} .

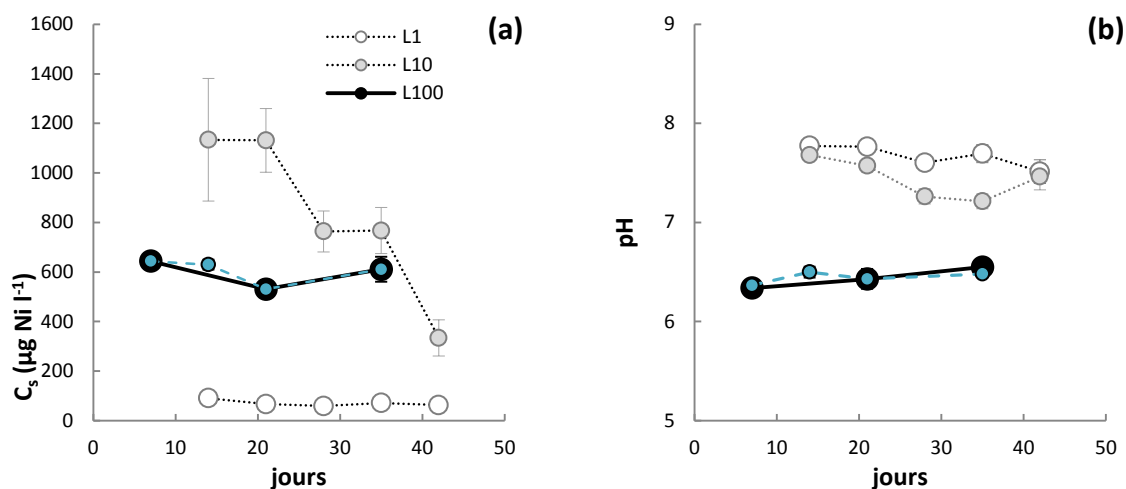


Figure 25. Evolutions des valeurs moyennes des concentrations en Ni (a) et de pH (b) des solutions du sol sableux fertilisé et contaminé en Ni au cours des cinétiques de phytoaccumulation du nickel par l'hyperaccumulateur *L100*, comparativement aux témoins sans plantes *T100*. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard de la moyenne ($n = 4$). A titre de comparaison, les données des hyperaccumulateurs *L1* et *L10* dans des sables fertilisés et contaminés en Ni (chapitre 1) ont été intégrées aux figures.

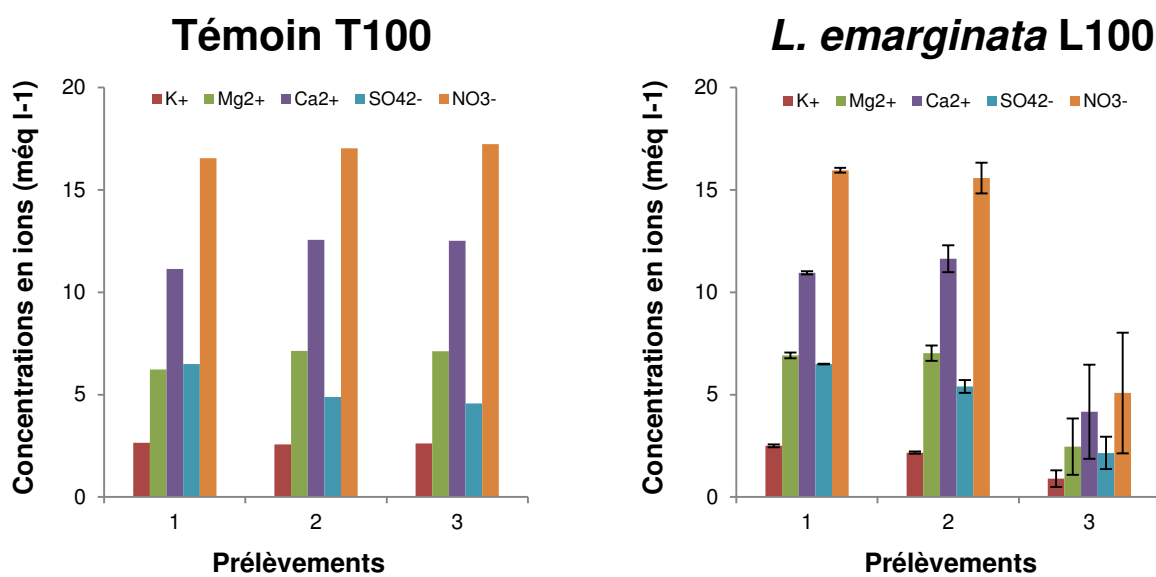


Figure 26. Concentrations moyennes des cations et anions majeurs dans la solution du sol sableux fertilisé et contaminé en Ni pour chacun des trois prélèvements de *L100* et *T100*, effectués au cours des 7^{ème}, 21^{ème} et 35^{ème} jours de culture. Les barres d'erreur pour *L100* représentent l'erreur standard de la moyenne ($n = 4$).

Les concentrations en ions majeurs sont représentées dans la Figure 26. Notons que les teneurs en NH_4^+ et PO_4^{2-} n'ont pu être quantifiées. Dans les pots témoins sans plantes *T100* on voit que les teneurs en ions dans la solution du sol restaient relativement constantes au cours de la culture. Pour la culture de l'hyperaccumulateur *L100*, on observe une forte diminution des concentrations pour tous les ions entre les deux derniers prélèvements (15 derniers jours de culture). Cependant, en début de culture, les teneurs en ions étaient similaires pour *L100* et *T100*. L'ajout de solution fertilisante au 8^{ème} jour (le lendemain du premier prélèvement) pour les pots plantés *L100* n'a pas eu d'effet visible sur les teneurs en ions.

3.1.2 Biomasses foliaires de *L. emarginata*

La croissance de *L. emarginata* cultivée dans le sol sableux fertilisé et contaminé en Ni était plus rapide que pour celles des hyperaccumulateurs *L1* et *L10* cultivés dans des sables fertilisés et contaminés. On note que la biomasse foliaire de *L100*, plus petite en début de culture, a égalé ou dépassé la biomasse de *L1* ou *L10*, respectivement, du fait d'une forte croissance entre le 21^{ème} et le 35^{ème} jour (Figure 27a) avec, au 35^{ème} jour de culture, une biomasse foliaire sèche moyenne de $0,51 \pm 0,17$ g. Ce constat est encore plus prononcé pour l'évolution de la surface foliaire (Figure 27b) avec, au 35^{ème} jour de culture, une surface foliaire moyenne de 123 ± 43 cm². La surface foliaire spécifique moyenne de l'hyperaccumulateur *L100* était relativement constante au cours de la culture avec une valeur moyenne sur la culture de 232 ± 17 cm² g⁻¹, ce qui est significativement supérieur aux SFS moyennes de *L. emarginata* cultivée dans des sables fertilisés et contaminés, comprises entre 90 et 130 cm² g⁻¹ (Figure 27c). L'humidité foliaire moyenne a augmenté de 507 ± 76 % en début de culture, à 616 ± 82 % en fin de culture, mais cette augmentation n'est pas statistiquement significative du fait de l'hétérogénéité entre répétitions (Figure 27d). On note une différence significative entre l'humidité foliaire moyenne de l'hyperaccumulateur *L100* (561 ± 45 %) et celles des hyperaccumulateurs *L1* (395 ± 11 %) et *L10* (412 ± 24 %).

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre 1 (§ 4.1), la surface foliaire spécifique et la teneur en eau dans les feuilles seraient de bons marqueurs des ressources en nutriments dans le milieu de culture (Poorter & Remkes, 1990; Wilson *et al.*, 1999). Les teneurs en eau et les SFS élevées des plantes *L100* sont caractéristiques de plantes cultivées sur des milieux riches en nutriments contrairement aux plantes cultivées dans le sable *L1* et *L10*. Pour le dernier pré-

lèvement de l'hyperaccumulateur *L100*, nous avons constaté une forte variabilité au niveau des biomasses foliaires. Cette variabilité s'explique par la présence d'une plante très petite lors de ce dernier prélèvement (Figure 28) malgré un lot initialement homogène au 7^{ème} jour de croissance.

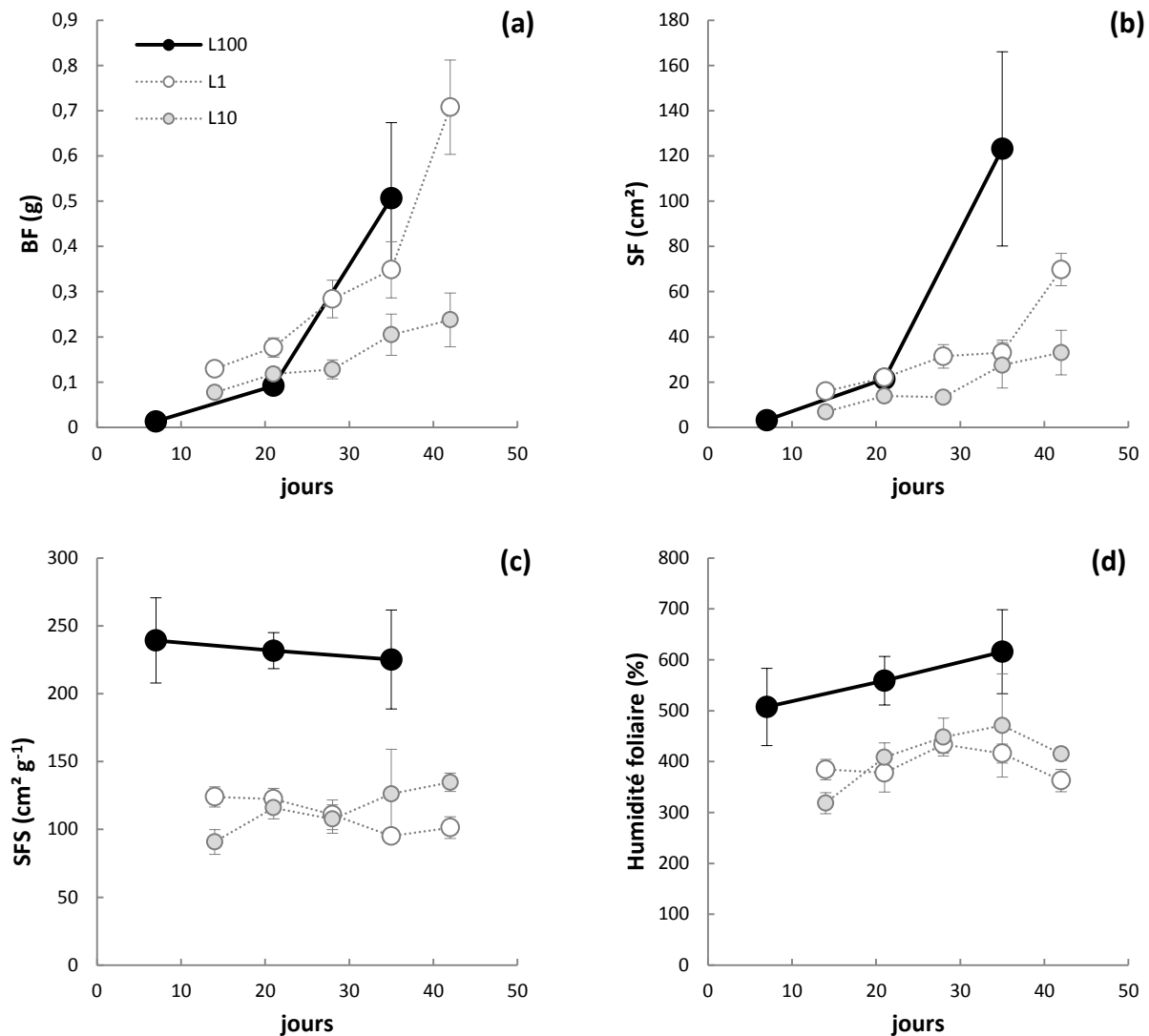


Figure 27. Evolutions des valeurs moyennes des biomasses foliaires sèches, BF (a), des surfaces foliaires, SF (b), des surfaces foliaires spécifiques, SFS (c) et des humidités foliaires (d) au cours des cinétiques de croissance de l'hyperaccumulateur *L100* cultivé dans le sol fertilisé et contaminé en Ni. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard de la moyenne (n = 4). A titre de comparaison, les données des hyperaccumulateurs *L1* et *L10* cultivés dans des sables fertilisés et contaminés en Ni (chapitre 1) ont été intégrées aux figures.



Figure 28. Photographies des quatre plantes du dernier prélèvement de l'hyperaccumulateur *L100* (35^{ème} jour de culture). On note que la biomasse d'une des quatre répétitions était beaucoup plus petite que celles des trois autres.

3.1.3 Transpiration

En utilisant toutes les données journalières, l'évolution moyenne du flux de transpiration quotidien par plante, $T(t)$, suit une loi exponentielle (Figure 29), qui est corrélée à celle de l'évolution de la biomasse foliaire. On observe bien l'hétérogénéité croissante au cours de la culture, en particulier entre les quatre répétitions du dernier prélèvement (15 derniers jours de culture). On distingue aussi parfaitement la petite plante du dernier prélèvement avec un très faible flux de transpiration. Nous avons modélisé l'évolution du flux de transpiration quotidien (avec $T(t)$ en ml jour^{-1} et t en jour) avec la fonction exponentielle suivante :

$$T(t) = (0,503 \pm 0,011) e^{(0,12 \pm 0,001)t} \quad [2-6]$$

L'évolution du volume cumulé d'eau transpirée est corrélée à l'évolution de la biomasse foliaire (non montrées). Alors que les surfaces foliaires spécifiques de *L. emarginata* cultivée dans le sol fertilisé et contaminé étaient deux fois supérieures à celles des hyperaccumulateurs *L1* et *L10* cultivés dans des sables fertilisés et contaminés (chapitre 1), les taux de transpiration par unité de surface foliaire étaient identiques pour les trois traitements avec, en fin de culture, une diminution de ce taux de transpiration (Figure 30a). L'efficacité d'utilisation de l'eau pour la production de biomasse foliaire, EUE, (Figure 30b) était aussi la même quel que soit le traitement. Ainsi, les hyperaccumulateurs *L100* possédaient des feuilles plus fines que celles des hyperaccumulateurs *L1* et *L10* cultivés dans le sable mais avaient cependant la même capacité de transpiration.

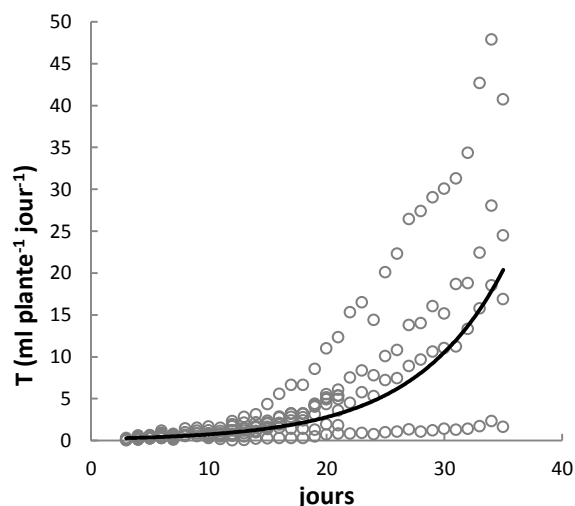


Figure 29. Evolution du volume d'eau transpirée quotidiennement, T , pour chaque plant de l'hyperaccumulateur *L100* et loi exponentielle moyenne modélisant l'ensemble de ces cinétiques de transpiration (beaucoup plus de données en début de culture).

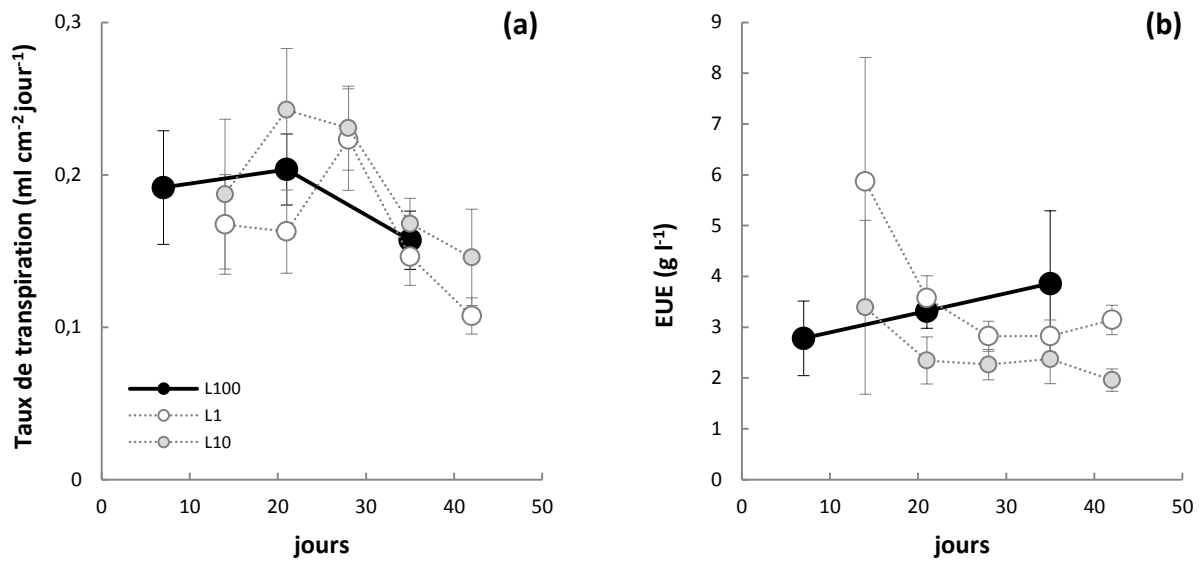


Figure 30. Evolutions des valeurs moyennes des taux de transpiration (a) et des efficacités d'utilisation de l'eau pour la production de biomasse foliaire (b) au cours des cinétiques de croissance de l'hyperaccumulateur *L100* cultivé dans le sol fertilisé et contaminé en Ni. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard de la moyenne ($n = 4$). A titre de comparaison, les données des hyperaccumulateurs *L1* et *L10* cultivés dans des sables fertilisés et contaminés en Ni (chapitre 1) ont été intégrées aux figures.

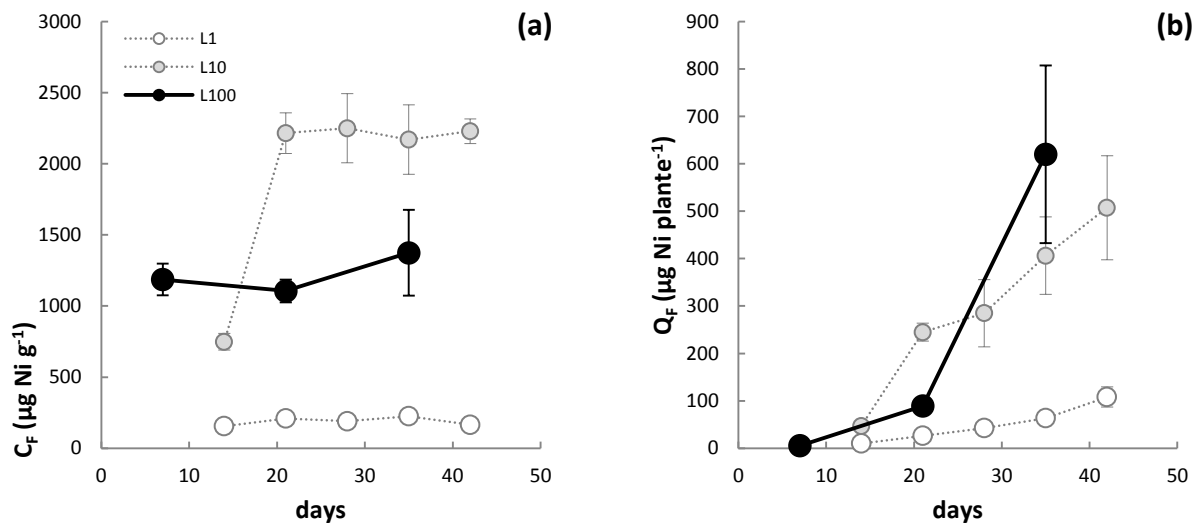


Figure 31. Evolutions des valeurs moyennes des concentrations foliaires en Ni (a) et des quantités foliaires de Ni (b) au cours des cinétiques de croissance de l'hyperaccumulateur *L100* cultivé dans le sol fertilisé et contaminé en Ni. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard de la moyenne ($n = 4$). A titre de comparaison, les données des hyperaccumulateurs *L1* et *L10* cultivés dans des sables fertilisés et contaminés en Ni (chapitre 1) ont été intégrées aux figures.

3.1.4 Concentrations foliaires en nickel

La concentration foliaire en Ni, C_F , était relativement constante au cours de la culture avec une teneur moyenne de $1222 \pm 122 \mu\text{g Ni l}^{-1}$ (Figure 31a), ce qui est supérieur au seuil d'hyperaccumulation du Ni ($1000 \mu\text{g Ni l}^{-1}$) défini par (Brooks *et al.*, 1977). Tout comme pour la concentration en solution, C_s , on constate que la concentration foliaire en Ni de l'hyperaccumulateur L100 est comprise entre celles des hyperaccumulateurs L1 et L10 (Chapitre 1). Enfin, on note une forte accumulation de Ni au cours des quinze derniers jours (Figure 31), ce qui serait attribuable à la forte croissance foliaire et à l'important volume d'eau transpirée observés durant cette période (cf. Figure 27a et Figure 29).

3.2 Facteur de bioconcentration TSCF_{Ni}

Ayant pour objectif la modélisation de l'accumulation foliaire du nickel par *Leptoplax emarginata*, nous avons déterminé une valeur unique du facteur de bioconcentration lié à la transpiration, TSCF_{Ni} , pour cet hyperaccumulateur, pour notre gamme de concentration en Ni dans la solution et pour différents stades de croissance de la plante, en ré-exploitant les données des cultures de *L. emarginata* dans le sable fertilisé et contaminé (plantes L1 et L10 issues du chapitre 1). Pour ce faire, nous avons utilisé les quantités hebdomadaires de Ni accumulées dans les feuilles (dQF), les volumes hebdomadaires d'eau transpirée (dVT) et les concentrations moyennes en Ni dans les solutions entre deux prélèvements ($C_{s \text{ moy}}$) (Figure 32a). Pour simplifier la détermination de ce facteur unique, nous avons choisi de faire passer une droite de régression forcée à l'origine dans les deux jeux de données des plantes L1 et L10. On a ainsi déterminé une unique valeur du TSCF_{Ni} de $5,6 \pm 0,2$ ($p < 0,0001$). Cette valeur est plus faible que les TSCF_{Ni} moyens déterminés dans le chapitre 1 ($7,2 \pm 1,8$ et $5,8 \pm 0,7$ pour L1 et L10, respectivement).

Nous avons intégré les données de L100 aux données des plantes dans le sable (Figure 32b). On trouve alors une valeur plus faible, mais relativement proche, du TSCF_{Ni} de $4,99 \pm 0,10$ ($p < 0,0001$). Notons que le TSCF_{Ni} déterminé uniquement à l'aide des données des plantes L100 est égal à $4,63 \pm 0,05$ ($p < 0,0001$) (données non montrées).

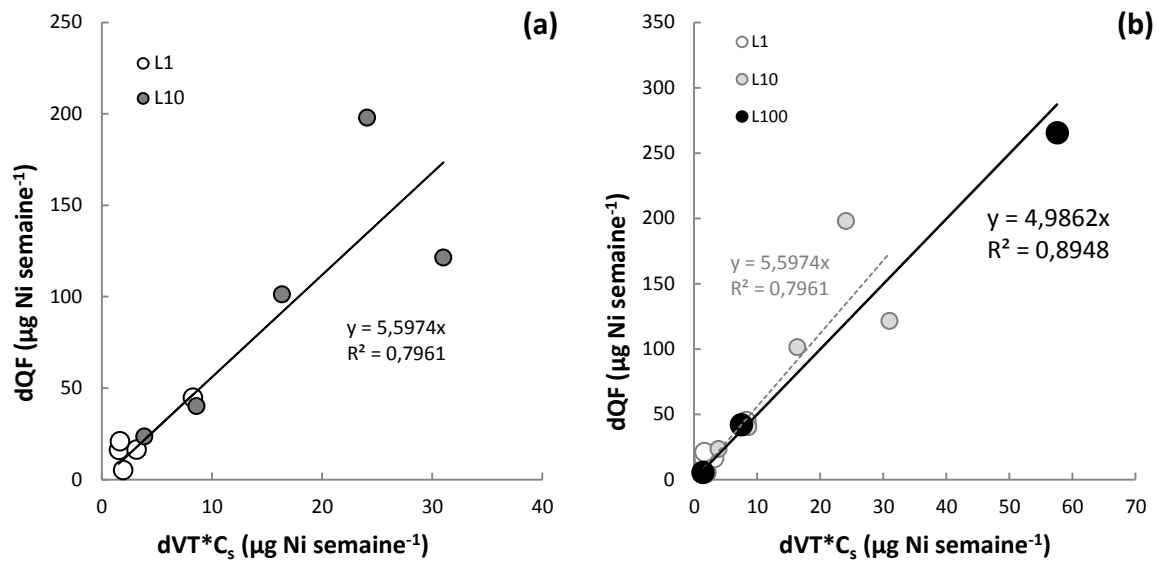


Figure 32. Quantités moyennes de nickel accumulées dans les feuilles des plantes au cours d'une période de culture, dQF, en fonction du produit du volume cumulé moyen d'eau transpirée pendant cette même période, dVT, avec la concentration moyenne en Ni dans la solution, C_s moy, de cette même période pour les hyperaccumulateurs L1 et L10 cultivés sur des sables fertilisés et contaminés en Ni (a) et pour L1, L10 mais aussi pour l'hyperaccumulateur L100 cultivé dans le sol sableux (b). La pente des droites de régression correspond au facteur de bioconcentration $TSCF_{Ni}$.

4 Modélisation

Toute modélisation, après sa conceptualisation, nécessite d'être calibrée, par optimisations (§ 4.1), puis validée (§ 4.2) et testée à l'aide d'une analyse de sensibilité du modèle (§ 4.3). Notons que les résultats des optimisations sont répertoriés dans le Tableau 13).

Tableau 13. Paramètres d'adsorption/désorption de nickel, du modèle optimisés à partir des différents protocoles d'identification. Les valeurs avec [†] ont été fixées.

	Protocoles	k (l kg ⁻¹)	m	α (jour ⁻¹)	TSCF _{Ni}
Isothermes adsorption (Freundlich)	(a) pH 3,69	5,1	0,79	-	-
	(a) pH 5,07	32,1	0,54	-	-
	(a) pH 6,29	250,5	0,38	-	-
Données sol sans plante T100	(b)	250,5 [†]	0,38 [†]	0,05	-
	(c)	16,8	0,28	0,058	-
Données culture L100	(d)	17,2	0,38	0,037	5,6 [†]
	(e)	16,8 [†]	0,28 [†]	0,058	5,6 [†]

4.1 Optimisations successives des paramètres du modèle

Nous avons optimisé les paramètres du modèle d'adsorption/désorption du nickel sur le sol (k , m , α) d'Ingwersen *et al.* (2006) de façon successive à partir (i) des isothermes d'adsorption du nickel sur le sol sableux, (ii) des concentrations en Ni dans les solutions des pots sans plantes *T100* et (iii) des concentrations en Ni dans les solutions rhizosphériques des pots plantés *L100*.

4.1.1 Isothermes d'adsorption du nickel

Les isothermes d'adsorption montrent un effet du pH sur l'adsorption du nickel sur le sol sableux : plus le pH est acide est plus il y a de métal en solution (Figure 33). Nous avons modélisé ces isothermes d'adsorption par des fonctions puissance d'adsorption de Freundlich ($S=k.C_s^m$) (Tableau 13, protocole (a)). On observe une augmentation du coefficient de partition solide/liquide du nickel, k , avec le pH et au contraire une diminution du coefficient de la loi puissance, m . L'utilisation des isothermes ne permet pas d'identifier le coefficient de désorption α . Nous l'avons donc déterminé à partir des pots sans plantes *T100* (cf. § 4.1.2).

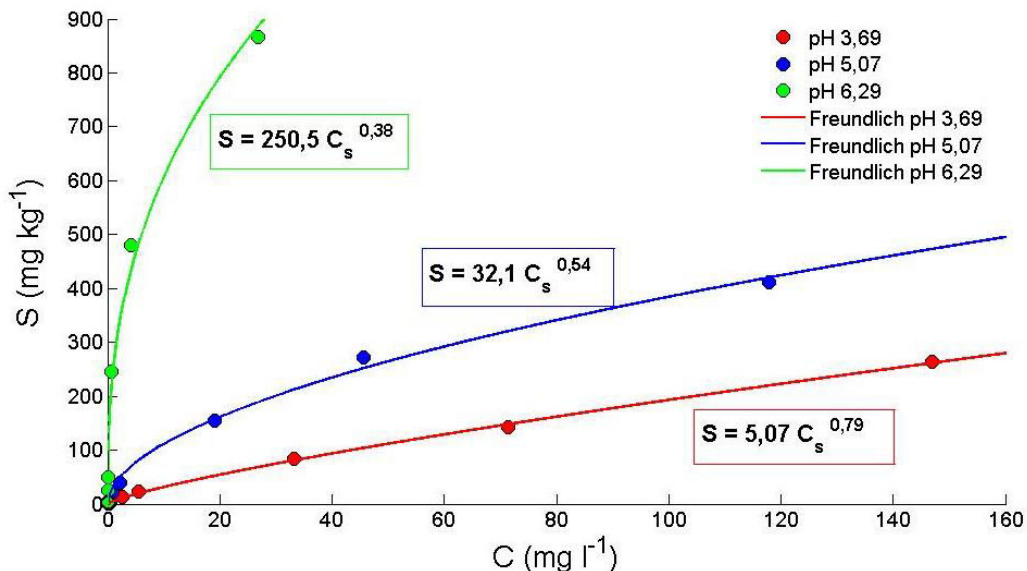


Figure 33. Optimisation des paramètres k et m de la loi puissance d'adsorption de Freundlich, à partir des isothermes d'adsorption du Ni sur le sol sableux réalisées avec des solutions de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 10^{-2} mol l⁻¹ (protocole (a) du Tableau 13).

4.1.2 Optimisation des paramètres du modèle à l'aide des données des solutions du sol sans plantes

Comme les isothermes d'adsorption ne permettent pas de déterminer le coefficient de désorption du nickel, α , nous l'avons, dans un premier temps, déterminé par optimisation à partir des concentrations en Ni dans la solution du sol, C_s , des pots témoins sans plantes *T100*, où nous avons fixé k à $250,5 \text{ l kg}^{-1}$ et m à $0,38$ (valeurs issues des isothermes d'adsorption, protocole (b) du Tableau 13). On note que l'optimisation est mauvaise et que C_s modélisée est sous-estimée, en particulier au cours des premiers jours de culture (Figure 34).

Nous avons donc, dans un second temps, cherché à optimiser les trois paramètres d'adsorption/désorption du Ni, k , m et α de façon combinée à partir des concentrations en Ni dans la solution du sol pour les pots témoins sans plantes *T100* (Tableau 13, protocole (c)). L'optimisation permet de bien modéliser l'évolution de la concentration en Ni dans la solution du sol par rapport aux points expérimentaux (Figure 35). On note que la valeur du coefficient de partition solide/liquide du nickel, k , est très éloigné de celle déterminée par l'isotherme d'adsorption du Ni à pH 6,29, c'est-à-dire au pH le plus proche du pH de la solution du sol sans plante ($k = 250,5 \text{ l kg}^{-1}$ pour l'isotherme au pH 6,29 et $k = 16,8 \text{ l kg}^{-1}$ pour le sol sans plante au pH moyen d'environ 6,4). Le coefficient de loi puissance, m , est également différent de celui déterminé par l'isotherme d'adsorption du nickel à pH 6,29 (Tableau 13).

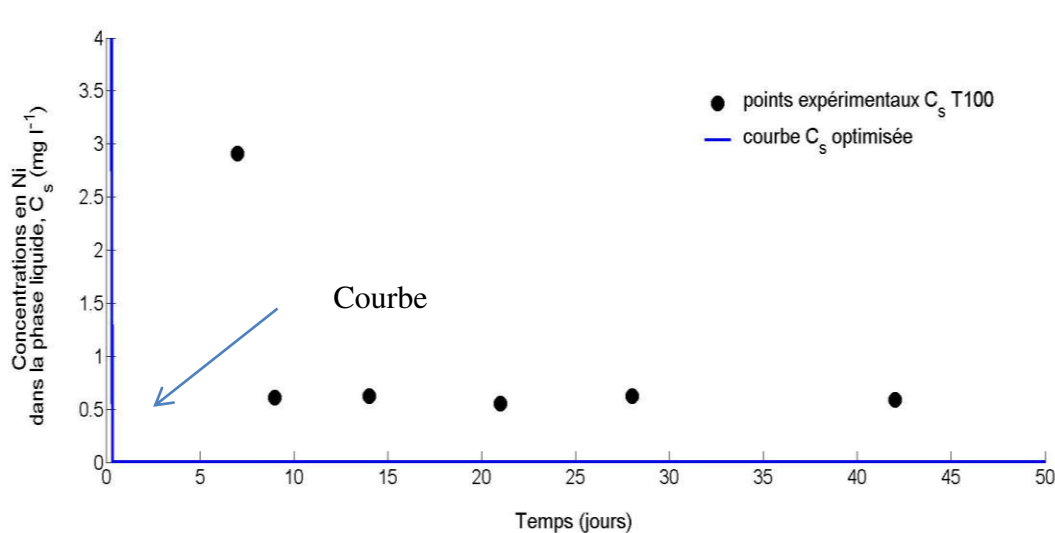


Figure 34. Optimisation du paramètre de désorption du Ni α à partir des données expérimentales de la concentration en Ni dans la solution du sol, C_s , des pots sans plantes *T100* et en fixant k à $250,5 \text{ l kg}^{-1}$ et m à $0,38$ (protocole (b) du Tableau 13). Le jour 0 correspond au jour de préparation des pots, ainsi, le 7^{ème} jour correspond au 1^{er} jour de culture pour *L100*.

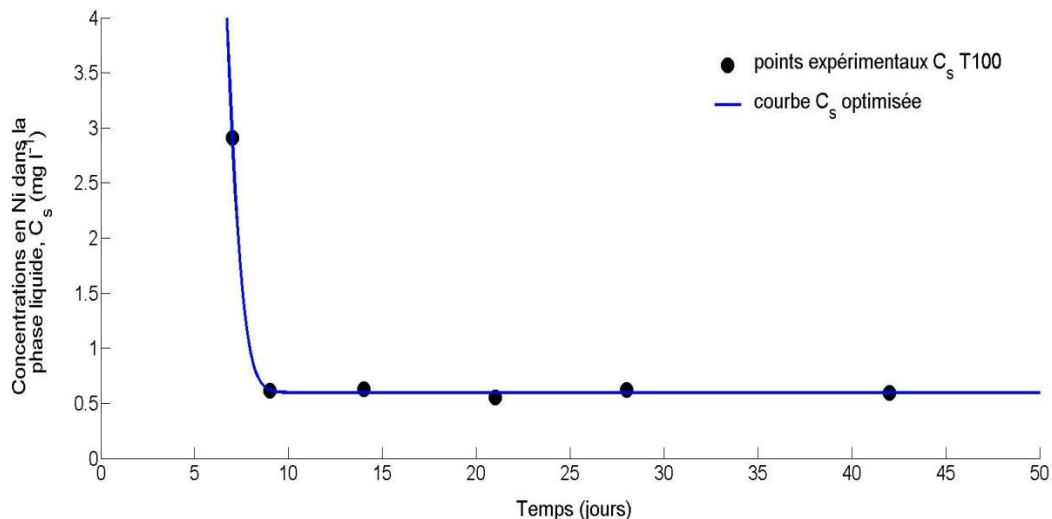


Figure 35. Optimisation combinée des paramètres k , m et α à partir des données expérimentales de la concentration en Ni dans la solution du sol, C_s , des pots sans plantes *T100* (protocole (c) du Tableau 13). Le jour 0 correspond au jour de préparation des pots, ainsi, le 7^{ème} jour correspond au 1^{er} jour de culture pour *L100*.

4.1.3 Optimisation des paramètres du modèle à l'aide des données des solutions du sol cultivé avec *L. emarginata*

A partir des concentrations en Ni dans la solution du sol rhizosphérique, C_s , des pots plantés *L100*, nous avons cherché à optimiser les paramètres k , m et α (Figure 36 et Tableau 13, protocole (d)). Pour ce faire nous avons pris en compte la quantité de nickel prélevée par *L. emarginata* au cours de la culture ($\varphi(t)$) selon l'équation :

$$\varphi(t) = TSCF_{Ni} \cdot T(t) \cdot C_s \quad [2-5]$$

Le facteur de bioconcentration $TSCF_{Ni}$ a été fixé à 5,6 (cf. § 3.2) et le flux de transpiration T (en ml jour^{-1}) prédit quotidiennement à partir de la fonction exponentielle déterminée sur les données de la culture de *L100* (cf. § 3.1.3) :

$$T(t) = (0,503 \pm 0,011) e^{(0,12 \pm 0,001)t} \quad [2-6]$$

L'optimisation est moins bonne avec ces données (Figure 36) qu'avec celles de *T100* (Figure 35). En effet, on note que le modèle de prédiction de C_s sous-estime en fin de culture la concentration du Ni en solution. En fixant k à $16,8 \text{ l kg}^{-1}$ et m à 0,28 (valeurs des paramètres obtenues par l'optimisation suivant le protocole (c) on obtient un coefficient de désorption du Ni, α , identique à celui déterminé avec les données du sol témoin sans plante

T100 ($\alpha = 0,058 \text{ jour}^{-1}$). La modélisation obtenue (Figure 37) n'a pas corrigé la sous-estimation en fin de culture et reste très proche de celle obtenue avec le protocole (d) (Figure 36).

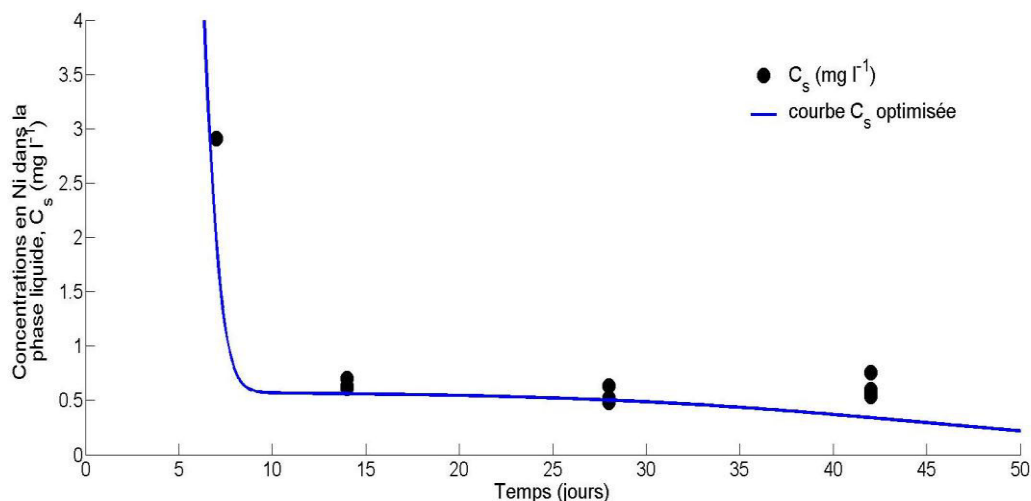


Figure 36. Optimisation combinée des paramètres k , m et α à partir des données expérimentales de la concentration en Ni dans la solution du sol, C_s , des pots cultivés *L100* (protocole (d) du Tableau 13). Le jour 0 correspond au jour de préparation des pots, ainsi, le 7^{ème} jour correspond au 1^{er} jour de culture pour *L100*.

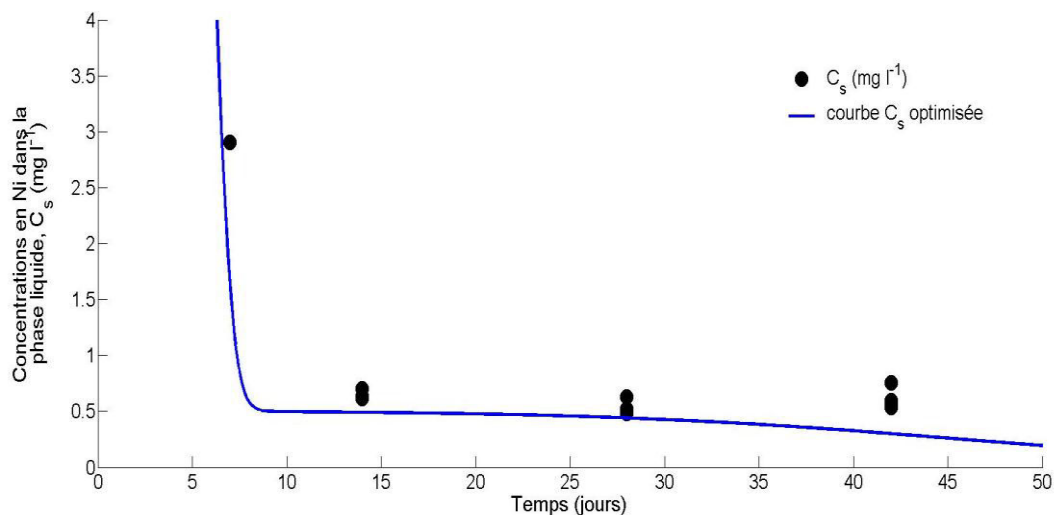


Figure 37. Optimisation du paramètre α à partir des données expérimentales de la concentration en Ni dans la solution du sol, C_s , des pots cultivés *L100* et en fixant k à $16,8 \text{ l kg}^{-1}$ et m à $0,28$ (protocole (e) du Tableau 13). Le jour 0 correspond au jour de préparation des pots, ainsi, le 7^{ème} jour correspond au 1^{er} jour de culture pour *L100*.

4.1.4 Synthèse des optimisations des paramètres du modèle et choix de la meilleure calibration

Les valeurs des différents paramètres d'adsorption/désorption du nickel, après optimisation, sont répertoriées dans le Tableau 13. Nous avons vu que les isothermes d'adsorption du Ni n'étaient pas représentatives des propriétés d'adsorption/désorption du sol (Figure 34). Par ailleurs, les isothermes d'adsorption du nickel ne permettent pas la détermination du coefficient de désorption du nickel, α . Ce dernier nécessite un suivi dans le temps de l'évolution de la concentration en Ni dans la solution rhizosphérique, C_s , comme nous l'avons fait avec les concentrations en Ni des solutions des pots témoins sans plantes T100 (Figure 35) ou des pots cultivés L100 (Figure 36). Nous avons vu que l'optimisation des paramètres était meilleure avec les données du sol sans plante T100 qu'avec celles des pots plantés L100. L'optimisation à partir des données des pots cultivés nécessite l'emploi d'un modèle de transpiration et d'une valeur du facteur de bioconcentration, $TSCF_{Ni}$ (cf. 4.1.1), dont les incertitudes peuvent se répercuter sur les valeurs des paramètres optimisés. Notons également que la réalisation expérimentale du suivi de C_s est plus facile à mettre en œuvre pour des pots sans plantes. C'est pourquoi, afin de valider le modèle, nous avons privilégié l'emploi des valeurs des paramètres optimisés à partir des concentrations en Ni dans les solutions de pots témoins sans plantes T100.

4.2 Validation du modèle

Nous avons cherché à valider le modèle sur les quantités de nickel accumulées au cours de la culture par les feuilles de *L. emarginata* (Q_F) et sur l'évolution des teneurs en Ni dans la solution du sol (C_s). Pour ce faire, nous avons utilisé les paramètres optimisés à partir des données du sol sans plante T100 (protocole (c)) : $k = 16,8 \text{ l kg}^{-1}$; $m = 0,28$; $\alpha = 0,058$) et la valeur du $TSCF_{Ni}$ de 5,6 déterminée à partir des données d'accumulation foliaire du nickel par les hyperaccumulateurs L1 et L10 (début de ce chapitre). On note que la prédiction de la concentration en nickel dans la solution du sol, C_s , est plutôt bonne (Figure 38) par rapport aux points expérimentaux, avec plus de 80 % des concentrations en Ni mesurées comprises dans un intervalle de confiance de 25 % par rapport aux concentrations prédites (Figure 39). On observe cependant une légère baisse de la concentration prédite entre les 21^{ème} et 35^{ème} jours, alors que les concentrations mesurées étaient relativement constantes (Figure 25).

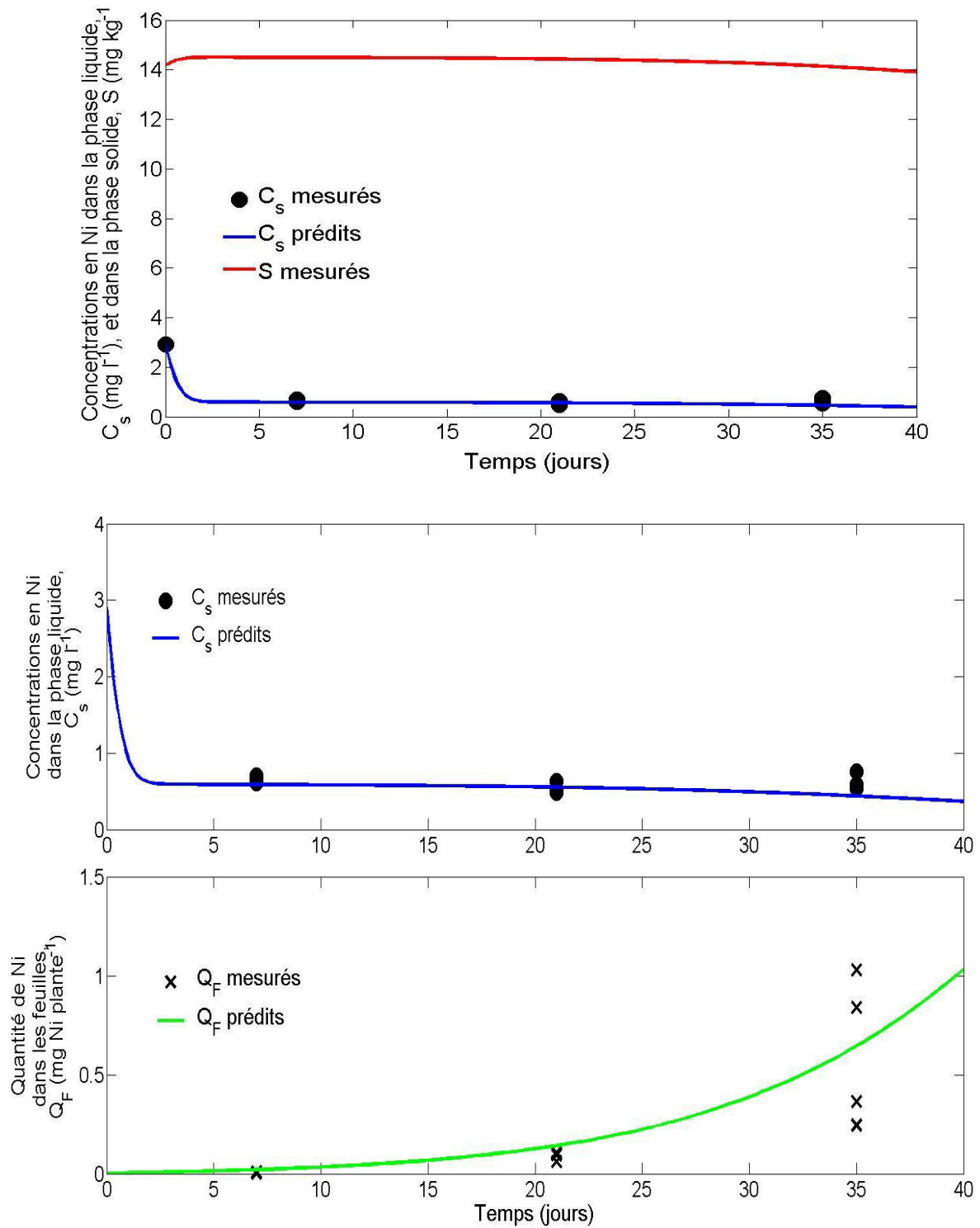


Figure 38. Prédiction simultanée de la concentration en Ni dans la solution du sol (C_s) et dans la phase solide (S), et de la quantité de Ni dans les feuilles de *L. emarginata* (Q_F) cultivée sur le sol sableux fertilisé et contaminé en Ni par rapport aux mesures expérimentales. Les paramètres optimisés du modèle sont : $k = 16,8 \text{ l kg}^{-1}$; $m = 0,28$; $\alpha = 0,058 \text{ j}^{-1}$; $\text{TSCF}_{\text{Ni}} = 5,6$. La prédiction de C_s est présentée deux fois à deux échelles différentes.

La prédiction de la quantité de Ni foliaire accumulée, Q_F , est moins bonne que celle de C_s , en particulier pour le second prélèvement (21^{ème} jour) (Figure 38). Seulement 25 % des points mesurés est compris dans l'intervalle de confiance de 50 % par rapport à la prédiction (Figure 40). Le modèle a une nette tendance à surestimer la quantité de Ni accumulée dans les feuilles de *L. emarginata*, ce qui peut être attribuable au choix d'un $TSCF_{Ni}$ trop élevé ($TSCF_{Ni} = 5,6$) par rapport au $TSCF_{Ni}$ de la culture ($TSCF_{Ni} = 4,6$). L'utilisation du $TSCF_{Ni}$ de la culture ($TSCF_{Ni} = 4,6$) permet une légère amélioration de la prédiction de C_s et une bonne amélioration de la prédiction de Q_F , avec 50 % des quantités mesurées comprises dans l'intervalle de confiance de 50 % contre 25 % précédemment (données non-montrées).

4.3 Analyse de sensibilité du modèle

L'analyse de sensibilité a consisté à faire varier chaque paramètre individuellement d'un facteur de 0,5 à 2 et de mesurer, à l'aide des modèles, les variations de quantité de Ni accumulée dans les feuilles de l'hyperaccumulateur et de concentration en Ni dans la solution du sol au 35^{ème} jour de culture. Le paramètre du modèle influençant le plus la concentration en Ni dans la solution du sol, C_s , et la quantité de Ni dans la plante, Q_F , est le coefficient de partition solide/liquide du nickel, k (Figure 41a et b). En effet, lorsque k est doublé, C_s est divisé par 9 et Q_F par 10,8, et lorsque k est divisé de moitié, C_s est multiplié par 3,3 et Q_F par 3,7. On note qu'une surestimation de k aura une plus grande influence qu'une sous-estimation. Dans une moindre mesure, le paramètre m (coefficient de la loi puissance d'adsorption de Freundlich) a une influence sur C_s et Q_F lorsqu'il est sous-estimé, ainsi une diminution de moitié de m , entraîne une diminution de moitié sur C_s et Q_F .

D'après l'équation [2-5], la variation du facteur de bioconcentration $TSCF_{Ni}$ aura le même effet que la variation du flux de transpiration. Ainsi, le $TSCF_{Ni}$ et le flux de transpiration auront une influence sur la plante, moins forte que le facteur de partition solide/liquide du Ni, k , mais non négligeable. Un de ces deux paramètres divisé par deux entraînera une diminution de moitié de Q_F . L'effet sur la concentration en solution de Ni, C_s , est quant à elle minime.

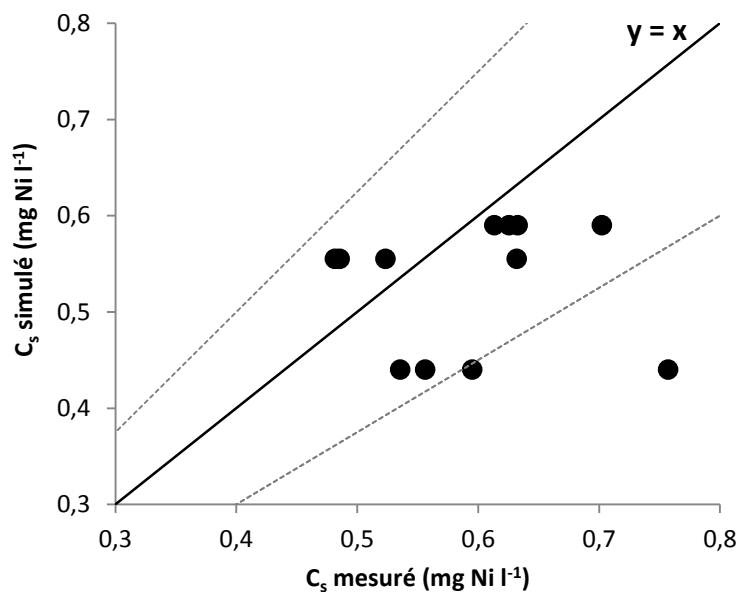


Figure 39. Relations entre les concentrations en Ni dans la solution du sol, C_s , simulées par le modèle et celles mesurées dans les solutions du sol au cours des trois prélèvements successifs des systèmes sol-hyperaccumulateur *L100*. Les deux droites pointillées de chaque côté de la bissectrice représentent l'intervalle de confiance de 25 % sur la prédiction.

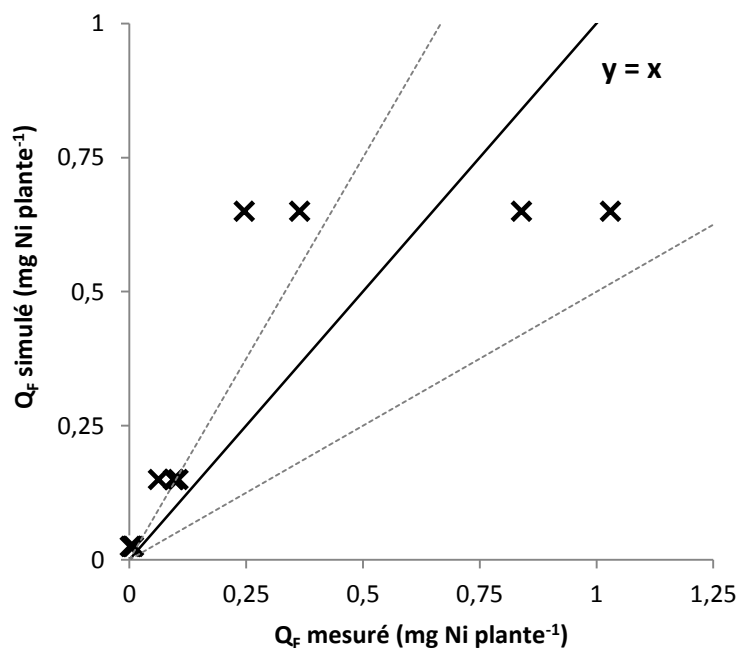


Figure 40. Relations entre les quantités de Ni accumulées dans les feuilles de *L. emarginata*, Q_f , simulées par le modèle et celles mesurées dans les plantes lors des trois prélèvements de *L100* effectués au cours de leurs cinétiques de croissance et de phytoaccumulation de Ni. Les deux droites pointillées de chaque côté de la bissectrice représentent l'intervalle de 50 % sur la prédiction.

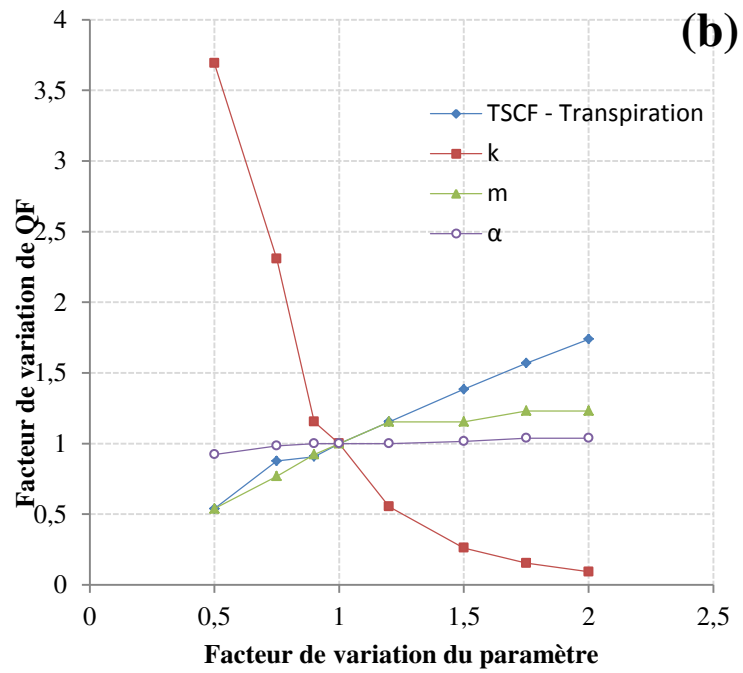
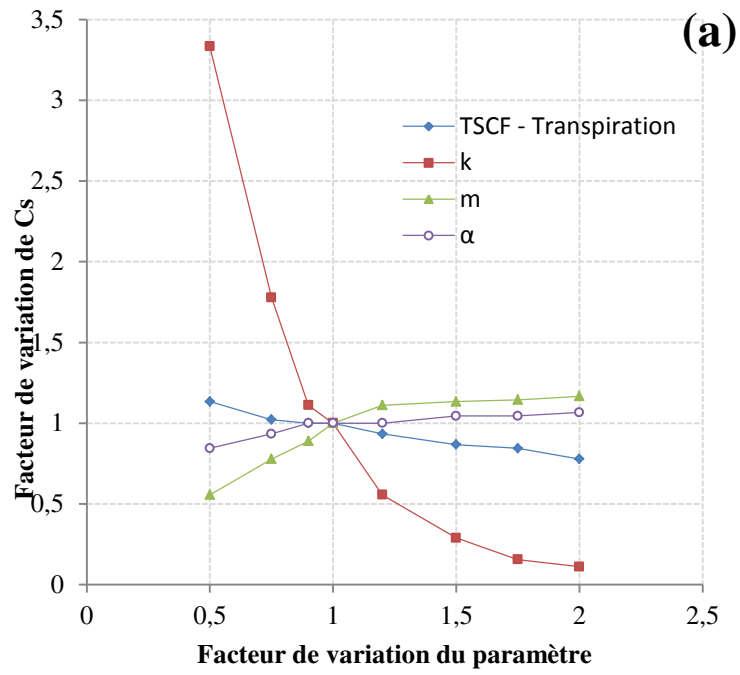


Figure 41. Analyse de sensibilité du modèle portant sur la concentration en Ni dans la solution du sol, C_s , simulée (a) et sur la quantité de Ni dans les feuilles de *L. emarginata*, Q_F , simulée (b) pour chaque paramètre du modèle pris individuellement.

5 Discussion

5.1 Suivi de la solution du sol

Dans cette étude, les cultures ont été menées sur un sol sableux fertilisé et contaminé artificiellement. De la même manière que pour les cultures du Chapitre 1 sur le sable, les concentrations en Ni dans les solutions du sol se sont avérées être plus de cent fois inférieures à la teneur en Ni dans la solution utilisée pour la contamination. Cette forte diminution de la concentration en Ni est attribuable à la présence d'oxyhydroxides de fer bien et mal cristallisés ainsi qu'aux revêtement organiques riches en groupements fonctionnels OH et en sites échangeables O⁻. Le sol révèle donc un fort pouvoir tampon. Tout comme le sable, nous ferons l'hypothèse que tout le nickel adsorbé peut être biodésorbable lors de la phytoextraction.

5.2 Optimisation des paramètres du modèle

Les isothermes d'adsorption issues de suspensions de sol dans un grand volume d'électrolyte contaminé ne sont pas adaptées pour l'optimisation des paramètres d'adsorption/désorption du modèle. Tout d'abord, elles ne permettent pas la détermination du coefficient de désorption du Ni, α , qui nécessite une approche cinétique de la désorption (vitesse de désorption). Puis nous avons vu qu'à un pH équivalent à celui de la solution du sol, le coefficient de partition solide/liquide du Ni, k , et l'exposant de la loi puissance d'adsorption, m , déterminés à partir d'une isotherme d'adsorption du nickel sur le sol sélectionné, n'étaient pas représentatifs du sol contaminé. Le modèle sous-estimait très fortement la concentration en Ni dans la solution du sol (Figure 34). Cette sous-estimation indique que les paramètres k et m caractérisaient une adsorption du Ni sur les phases solides plus forte que l'adsorption réelle dans le sol. Cette mauvaise représentativité des paramètres d'adsorption peut s'expliquer par le fait que :

- les isothermes ont été effectuées sur une petite quantité de sol en suspension dans un grand volume d'électrolyte (rapport sol/solution de 1:5) alors que dans les pots un petit volume de solution était en contact avec une grande quantité de sol (rapport sol/solution de 7:1)

- la gamme de concentration choisie pour l'isotherme était trop élevée comparée à la concentration en Ni dans la solution du sol, l'isotherme n'étant alors, pas représentative de l'adsorption du Ni à de faibles teneurs.
- l'électrolyte utilisé (nitrate de calcium) n'était pas le reflet de la solution du sol. Dans ce cas on pouvait s'attendre à une surestimation de la mise en solution du Ni du fait de la présence de calcium en grande quantité dans l'électrolyte, comme il a été montré que la présence de cations compétiteurs, tels que le Ca, diminuait l'adsorption des métaux (Temminghoff *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1997; Wilkins *et al.*, 1998).

De façon originale, nous avons donc utilisé les cinétiques d'adsorption/désorption du sol sans plante (*T100*) et du sol planté (*L100*) pour optimiser les paramètres d'adsorption/désorption du modèle. Cette optimisation combinée des trois paramètres k , m et α permet une bonne prédiction de la concentration en Ni dans la solution du sol sans plante (Figure 35). Cependant, les valeurs de ces paramètres sont à interpréter avec précaution. En effet, elles ne correspondent pas aux vraies valeurs du coefficient de partition solide/liquide du Ni, k , et de l'exposant de la loi puissance d'adsorption, m , du système sol/solution à l'équilibre, comme c'est le cas avec les isothermes d'adsorption pour un rapport sol/solution donnée, car leur optimisation est réalisée (i) simultanément avec le coefficient de désorption, α , et (ii) sur une cinétique d'évolution de la concentration en Ni dans la solution où l'équilibre n'est atteint qu'au bout de neuf jours (Figure 35). Cette remarque vaut également sur l'identification des paramètres à partir des données du sol planté *L100*.

L'optimisation des paramètres physico-chimiques à partir des concentrations en Ni des solutions rhizosphériques de *L100*, est moins bonne qu'avec les données des pots témoins *T100* car nous avons observé une sous-estimation en fin de culture de la concentration en Ni dans la solution rhizosphérique (Figure 36). La baisse de C_s simulé, à partir du 30^{ème} jour, s'explique par l'évolution du prélèvement de Ni qui suit l'évolution de la transpiration (cf. équation 2-5). Comme cette dernière suit une loi exponentielle, le prélèvement est fortement « accéléré » en fin de culture ce qui se répercute par une baisse soudaine de la concentration en Ni dans la solution. Mais pourquoi au niveau expérimental, cette baisse de C_s n'a pas eu lieu ? Cette sous-estimation pourrait refléter un changement des valeurs des paramètres d'adsorption/désorption du Ni dans le sol au cours de la culture. Ainsi, en fin de culture, la

désorption est plus forte ce qui pourrait se traduire par une augmentation du coefficient de désorption, α , ou une diminution du coefficient de partition solide/liquide, k . Ce changement pourrait être induit par un changement des conditions physico-chimiques dans la rhizosphère due à l'activité racinaire comme l'exsudation de protons et d'acides organiques (ce qui ne semble pas être le cas ici du fait d'un pH constant au cours de la culture, voire légèrement en augmentation, Figure 25b) ou l'activation microbologique (voir synthèse de Yang *et al.* (2005) sur les mécanismes d'hyperaccumulation). Ce changement de propriété d'adsorption/désorption pourrait également être le reflet de la forte baisse des teneurs en nutriments dans la solution rhizosphérique (Figure 26). Dans leur simulation de l'évolution des concentrations en Cd dans la solution d'un sol cultivé avec l'hyperaccumulateur *Thlaspi caerulescens*, Ingwersen *et al.* (2006) ont opéré un changement de la solution d'irrigation au milieu de la culture, passant d'une solution en CaCl_2 à une solution fertilisante (Ca ; Mg ; NPK). Ainsi, le coefficient de désorption, α , a été divisé par 3 après l'ajout de la solution fertilisante, ce qui signifie une désorption plus faible en présence d'éléments nutritifs compétiteurs.

5.3 Validation du modèle et analyse de sensibilité

Nous avons vu que la prédiction de la concentration en Ni dans la solution rhizosphérique était plutôt bonne, malgré la légère sous-estimation en fin de culture, alors que l'on observe une surestimation de la quantité de Ni dans les feuilles de l'hyperaccumulateur de la part du modèle (Figure 39 et Figure 40). Cela s'explique par le fait que la prédiction de Q_F est sensible à plus de paramètres que C_s . Pour les deux prédictions, le coefficient de partition solide/liquide est le paramètre ayant le plus d'influence, mais Q_F est aussi influencé par les paramètres de la plante que sont la transpiration et le facteur de bioconcentration TSCF_{Ni} (Figure 41b). Ainsi, une erreur sur l'un de ces deux paramètres se répercutera sur Q_F alors qu'il n'aura que peu d'impact sur C_s . Par exemple, nous avons vu que la surestimation de Q_F était en partie due au choix d'un facteur de bioconcentration, TSCF_{Ni} , déterminé sur une culture de *L. emarginata* dans du sable contaminé ($\text{TSCF}_{\text{Ni}} = 5,6$), trop élevé par rapport au TSCF_{Ni} représentatif de la culture ($\text{TSCF}_{\text{Ni}} = 4,6$).

Parmi les paramètres d'adsorption/désorption du modèle le coefficient de partition solide/liquide du Ni, k , est le paramètre ayant le plus d'influence. Ainsi, lorsque k est doublé, C_s est divisée par 9 alors qu'elle ne change pas quand α est multiplié par 2. Le coefficient de

désorption n'a donc que peu d'influence sur les sorties du modèle. Le changement de propriété d'adsorption du sol planté en fin de culture (cf. § 5.1) serait donc plutôt la conséquence d'une variation de k , plutôt que d'une augmentation de α due à la baisse des teneurs en nutriments.

6 Conclusion et perspectives

Le couplage du modèle de mise en solution des ETM d'Ingwersen *et al.* (2006) adapté avec le modèle biophysique d'accumulation foliaire des ETM, semble être un bon outil de prédiction des teneurs en ETM dans la solution du sol et des quantités d'ETM dans les feuilles d'hyperaccumulateurs. Nous avons vu que l'optimisation des paramètres du modèle à partir d'isothermes d'adsorption n'était pas pertinente. Ainsi, de façon originale, nous les avons optimisés à partir d'une cinétique d'évolution des teneurs en Ni dans la solution du sol non planté. Les données du sol non planté ont été préférées aux données du sol planté car, dans une optique d'applicabilité du modèle, elles nécessitent une démarche expérimentale simplifiée comparativement au suivi d'une culture d'hyperaccumulateurs.

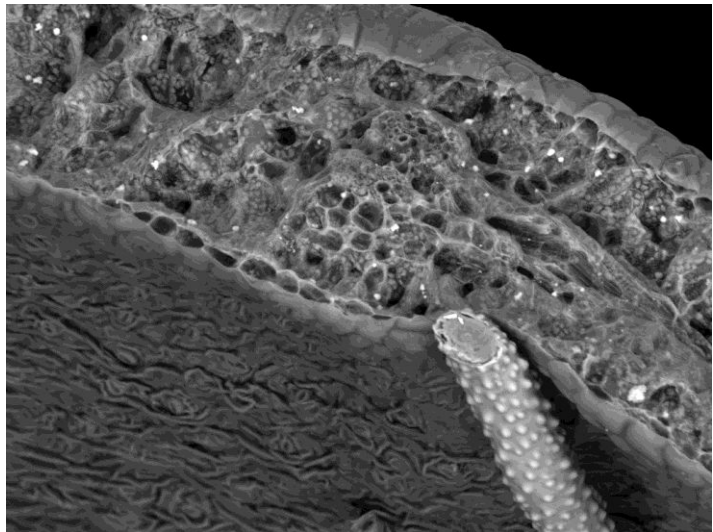
La mise au point du modèle pour une culture de la plante hyperaccumulatrice *Leptoplax emarginata* sur un sol contaminé en nickel a montré que la prédiction de la concentration en Ni dans la solution rhizosphérique était plutôt bonne mais qu'elle ne prenait pas en compte les changements de propriétés d'adsorption/désorption de la rhizosphère. Or nous avons vu que le coefficient de partition solide/liquide du Ni avait une influence prédominante sur la prédiction de la concentration en solution mais aussi sur la prédiction de la quantité de Ni dans la plante. Ainsi, une faible variation de ce paramètre au cours de la culture peut très vite mener à une mauvaise prédiction couplée de la teneur en ETM de la solution du sol et de la quantité d'ETM dans les feuilles de la plante. Une des voies pour remédier à ce problème serait l'emploi d'équations de Freundlich généralisées (prise en compte du pH, de la CEC ou du carbone organique dissout par exemple) (Elzinga *et al.*, 1999) comme l'a fait Ingwersen *et al.* (2006) en prenant en compte le pH. Ainsi, les changements des propriétés d'adsorption/désorption dues aux paramètres intégrés dans l'équation généralisée de Freundlich pourraient être pris en compte par le modèle. Cependant, cette complexification pourrait

devenir un frein à l'application du modèle quand l'un de ses atouts est justement sa simplicité d'usage (peu de paramètres d'entrée comparativement au modèle mécaniste de Barber) et que sa transcription sur le terrain nécessitera irrémédiablement une complexification.

Durant nos cultures en pots, l'humidité du sol était conservée relativement constante et du fait de la taille des pots, était la même dans tous les pots. Or, sur le terrain l'humidité variera le long du profil de sol rhizosphérique selon les variations climatiques et les cycles de dessiccation et d'humectation et, avec elle, les teneurs en ETM dans la solution. Ainsi, notre modèle ne pourrait être applicable sur le terrain qu'en étant transformé en modèle spatialisé en une dimension (la profondeur) afin de prendre en compte les variations d'humidité au sein du profil de sol rhizosphérique (équation de Richards en milieu insaturé, 1931). Par ailleurs, comme les conditions climatiques influencent la transpiration, le modèle devra également prendre en compte les variations du climat, en particulier durant les périodes très humides ou très sèches, lorsque le flux de transpiration pourra beaucoup varier. En effet, avec le coefficient de partition solide/liquide, k , la transpiration est le paramètre le plus influant mais est très difficile à estimer sur le terrain. Il serait donc recommandé d'utiliser les données d'une cinétique de croissance et d'utiliser la relation qui établit que le rapport du volume d'eau transpirée sur la production de biomasse aérienne correspondante est égal au rapport du déficit de pression de vapeur correspondant sur le coefficient k_a qui serait spécifique de la plante et est exprimé en unités de pression (Bierhuizen & Slatyer, 1965; Kemanian *et al.*, 2005). Le facteur de bioconcentration TSCF, lui, est plutôt robuste et devrait peut varier au cours d'une culture, comparativement à la transpiration.

Chapitre 3

Distributions spatiales du nickel foliaire, de l'échelle de la feuille à celle du tissu, en relation avec les caractéristiques écophysiologicals et les éléments minéraux majeurs



Observation en MEB d'une coupe de feuille de L. emarginata

1 Introduction

Comme déjà largement établi par les chercheurs travaillant sur les plantes hyperaccumultrices d'éléments en trace métalliques, nous avons observé que l'hyperaccumulateur *Leptoplax emarginata* accumulait le nickel de façon prédominante dans ses feuilles (Chapitres 1 et 2). Aussi, après avoir étudié certains mécanismes macroscopiques d'accumulation foliaire du nickel (Chapitre 1) et les avoir modélisés (Chapitre 2), nous avons voulu mieux comprendre, de l'échelle de la feuille à celle du tissu foliaire, l'exceptionnelle capacité de *Leptoplax emarginata* à tolérer et à accumuler le nickel (et potentiellement d'autres ETM). La localisation des ETM dans les organes et les tissus des plantes hyperaccumultrices, leur spéciation et la corrélation positive ou négative entre eux et les éléments nutritifs majeurs ont fait l'objet de nombreuses investigations, à différentes échelles spatiales. Après avoir évoqué cet état de l'art, nous précisons nos objectifs et nos approches.

A l'échelle de la feuille, le nickel est rapidement transloqué des racines du blé ou du lupin aux feuilles matures puis aux jeunes feuilles au cours de la culture (Page & Feller, 2005; Page *et al.*, 2006), le nickel se révélant être l'ETM le plus mobile et le plus redistribué parmi ceux étudiés par ces auteurs (Zn, Cd, Mn, Ni et Co) grâce à l'étude des autoradiographies différentielles de ces ETM marqués. A une échelle un peu plus fine, le métal étudié (Mn : Xu *et al.*, 2006; Cd : Cosio *et al.*, 2006) semble surtout localisé dans les zones de bordure de feuilles, notamment pour les feuilles assez mûres, ce qui serait attribuable à la transpiration.

A l'échelle des tissus et des cellules, la tolérance et l'hyperaccumulation de métaux toxiques est attribuable à différents processus qui souvent se combinent entre eux, notamment : (i) la formation de complexes organométalliques associés à différents ligands (acides organiques, cystéine et autres thiols à faible encombrement moléculaire) (Lasat *et al.*, 1998; Kramer *et al.*, 2000; Kupper *et al.*, 2004; Bhatia *et al.*, 2005; Hernandez-Allica *et al.*, 2006; Callahan *et al.*, 2006; Haydon & Cobbett, 2007; McNear *et al.*, 2010) et (ii) la compartimentation et stockage prédominant des ETM dans les épidermes, tout comme le soufre, loin des parenchymes où s'effectuent les processus photosynthétiques (Mesjasz-Przybylowicz *et al.*, 1994; Kupper *et al.*, 1999; Lombi *et al.*, 2002; Robinson *et al.*, 2003; Broadhurst *et al.*, 2004; Tappero *et al.*, 2007; Vogel-Mikuš *et al.*, 2008; Kachenko *et al.*, 2008), excepté les cellules de garde et les cellules subsidiaires des stomates nettement plus pauvres en ETM (Frey *et al.*, 2000; Kupper *et al.*, 2001).

Notre objectif était de relier, en fonction du degré de maturité de la feuille, la distribution spatiale de la concentration en nickel foliaire, et son mode d'accumulation, à la transpiration et aux densités de stomates. Notre hypothèse était que le nickel suivrait le flux de transpiration jusqu'aux stomates puis serait redistribué de façon continue et homogène dans les épidermes, par voie apoplasmique, pour se retrouver dans les parois des cellules épidermiques (saturation de ces membranes par adsorption) coassocié au soufre de protéines à groupements thiol. Ce mécanisme de détoxification, si nous le validons, permettrait de mieux comprendre l'hyperaccumulation.

Pour essayer de valider ces hypothèses, il a été nécessaire d'utiliser une combinaison d'approches complémentaires, entreprises avec des collaborations extérieures au laboratoire Sols et Environnement : mesures du fonctionnement écophysio-logique des feuilles (transpiration foliaire, assimilation en CO₂, en collaboration tout comme pour les autres chapitres avec C. Robin du laboratoire Agronomie et Environnement INPL/INRA) et des densités de stomates (MEB : D. Le Thiec et C. Rose du laboratoire d'Ecologie et d'Ecophysio-logie Forestière INRA/UHP), détermination de la quantité de nickel foliaire, feuille par feuille, à l'aide d'un dispositif miniaturisé de minéralisation puis d'analyse en ICP-AES, quantification de Ni, S, Ca, Mg, P et K dans les épidermes supérieur et inférieur ainsi que dans les parenchymes lacuneux et spongieux en microscopies électronique à balayage couplé à la microanalyse dispersive en énergie des rayons X (EDX), après avoir préalablement figé dans le froid les feuilles sélectionnées puis les avoir lyophilisées, ce qui est vraiment essentiel pour préserver les ETM (MEB : D. Le Thiec et C. Rose du laboratoire d'Ecologie et d'Ecophysio-logie Forestière INRA/UHP), réalisation de coupes fines (de 250 nm d'épaisseur) et ultrafines (de 80 nm d'épaisseur) afin de les observer et de les analyser en microscopie photonique (avec l'utilisation d'un colorant spécifique du Ni, le diméthylglyoxime), et à transmission (MET : au L.S.E. avec F. Watteau) couplé à la microanalyse dispersive en énergie des rayons X.

Nous avons aussi cultivé nos plantes hyperaccumulatrices dans du sol fertilisé mais non contaminé en nickel afin de comparer leur croissance et leurs caractéristiques écophysio-logiques à leurs homologues cultivés sur le même sol fertilisé mais cette fois-ci contaminé en Ni; de même nous avons comparé les concentrations foliaires en Ni, S, Ca, Mg, P et K de feuilles "vieilles" et "jeunes" grâce à des analyses en MEB/EDX sur des pastilles de feuilles broyées (D. Le Thiec et C. Rose du laboratoire d'Ecologie et d'Ecophysio-logie Forestière INRA/UHP), les concentrations en Ni étant par ailleurs étalonnées en ICP-AES.

2 Matériels et méthodes

2.1 Cultures de *Leptoplax emarginata*

2.1.1 Matériel végétal et milieux de culture

Notre étude a porté sur l'hyperaccumulateur grec de nickel *Leptoplax emarginata* (voir description de la plante dans le Chapitre 1, § 2.1.1) dont les graines ont été collectées durant l'été 2006. Ces graines sont riches en Ni avec une teneur moyenne en Ni de 5,08 mg.g⁻¹ dans la graine sèche sans tégument (1 g de graines sèches correspondant environ à 309 graines). Les plantes ont été mises à germées sur du sable quartzueux peu réactif (voir description du sable dans le Chapitre 1, § 2.2) puis ont été cultivées, soit sur ce même sable, soit sur un sol sableux issu d'un horizon supérieur de podzol cultivé (voir description du sol sableux dans le Chapitre 2, § 2.2).

2.1.2 Préparation des pots de culture et conditions de culture

Des pots de 1,5 L ont été rempli de 1 L de sol sec (1,37 kg) et mélangé à 200 ml de solution fertilisante/contaminante dont la composition était la suivante (en mg l⁻¹ avec entre parenthèses le sel utilisé) : 58 N (NH₄NO₃); 40 P (KH₂PO₄) ; 50,5 K (KH₂PO₄) ; 40 Ca (Ca(NO₃)₂); 20 Mg (MgSO₄); 4 Fe (FeSO₄) ; 0,5 Mn (MnSO₄) ; 0,3 Zn (ZnSO₄) ; 0,1 B (H₃BO₃); 0,01 Cu (CuSO₄); 0,01 Mo (Na₂MoO₄) et **100 Ni** (NiSO₄). Des pots de 1 L ont été remplis de 500 ml de sol sec (685 g) ou 500 ml de sable sec (700 g), et ont été mélangés à 100 ml de solution fertilisante/contaminante (même composition que précédemment) sauf pour cinq pots contenant du sol où la solution fertilisante ne contenait pas de nickel. Afin d'éviter le drainage et de limiter l'évaporation du milieu poreux, tous les pots ont été « plastifiés » selon la méthode décrite dans le Chapitre 1 (§ 2.3.2, page 34). Après mélanges, les pots ont été laissés à stabiliser pendant quatre jours avant repiquage. Tous les pots plantés ont été placés aléatoirement dans une chambre de culture dont les conditions climatiques étaient de 20 °C le jour et 18 °C la nuit avec une photopériode de 16 h, sous une intensité lumineuse de 325 μmol photons m⁻² s⁻¹ et une hygrométrie de 50 %. Ces conditions correspondent à un déficit de pression de vapeur d'eau de 1,17 kPa le jour.

2.1.3 Suivi des cultures

2.1.3.1 Première série de cultures

Une première série de plantules a été repiquée après une préculture de quinze jours dans le sable fertilisé. Huit de ses plantes ont été repiquées dans des pots de 1,5 L et deux plantes dans des pots de 1 L contenant du sol contaminé. Des bagues de couleur ont été placées toutes les semaines sur la dernière feuille apparue afin d'identifier les différentes catégories d'âge de feuilles. Ainsi, nous avons pu différencier quatre catégories de feuilles : les feuilles apparues avant le repiquage dans le sol contaminé (*F1*), les feuilles apparues lors des deux premières semaines de culture, « vieilles feuilles » (*F2*), les feuilles apparues entre la troisième et la cinquième semaines de culture, « feuilles matures » (*F3*), et les feuilles apparues après la cinquième semaine de culture, « feuilles jeunes » (*F4*). Les pots étaient pesés quotidiennement et irrigués avec de l'eau déminéralisée afin de revenir à leur poids d'origine. Tous les quinze jours, l'eau déminéralisée était remplacée par de la solution fertilisante exempte de nickel.

2.1.3.2 Seconde série de cultures

Une seconde série de plantules a été repiquée dans des pots de 1 L après une préculture de cinq semaines dans le sable fertilisé. Cinq de ces plantes ont été repiquées dans du sol contaminé et cinq autres dans du sol non-contaminé. Dix autres plantes ont été repiquées dans du sable contaminé. Pour ces plantes, l'irrigation n'était pas contrôlée par pesées et des ajouts de solution fertilisante/contaminante ont été réalisés régulièrement pour les plantes dans le sable.

2.2 Prélèvements et analyses

Les plantes ayant été prélevées à des temps différents et servant parfois à plusieurs études, les modalités de culture de chaque plante et les études qui y étaient associées, ont ainsi été synthétisées dans le Tableau 14.

Tableau 14. Résumé des modalités de culture et des études associées à chaque plante

Séries de culture	Plantes	Durée de préculture (semaines)	Taille du pot	Milieu poreux	Contamination Nickel	Durée de culture (semaines)	Etudes associées
1 para- graphe 2.1.3.1	<i>P0</i>	2	1 L	Sol	Oui	6	Coupes ultrafines et MET-EDX Microscopie photonique
	<i>P1</i>	2	1,5 L	Sol	Oui	6	Distribution du Ni foliaire
	<i>P2</i>	2	1,5 L	Sol	Oui	7	MEB-EDX des tissus foliaires Distribution du Ni foliaire
2 para- graphe 2.1.3.2	<i>P3</i>	5	1 L	Sol	Oui	5	Caractéristiques écophysiologicals
	<i>P4</i>	5	1 L	Sol	Non	5	MEB-EDX des pastilles de feuilles broyées Caractéristiques écophysiologicals
	<i>P5</i>	5	1 L	Sable	Oui	5	MEB-EDX des pastilles de feuilles broyées

2.2.1 Etude de la croissance et de l'écophysologie de *Leptoplax emarginata* cultivée dans le sol fertilisé, contaminé ou non

Deux plantes de chaque culture de plantes dans le sol contaminé (*P3*) et le sol non-contaminé (*P4*), ont été sélectionnées afin de mesurer les biomasses et surfaces foliaires totales, ainsi que les échanges gazeux sur les feuilles les plus développées

2.2.2 Etude de la distribution spatiale du nickel foliaire en fonction des caractéristiques écophysiologicals des feuilles (*P1*)

Après six semaines de culture, trois plantes « homogènes » des pots de 1,5 L contenant du sol contaminé ont été sélectionnées (Plantes *P1*, cf. Tableau 14) pour des mesures d'assimilation en CO₂ et de transpiration sur chaque feuille à l'aide d'un appareil portable de mesure d'échanges gazeux CIRAS-1 (PP SYSTEMS Inc., USA). Puis, chaque feuille a été récoltée pour des mesures de biomasse humide et sèche (après 48 h dans une étuve à 70°C) et de surface (analyse d'image à partir du Logiciel WinFOLIA®). Les feuilles sèches ont été broyées finement dans un mortier en agate. Des portions de 50 mg de poudre ont été minéralisées par HNO₃ et H₂O₂ (1:1, v/v) en réacteur ouvert dans une étuve à 80°C pendant 24 h. Les teneurs en Ni dans les minéralisats ont été déterminées par spectrométrie d'émission, ICP-AES (Liberty RL, Carian, Inc, Palo Alto, CA, USA).

2.2.3 Microscopie électronique à balayage et analyses EDX

2.2.3.1 Sélection des plantes et des feuilles

Après sept semaines de culture, trois plantes « homogènes » des cinq plantes restantes dans les pots de 1,5L contenant du sol contaminé, ont été sélectionnées (Plantes *P2*, cf. Tableau 14). Pour chacune des trois plantes, une feuille de chaque catégorie (*F1*, *F2*, *F3* et *F4*, cf. § 2.1.3.1) a été sélectionnée pour des mesures de densités stomatiques et des analyses de nickel et d'éléments majeurs (Ca, Mg, S, P et K) à l'aide d'un microscope électronique à balayage LEO 1450 VP (Carl Zeiss Inc., USA) couplé à spectromètre d'analyse dispersive en énergie de rayons X (EDX, Energy Dispersive X-Ray) de modèle Inca Energy (Oxford Instruments, UK). Les deux feuilles voisines de chacune des quatre feuilles sélectionnées ont été analysées suivant le même protocole que celui décrit dans le paragraphe précédent (§2.2.2).

2.2.3.2 Mesures des densités stomatiques

Les densités stomatiques ont été mesurées pour chaque catégorie de feuilles sur les faces inférieures et supérieures. Six photographies ont été effectuées aléatoirement sur chaque face de feuille puis analysées grâce au logiciel d'analyse d'image Visilog (Noesis, FR).

2.2.3.3 Analyses EDX

Pour les analyses EDX, un étalonnage a été réalisé à partir d'échantillons internes au laboratoire d'Ecologie et d'Ecophysiologie Forestière.

a. Analyses EDX des pastilles de feuilles broyées

Des jeunes et des vieilles feuilles de plantes *P4* et *P5*, ainsi qu'une plante issue de la première culture en pot de 1,5 L, ont été sélectionnées. Les feuilles ont été séchées 48 h dans une étuve à 70°C puis broyées finement à l'aide d'un mortier en agate. Une partie de la poudre a été compactée sous la forme d'une pastille qui a été analysée en MEB-EDX (6 répétitions par pastille) et une autre partie de la poudre a été analysée en ICP-AES (uniquement pour le nickel) après minéralisation afin de valider les concentrations en Ni obtenues par MEB-EDX.

b. Analyses EDX des tissus foliaires

Les feuilles issues des trois plantes *P2* ont été enrobées d'un film d'aluminium et plongées dans l'azote liquide immédiatement après leur prélèvement. Après congélation dans l'azote liquide, les échantillons ont été lyophilisés. Des morceaux de feuilles ont été découpés à froid, à l'aide d'un microtome cryostat. Ces morceaux ont alors été disposés sur des supports et ont été revêtus de platine sous vide, afin de rendre les surfaces conductrices aux électrons. L'analyse EDX a été réalisée sur les cellules des épidermes supérieurs et inférieurs, ainsi que sur les cellules des parenchymes lacuneux et palissadiques, selon une coupe transversale. La résolution spatiale de la microanalyse est de l'ordre du micromètre. Pour chaque type de feuille et pour chaque tissu, neuf analyses EDX ont été réalisées sur neuf plages d'observation, séparées les unes des autres de quelques microns.

2.2.4 **Microscopies photonique et électronique à transmission, préparation des coupes fines et ultrafines de feuilles**

Une des deux plantes en petit pot contenant du sol contaminé (*P0*, cf. Tableau 14) a été sélectionnée pour la localisation du nickel dans les cellules foliaires grâce à des observations en microscopie électronique à transmission couplée à des analyses dispersives en énergie de rayon X. La méthode de préparation des échantillons diffère beaucoup selon les publications, mais celle-ci entraîne toujours une grande perte ou une redistribution du métal plus ou moins prononcée selon le mode de fixation et de préparation (Antosiewicz & Wierzbicka, 1999; Sarrat *et al.*, 2001). Le sulfure de sodium (Na_2S) est ainsi utilisé pour précipiter le nickel et ainsi limiter son lessivage lors de la fixation.

Une feuille de chaque catégorie d'âge a été sélectionnée (cf. § 2.1.3.1) et des échantillons ont été prélevés et préparés comme suit :

- Dix morceaux d'environ 6 à 8 mm² de surface ont été découpés, dans chaque feuille prélevée, autour d'une nervure.
- Fixation pendant 16 h au glutaraldéhyde. Selon les traitements, les morceaux sont placés dans des tubes à essai contenant :
 - Du glutaraldéhyde à 2,5% dans du tampon cacodylate
 - Du glutaraldéhyde à 2,5% dans du tampon cacodylate contenant 0,1% de sulfure de sodium (Na_2S)

- Pour cinq feuilles de chaque traitement, une post-fixation à l'osmium (solution d'acide osmique à 2% dans du cacodylate) d'une durée d'une heure a été réalisée.
- Après fixation et rinçage avec du tampon cacodylate, les échantillons ont été mis sous vide quelques minutes.
- Les échantillons ont été déshydratés par des bains successifs de concentrations en acétone croissantes (10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 95% (deux fois) et 100% (trois fois) pendant respectivement 5mn, 5mn, 5mn, 5mn, 15mn, 20mn, et 30 mn.
- Enfin, les échantillons sont imprégnés dans une résine Epoxy en remplaçant progressivement l'acétone par la résine pendant un minimum de 8 heures pour chaque étape.
- Les échantillons sont déposés dans des puits remplis de résine. Ils sont orientés pour faciliter leur coupe. La résine va polymériser pendant 16h à 60°C.
- Des coupes fines (200 nm d'épaisseur) et ultrafines (80 à 100 nm) ont été réalisées sur les échantillons polymérisés grâce à un ultra-microtome équipé d'un couteau diamant.

Les coupes fines ont été colorées par du bleu de toluidine afin d'accentuer les contrastes et permettre ainsi une observation plus aisée des tissus en microscopie photonique. Les coupes ultrafines ont été rendues conductrices par un revêtement de carbone sous vide afin d'être examinées en microscopie électronique à transmission (MET) couplé à l'analyse EDX.

3 Résultats

3.1 Caractéristiques écophysiologicalues de *Leptoplax emarginata* cultivée dans le sol contaminé ou non

Les biomasses et surfaces foliaires totales, ainsi que les biomasses moyennes des feuilles les plus développées, étaient très proches, que le sol soit contaminé ou non (Tableau 15). On note pourtant que l'assimilation de CO₂ était plus importante pour les plantes cultivées dans le sol contaminé (*P3*) avec une assimilation de $2,8 \pm 0,3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ contre $1,9 \pm 0,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pour les plantes dans le sol exempt de contamination (*P4*). Il n'y avait pas de différence significative de flux de transpiration entre les plantes *P3* et *P4*. Ainsi, l'efficacité d'utilisation de l'eau pour la photosynthèse (rapport AN/E) était près de deux fois plus élevée pour les plantes cultivées dans le sol contaminé que pour celles cultivées dans le sol non-contaminé.

Tableau 15. Moyennes des biomasses foliaires totales (BF), des surfaces foliaires totales (SF) et des surfaces foliaires spécifiques (SFS) de *P3* et *P4*. Pour les trois feuilles les plus développées : moyennes de leurs biomasses foliaires (BF max) et de leurs caractéristiques écophysiological (AN = assimilation en CO₂ par unité de surface foliaire, E = transpiration par unité de surface foliaire et EUE = efficacité de l'utilisation de l'eau pour la photosynthèse). Les nombres entre parenthèses correspondent aux erreurs standards des moyennes (pour les paramètres de croissance : n = 2; pour les biomasses et les caractéristiques écophysiological des feuilles les plus développées : n = 6). Pour chaque paramètre, les différences statistiques entre les différents groupes de plantes sont marqués par des lettres différentes (One way ANOVA, Bonferroni post Hoc test avec $\alpha = 0,05$ and $p < 0,05$).

Plantes	BF totale (g plante ⁻¹)	BF totale (% BA)	SF totale (cm ² plante ⁻¹)	SFS totale (cm ² g ⁻¹)	BF max (mg feuille ⁻¹)	AN (mmol m ⁻² s ⁻¹)	E (mmol m ⁻² s ⁻¹)	EUE (mmol CO ₂ mmol ⁻¹ H ₂ O)
<i>P4</i> Sol non contaminé	1,980 (0,456) a	87,3 (1,2) a	111 (35) a	55,0 (4,9) a	185,9 (10,6) a	1,899 (0,227) a	0,721 (0,109) a	2,763 (0,270) a
<i>P3</i> Sol contaminé	2,136 (0,132) a	86,5 (1,5) a	129 (7) a	60,4 (0,4) a	200,7 (8,9) a	2,841 (0,302) b	0,608 (0,073) a	4,867 (0,558) b



Figure 42. Photographie des plantes *P1* et *P2* à la cinquième semaine culture. Les plantes du dessus sont de gauche à droite *P1a*, *P1b* et *P1c*, les plantes du dessous sont *P2a*, *P2b* et *P2c*.

3.2 Distribution spatiale du nickel foliaire en fonction de l'âge et des caractéristiques écophysiological des feuilles

3.2.1 Profils de paramètres de croissance et d'échanges gazeux

Les six plantes utilisées pour l'étude (*P1a*, *P1b*, *P1c* et *P2a*, *P2b*, *P2c* : Tableau 14) étaient issues d'un « lot homogène » de plantules. Cependant, malgré un prélèvement une semaine plus tôt, les plantes *P1* avaient des biomasses foliaire plus importantes (Figure 43a et b).

Note : Cette différence de biomasse entre les plantes *P1* et *P2*, initialement de mêmes tailles (plantes issues d'un même lot de graines et sélectionnées lors de la préculture), peut s'expliquer (i) par le mode de pollinisation allogame de *L. emarginata* et (ii) par le lot de graines vieillissantes difficiles à faire germer. Ainsi, au sein d'un même lot on note une très grande diversité génétique, avec des plantes à la croissance plus ou moins rapide, ce phénomène étant amplifié par des germinations décalées dans le temps. Elle pourrait aussi s'expliquer par le fait que les ramifications, notamment, n'aient pas été prises en compte.

A noter que la plante *P2a* était légèrement plus imposante que les deux autres plantes *P2*, et que la plante *P1a* était la seule des six plantes à ne pas posséder de ramifications (Figure 42). L'évolution des surfaces foliaires spécifiques pour les plantes *P1* (Figure 43c) montre que les jeunes feuilles sont les plus fines, en particulier pour *P1b* et *P1c*, pour lesquelles nous observons aussi une surface foliaire spécifique élevée pour les vieilles feuilles. Notons que le rapport moyen de la biomasse racinaire sur la biomasse foliaire pour les trois plantes *P1* était de $0,17 \pm 0,03$ ce qui est très faible comparativement aux plantes cultivées dans du sable (chapitre 1) où les rapports moyens étaient aux alentours de 0,4 en fin de culture.

On note aussi des distributions spatiales d'humidité foliaire (Figure 43d et e) analogues à celles des surfaces foliaires spécifiques (Figure 43c) avec un minimum pour les feuilles matures et des maximums pour les feuilles les plus vieilles et les plus jeunes, ces distributions étant moins prononcées pour la plante *P1a*. Par ailleurs, on observe une assimilation en CO₂ (AN) maximale pour les feuilles matures (Figure 44a et b), alors qu'un gradient de flux de transpiration (E) est observé des vieilles feuilles aux plus jeunes (Figure 44c et d). Les profils d'efficacité d'utilisation de l'eau pour la photosynthèse (rapport AN/E) suivent la même évolution que l'assimilation en CO₂, avec une efficacité maximale pour les feuilles matures, de valeur équivalente pour les plantes *P1* et *P2* (Figure 44e et f).

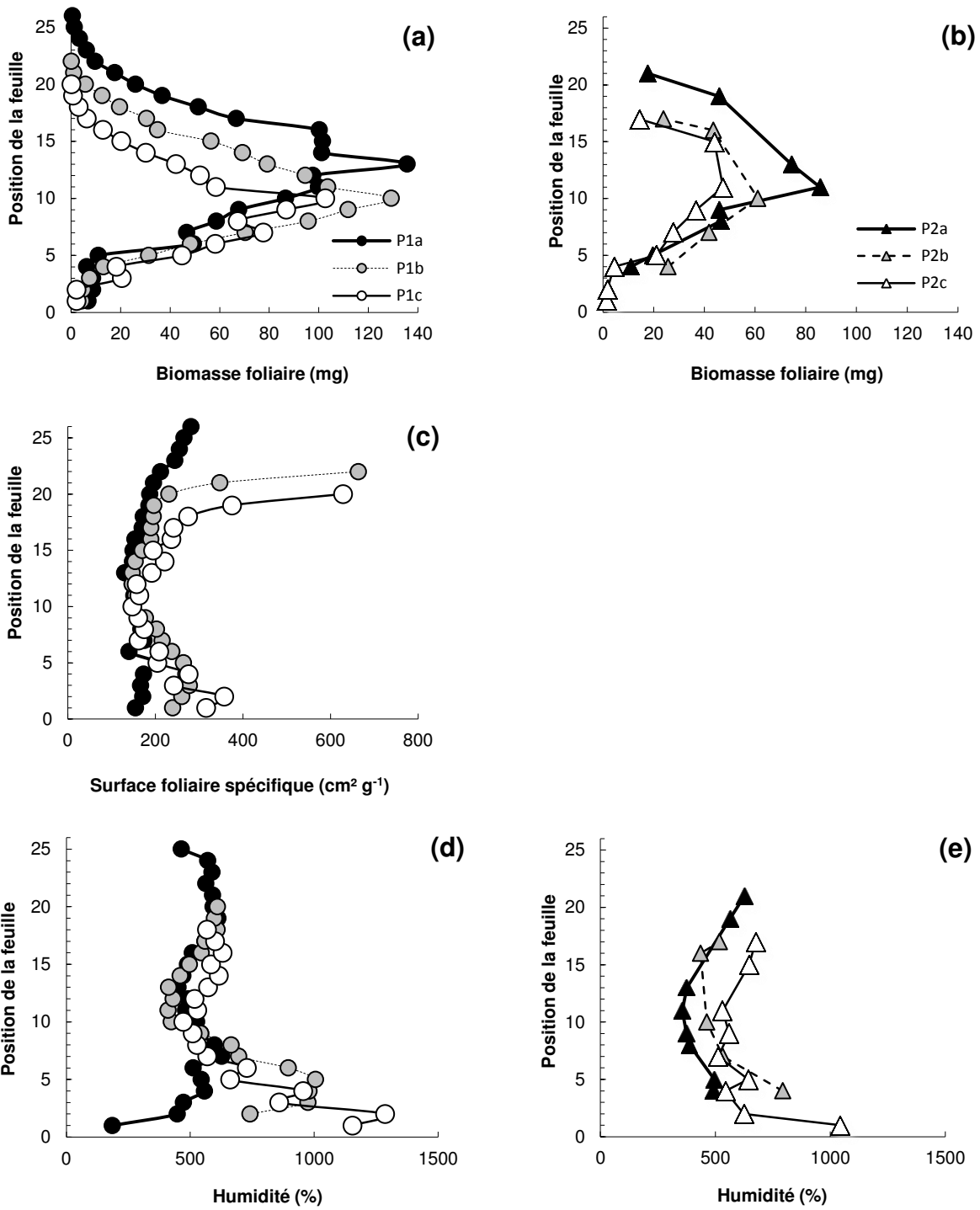


Figure 43. Profils des biomasses foliaires sèches pour *P1* (a) et *P2* (b), de surfaces foliaires spécifiques pour *P1* (c) et *P2* (d) et d'humidités foliaires pour les hyperaccumulateurs *P1* (e) et *P2* (f) (voir Tableau 14). La position de la feuille sur la tige est donnée en ordonnée.

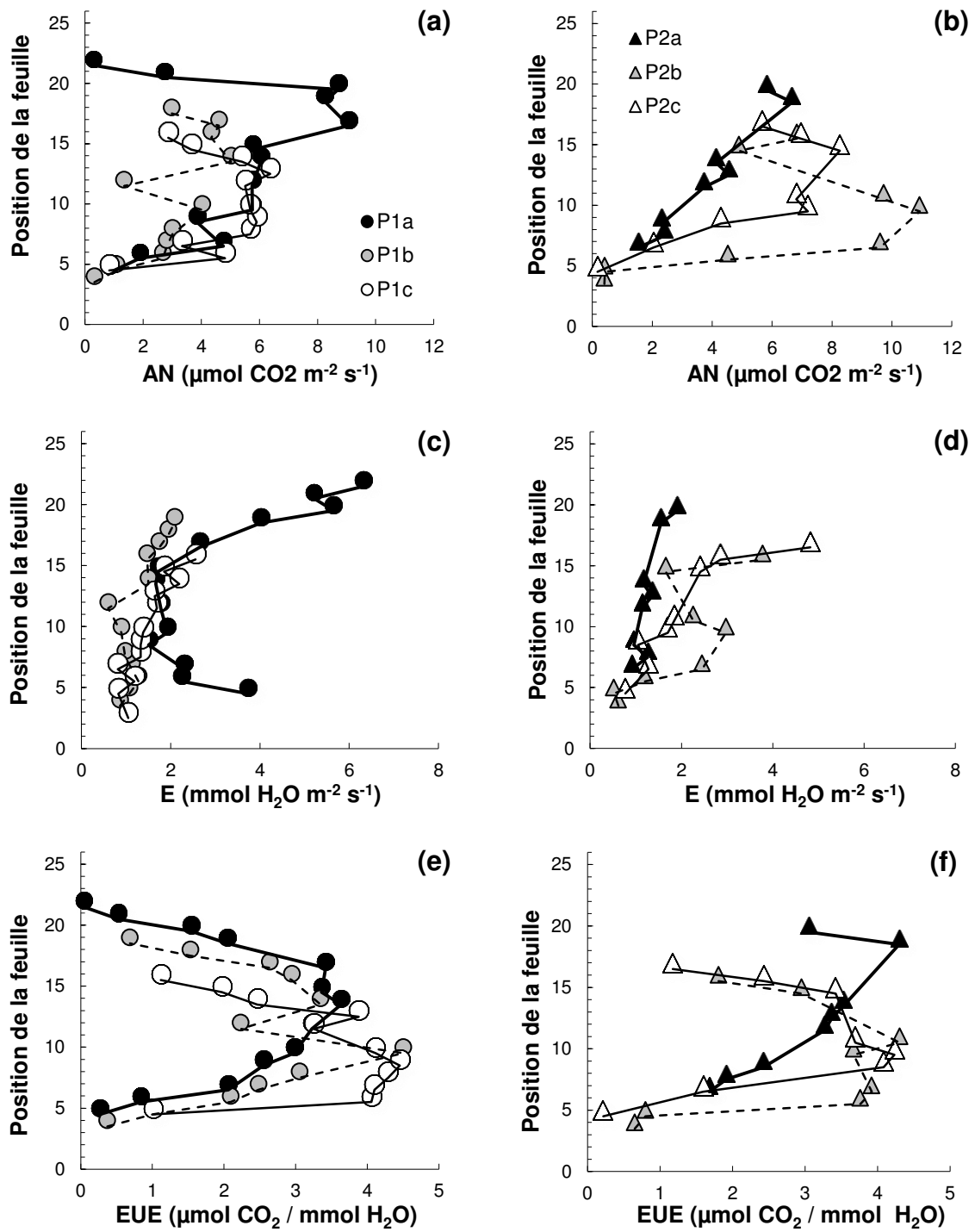


Figure 44. Profils d'assimilation du CO_2 (AN) pour P1 (a) et P2 (b), de flux de transpiration (E) pour P1 (c) et P2 (d) et d'efficacité d'utilisation de l'eau pour la photosynthèse (EUE) pour P1 (e) et P2 (f) (voir Tableau 14).

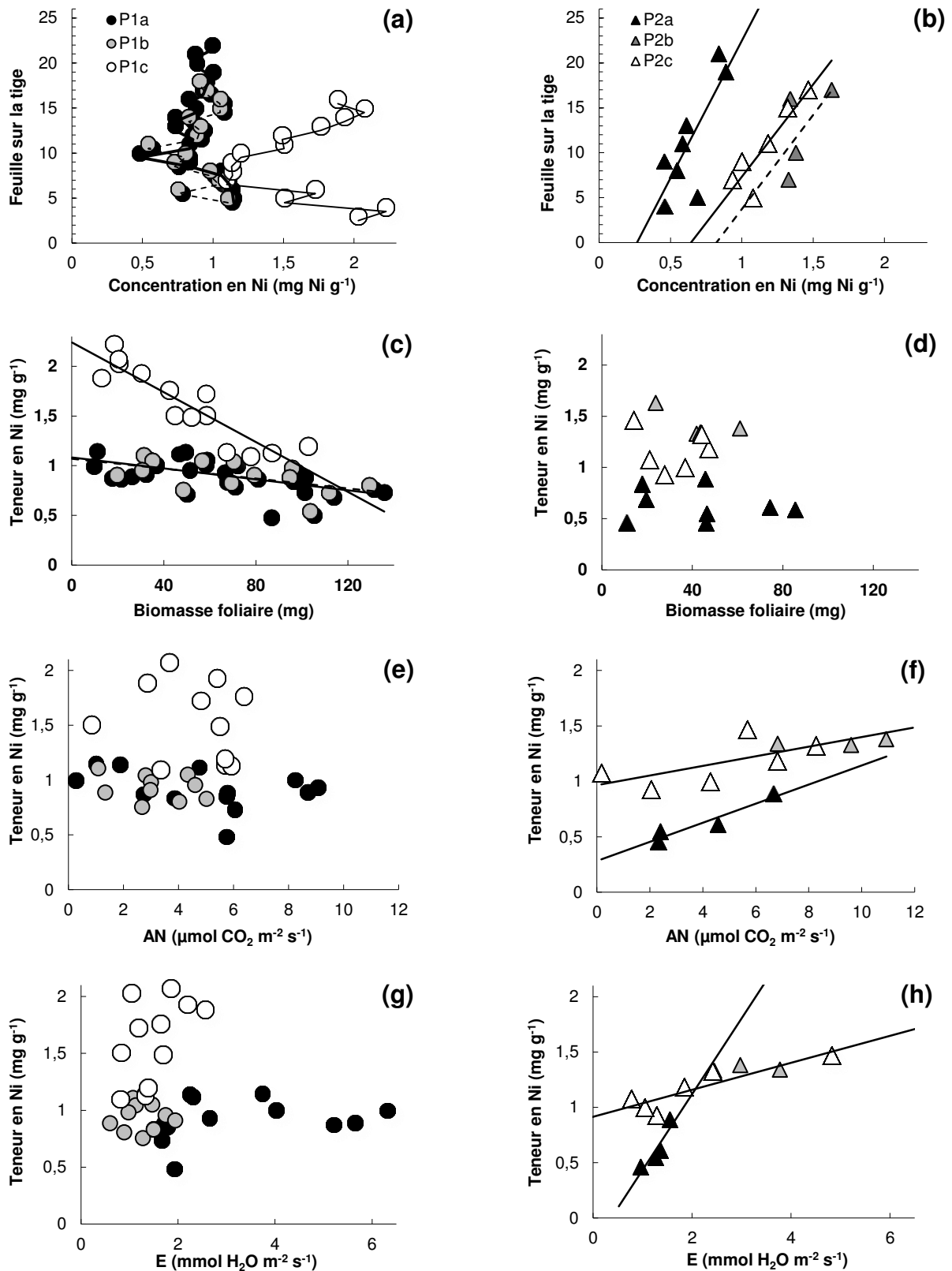


Figure 45. Profils des teneurs en Ni foliaire pour les plantes P1 (a) et P2 (b). Relations entre les teneurs en Ni foliaire et la biomasse foliaire sèche pour les plantes P1 (c) et P2 (d), l'assimilation du CO₂ (AN) pour les plantes P1 (e) et P2 (f), et le flux de transpiration (E) pour les plantes P1 (g) et P2 (h) (voir Tableau 14).

3.2.2 Distribution spatiale du nickel foliaire

On observe un gradient positif des concentrations en nickel foliaire, des vieilles feuilles aux plus jeunes, pour les plantes *P2* (Figure 45b). Un léger gradient positif des concentrations en nickel foliaire, des feuilles matures aux plus jeunes, est observable pour les plantes *P1a* et *P1b*, ce gradient étant plus prononcé pour *P1c*, dont les teneurs étaient très nettement supérieures aux deux autres (Figure 45a). Pour ces trois plantes, en particulier pour *P1c*, les vieilles feuilles contenaient autant, voire plus, de nickel que les jeunes feuilles. Notons que les plantes *P1c*, *P2b* et *P2c* ont dépassé le seuil d'hyperaccumulation du nickel (1 mg Ni l^{-1}) défini par Brooks *et al.* 1977.

Par ailleurs, les teneurs en Ni foliaire étaient corrélées négativement avec les biomasses foliaires sèches pour les plantes *P1* (Figure 45c), les feuilles les plus petites étant les plus concentrées en Ni. A l'opposé, aucune corrélation n'est identifiée pour les plantes *P2* (Figure 45d). Pour les plantes *P1*, il n'y a aucune corrélation entre la teneur en Ni foliaire et l'assimilation de CO_2 (Figure 45e) ou le flux de transpiration (Figure 45g). Pour les plantes *P2a* et *P2c*, on note par contre une corrélation positive entre les teneurs en Ni foliaire et l'assimilation de CO_2 (Figure 45f) ou le flux de transpiration (Figure 45h). Ainsi pour ces deux plantes, les feuilles qui transpirent et assimilent le plus, sont les feuilles les plus concentrées en nickel.

3.3 Observations des feuilles de *Leptoplax emarginata* en microcopies photoniques et électroniques

3.3.1 Densités de stomates

Les densités stomatiques ont été mesurées sur les plantes *P2* (Tableau 14). L'analyse a révélé que *Leptoplax emarginata* était une espèce amphistomatique (présence de stomates sur les deux faces de la feuille). On note qu'il y a autant de stomates sur la face inférieure que sur la face supérieure (Figure 46), avec cependant, une légère tendance à ce qu'il y ait plus de stomates sur la face inférieure.

La densité stomatique augmente inversement avec l'âge des feuilles (Figure 46 et Figure 47) avec une densité aux alentours de 100 stomates mm^{-2} pour les feuilles les plus vieilles et 300 stomates mm^{-2} pour les plus jeunes. Comme attendu, il existe donc une corrélation positive entre le flux de transpiration, E et la densité de stomates, les feuilles les plus jeunes ayant les densités de stomates les plus élevées, ce qui explique leurs transpirations maximales par unité de surface foliaire (Figure 48).

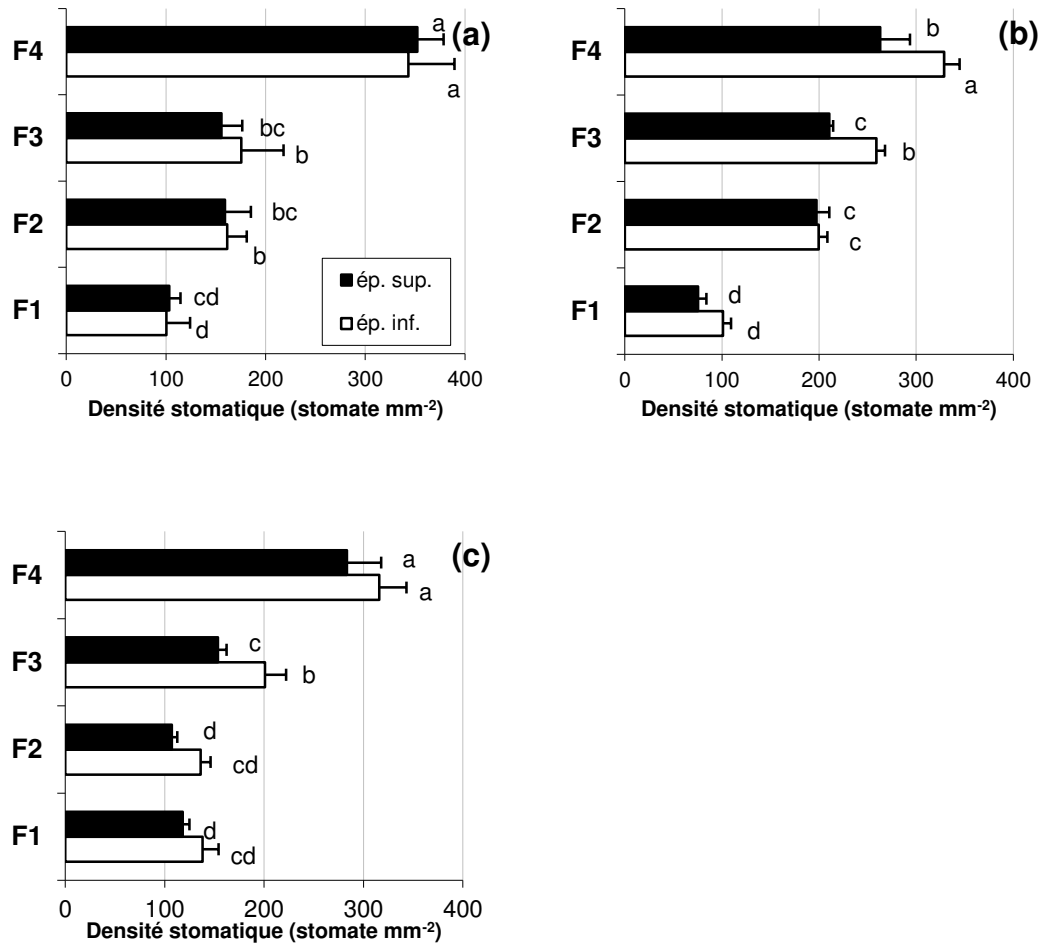


Figure 46. Densités de stomates sur les faces inférieures (ép. Inf.) et supérieures (ép. Sup.) des quatre catégories de feuilles des hyperaccumulateurs *P2a* (a), *P2b* (b) et *P2c* (c) (voir Tableau 14). La présence de lettres différentes indique une différence statistique (ANOVA 2 facteurs (âge des feuilles et épiderme), test de Tukey, $\alpha = 0,05$; $p < 0,05$).

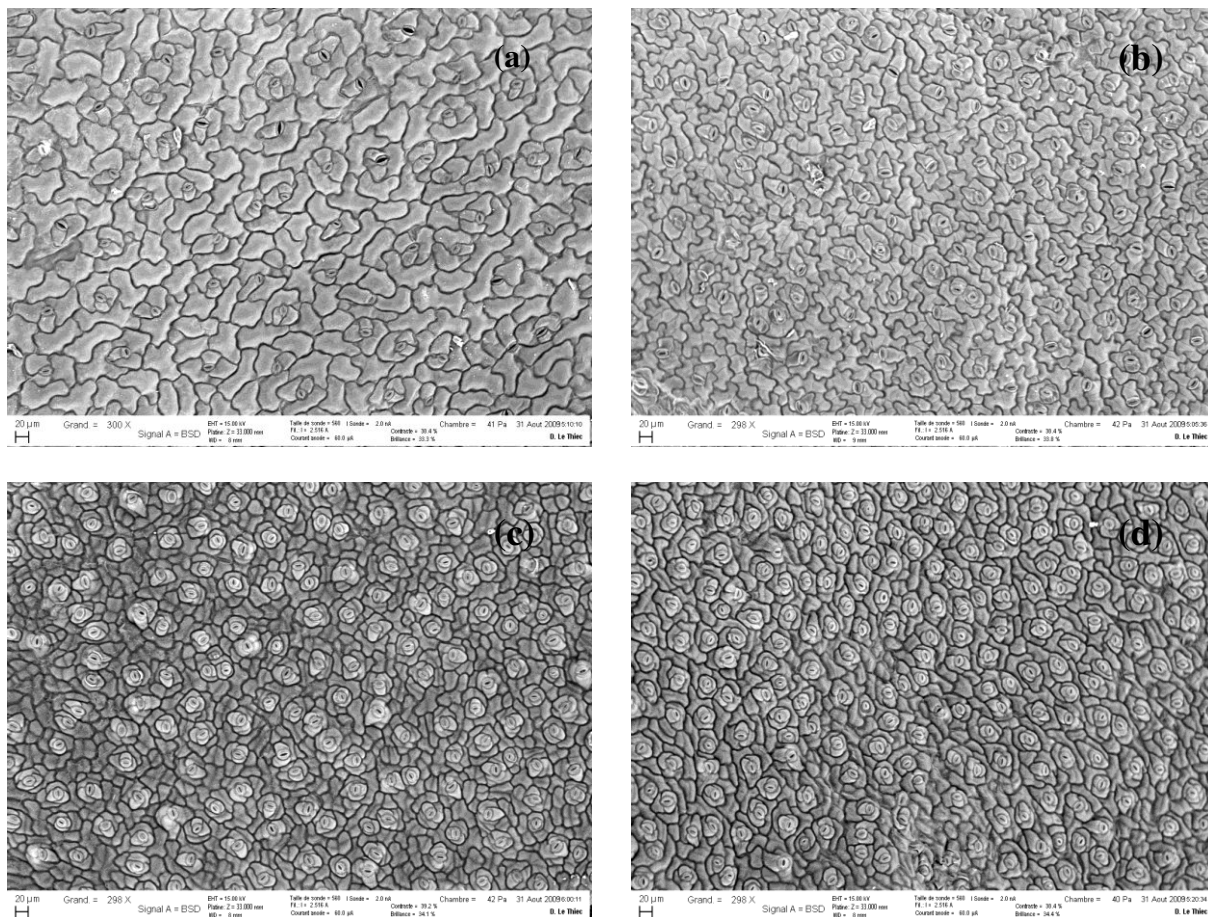


Figure 47. Photographies MEB des faces inférieures des feuilles avant repiquage *F1* (a), des vieilles feuilles *F2* (b), des feuilles matures *F3* (c) et des jeunes feuilles *F4* (d) de la plante *P1a* (voir Tableau 14).

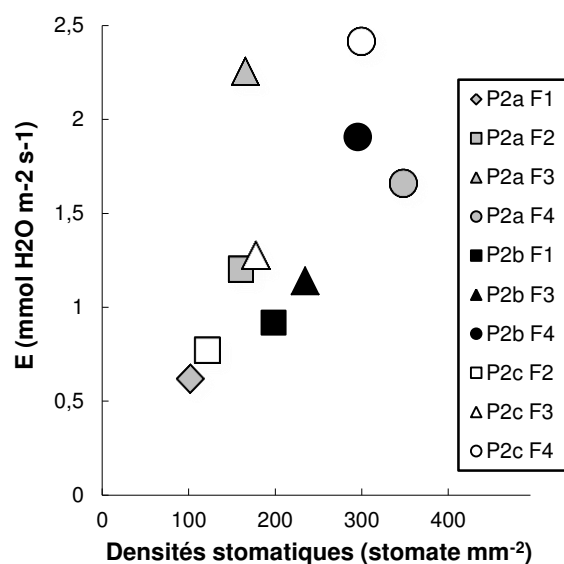


Figure 48. Relation entre le flux de transpiration, E et la densité stomatique, pour chacune des quatre catégories de feuille (*F1*, *F2*, *F3*, *F4*) des trois plantes *P2* (Tableau 14).

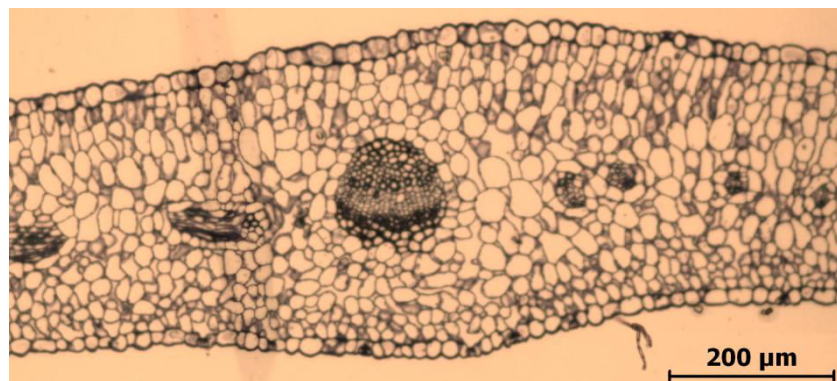
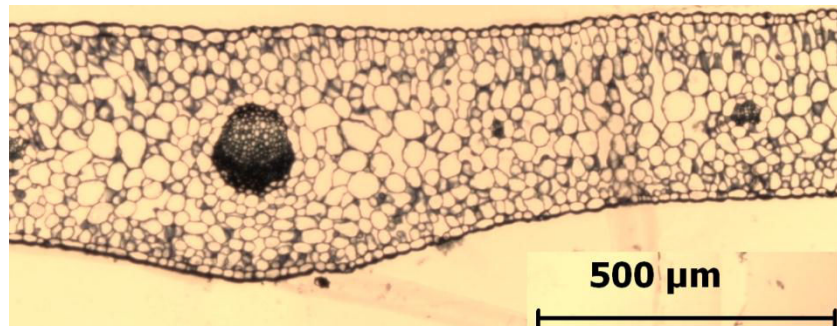
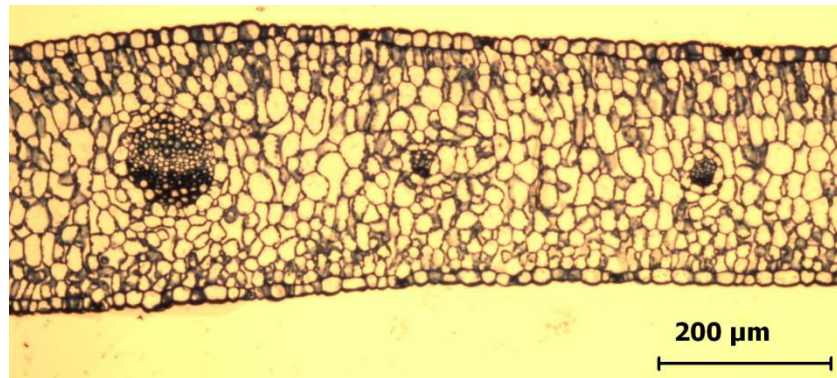
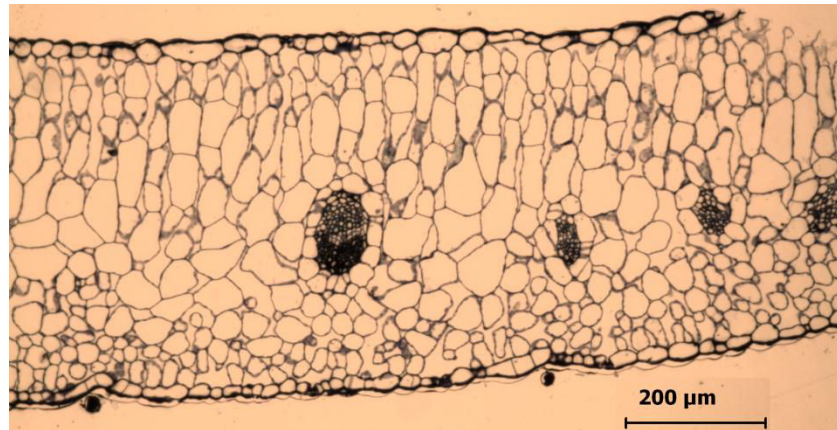


Figure 49. Photographies en microscopie photonique de coupes fines transversales, colorées au bleu de toluidine, pour chaque catégorie de feuille de la plante *P0* (voir Tableau 14). De haut en bas : *P0-F1* ; *P0-F2* ; *P0-F3* ; *P0-F4*.

3.3.2 Coupes transversales de feuilles

Les photographies de quelques coupes fines réalisées sur les échantillons de feuilles de la plante *P0* (Tableau 14) sont répertoriées dans la Figure 49. L'observation de toutes les coupes a révélé que les feuilles possédaient toute la même épaisseur avec peut être une légère tendance à ce que les feuilles les plus vieilles soient les plus épaisses. Nous avons vu que les parenchymes étaient difficilement différenciables, mais qu'il y avait tout de même une différence de morphologie, avec des cellules allongées ou rondes, pour les parenchymes palissadiques et lacuneux, respectivement. Nous avons également noté qu'il semblait y avoir plus de chloroplastes dans le parenchyme palissadique que dans le parenchyme lacuneux.

3.4 Distribution spatiale du nickel foliaire en relation avec les éléments majeurs

3.4.1 Localisation du nickel et des éléments majeurs dans les tissus foliaires (MEB-EDX)

Les analyses ont été réalisées sur les quatre catégories de feuilles des plantes *P2* (voir Tableau 14). Mis à part pour la jeune feuille (*F4*) de la plante *P2b*, on voit que le nickel était majoritairement localisé dans les épidermes inférieurs et supérieurs (Figure 50a, c et e). On note des concentrations en Ni dans les épidermes souvent de cinq à neuf fois supérieures à celles des parenchymes. La concentration moyenne en Ni dans les tissus épidermiques était corrélée positivement avec la concentration en nickel des feuilles choisies, les épidermes étant près de huit fois plus concentrés en nickel que les feuilles (résultats non montrés), ainsi qu'avec l'âge des feuilles. Ainsi, la concentration en Ni croissait des feuilles les plus vieilles aux feuilles les plus jeunes. Il n'y avait pas de différences significatives entre les deux épidermes mais on observe tout de même une tendance à une accumulation préférentielle dans les épidermes supérieurs.

Pour la localisation du soufre, nous observons des profils similaires à ceux du Ni, avec une tendance à une accumulation préférentielle dans les épidermes (Figure 50b, d et f) mais une différenciation des teneurs en S entre les épidermes et les parenchymes moins prononcée que celle des teneurs en Ni. Mis à part pour la plante *P2a*, nous n'observons pas d'effet de l'âge sur l'accumulation du soufre. Les teneurs en soufre étaient légèrement supérieures à celles du

nickel avec des teneurs aux alentours de 1 – 2 %. Alors que pour le magnésium il y avait également une tendance à ce qu'il soit accumulé dans les épidermes (Figure 51a, c et e), la distribution du calcium (Figure 51b, d et f) est plus complexe, celui-ci se répartissant généralement de façon indifférente entre les épidermes et les parenchymes (exemples : feuilles *F1*, *F2* et *F3* de la plante *P2a*, Figure 51b) alors que dans d'autres cas, le calcium était préférentiellement localisé dans les parenchymes (par exemple : *P2a-F4*, Figure 51b; *P1c*, Figure 51f). Le calcium était accumulé dans les tissus épidermiques ou les parenchymes à hauteur de 2 % pour la plante *P2a* et 4-5 % pour les plantes *P2b* et *P2c*, alors que les teneurs en Mg étaient d'environ 1 %. Pour ces deux éléments, nous n'avons pas observé d'effet de l'âge sur leurs concentrations. Les concentrations en phosphore étaient de l'ordre de 1 à 2 % (données non montrées). Il ne semblait pas y avoir de différences entre les épidermes et les parenchymes, mais nous avons noté que les vieilles feuilles étaient plus concentrées que les jeunes feuilles. Pour le potassium, nous avons noté des teneurs entre 3 et 5 % avec une tendance à ce que les parenchymes lacuneux soient plus concentrés (données non montrées).

3.4.2 Relations entre le nickel et les principaux éléments minéraux

3.4.2.1 Relations entre le nickel et les éléments minéraux majeurs à l'échelle de la feuille

Nous avons regroupé les concentrations en Ni et en éléments majeurs des pastilles des jeunes et vieilles feuilles des plantes *P4* et *P5*, et des plantes restantes de la culture de *P1* et *P2* (voir description des différentes modalités dans le Tableau 14), dans le Tableau 16. Ces données combinées révèlent que les teneurs en Ni augmentaient avec les concentrations croissantes de Ni dans le substrat et que les concentrations en Ni obtenues par MEB-EDX et ICP-AES étaient fortement corrélées entre elles ($p < 0,001$) (Tableau 16). Les jeunes feuilles sont plus concentrées en Ni que les vieilles (même si il n'y a pas de différence statistique pour les plantes *P4* et *P5*), comme observé sur les profils du paragraphe précédent. Pour les concentrations en soufre, les jeunes feuilles étaient significativement plus concentrées que les vieilles, que ce soit pour les hyperaccumulateurs cultivés sur du sol contaminé ou non. Pour chaque catégorie de feuilles, on note une augmentation de la concentration en soufre corrélée à l'augmentation de la concentration en nickel, des hyperaccumulateurs cultivés sur du sol non-contaminé aux hyperaccumulateurs cultivés sur du sable à solution riche en Ni.

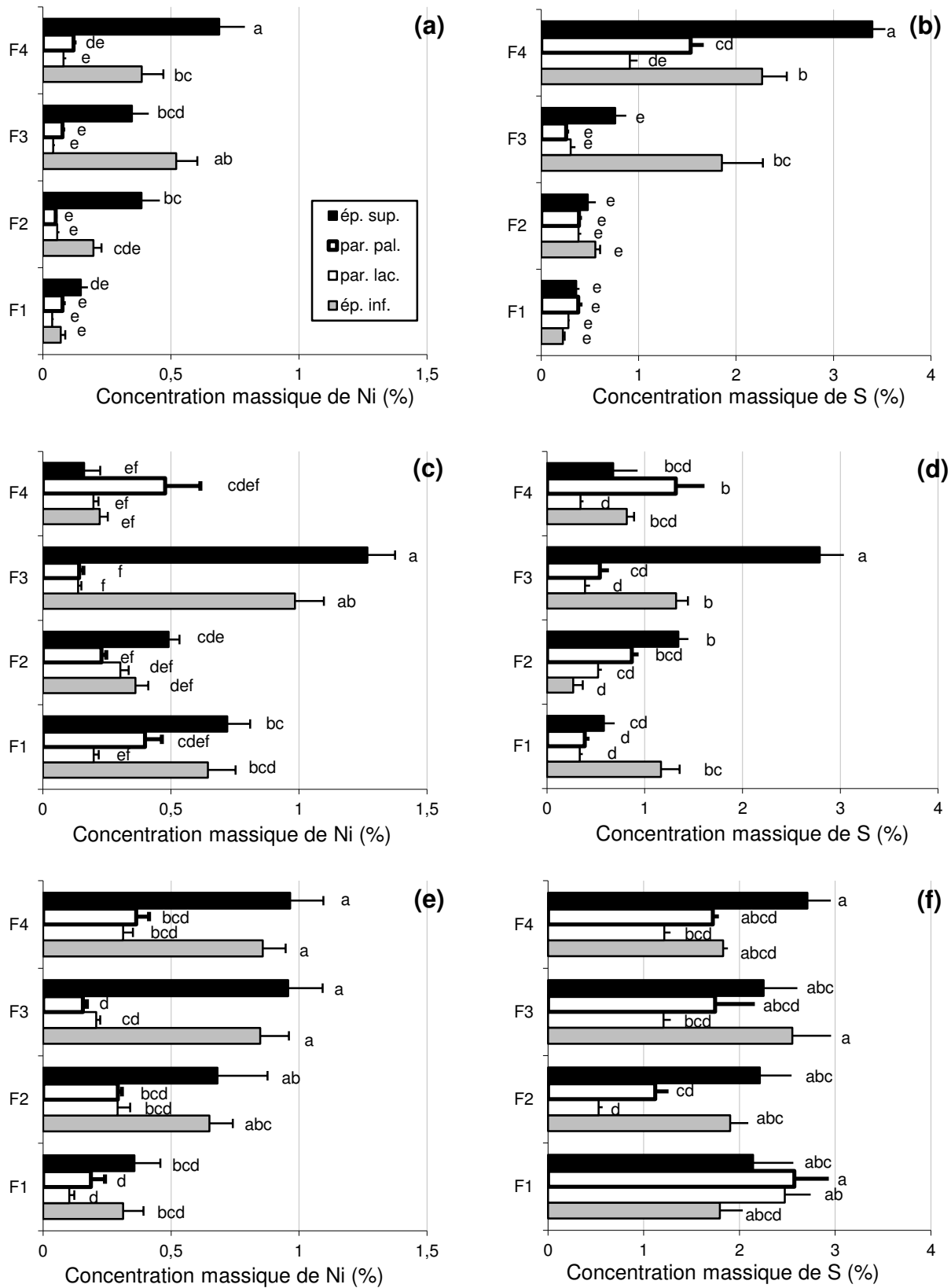


Figure 50. Profils des concentrations massiques en Ni dans les épidermes et les parenchymes pour les plantes *P2a* (a), *P2b* (c) et *P2c* (e) (voir Tableau 14). Idem pour le soufre dans les plantes (*P2a* (b), *P2b* (d) et *P2c* (f) (voir Tableau 14). La présence de lettres différentes indique une différence statistique (ANOVA 2 facteurs (âge des feuilles et type de tissu), test de Tukey, $\alpha = 0,05$; $p < 0,05$).

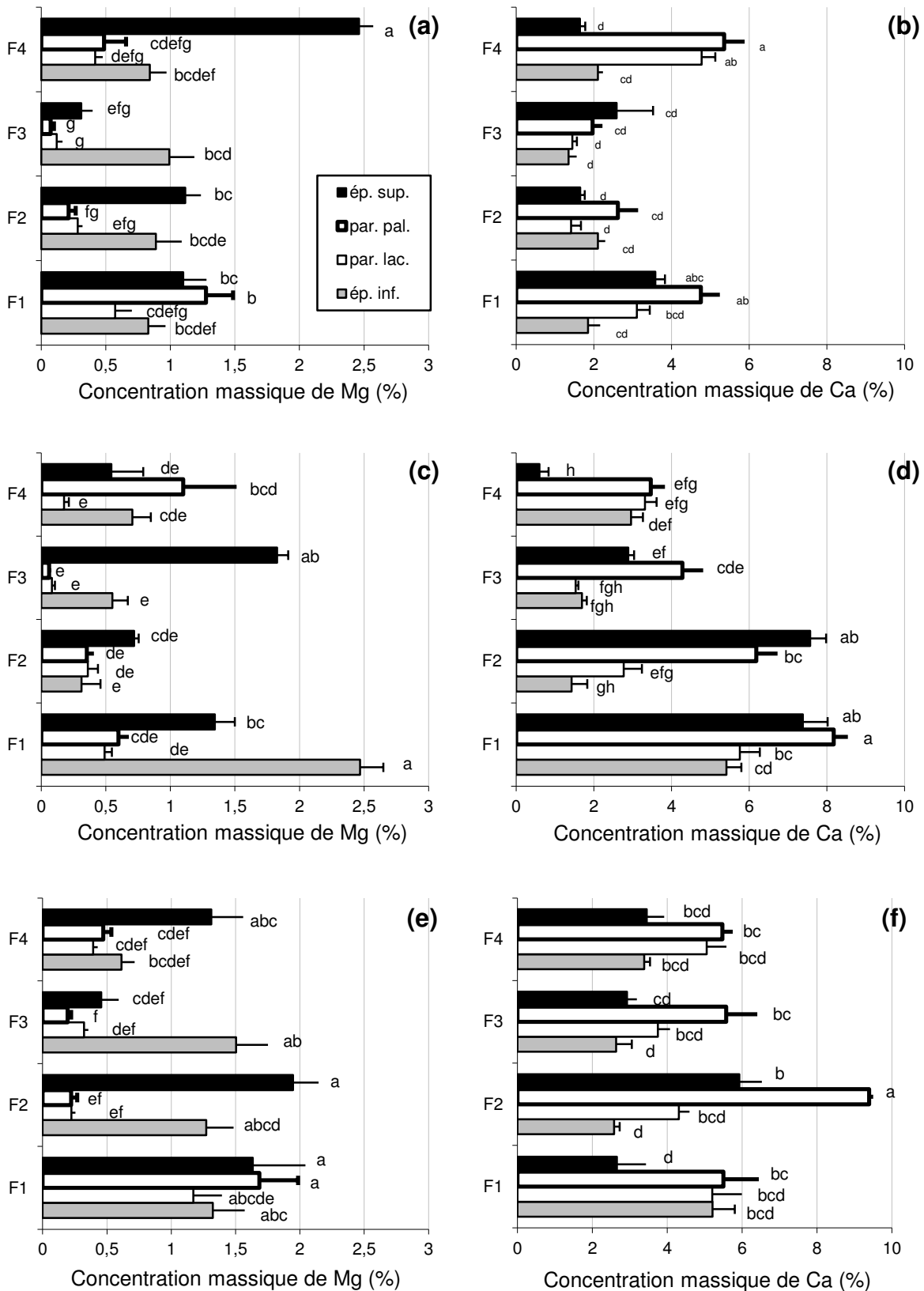


Figure 51. Profils des concentrations massiques en Mg dans les épidermes et les parenchymes pour les plantes *P2a* (a), *P2b* (c) et *P2c* (e) (voir Tableau 14). Idem pour le Ca dans les plantes *P2a* (b), *P2b* (d) et *P2c* (f). La présence de lettres différentes indique une différence statistique (ANOVA 2 facteurs (âge des feuilles et type de tissu), test de Tukey, $\alpha = 0,05$; $p < 0,05$).

Nous observons qu'à l'opposé des teneurs en Ni foliaire, les teneurs en Mg et Ca dans les feuilles étaient plus élevées chez les plantes cultivées sur le sol (contaminé ou non) que chez les plantes cultivées sur le sable contaminé. Mis à part pour deux plantes, les teneurs en Ca et Mg dans les jeunes feuilles étaient semblables à celles dans les vieilles feuilles. La matrice de corrélation inter-élémentaires sur l'ensemble des poudres de feuilles (Tableau 17) montre ainsi une corrélation positive entre le Ni et le S, et des corrélations négatives entre le Ni et à la fois Ca et Mg. Nous avons aussi identifié une corrélation positive entre Ca et Mg.

Les analyses de phosphore (Tableau 16) ont mis en évidence des concentrations de ce dernier plus élevées sur les milieux contaminés en Ni (plantes *P1-P2* et *P5*). Nous observons le contraire avec le potassium qui est plus concentré dans les feuilles des plantes cultivées sur le milieu non-contaminé. Pour ce dernier, il y a également un effet de l'âge de la feuille visible avec du K préférentiellement accumulé dans les vieilles feuilles. La matrice de corrélation inter-élémentaires (Tableau 17) met donc en évidence une corrélation positive entre les teneurs en Ni et P, et une corrélation négative entre les teneurs en Ni et K.

3.4.2.2 Relations entre le nickel et les éléments minéraux majeurs à l'échelle des tissus

Des matrices de corrélations entre le Ni et les principaux éléments minéraux (S, Mg, Ca et K) présents dans les quatre tissus ont été réalisées pour chaque plante et pour chaque feuille, ce qui nous a permis d'étudier les inter-relations dans les tissus des feuilles les plus vieilles aux feuilles les plus jeunes (Figure 52). Nous voyons que la corrélation positive entre la teneur en nickel et la teneur en soufre (déjà observée précédemment sur les poudres d'étalonnage) est particulièrement significative pour les feuilles matures (*F3*) et les jeunes feuilles (*F4*) (Figure 52a). Pour le magnésium, la corrélation positive avec la teneur en nickel est toujours excellente, mis à part pour *P2c-F4* et *P2a-F1* où il n'y a pas de corrélation (Figure 52b). Il n'y pas de corrélation entre le Ni et le calcium, mis à part une corrélation négative pour les jeunes feuilles de deux des plantes (*P2a* et *P2c*) (Figure 52c). Enfin, entre le potassium et le Ni, il n'existe une corrélation positive que pour les jeunes feuilles de *P2a* et *P2c* (Figure 52d). Dans l'ensemble on note aussi des gradients d'évolution de ces coefficients de corrélation entre le Ni et un autre élément minéral, des feuilles les plus vieilles aux plus jeunes où ces corrélations, positives ou négatives, sont de loin les plus significatives.

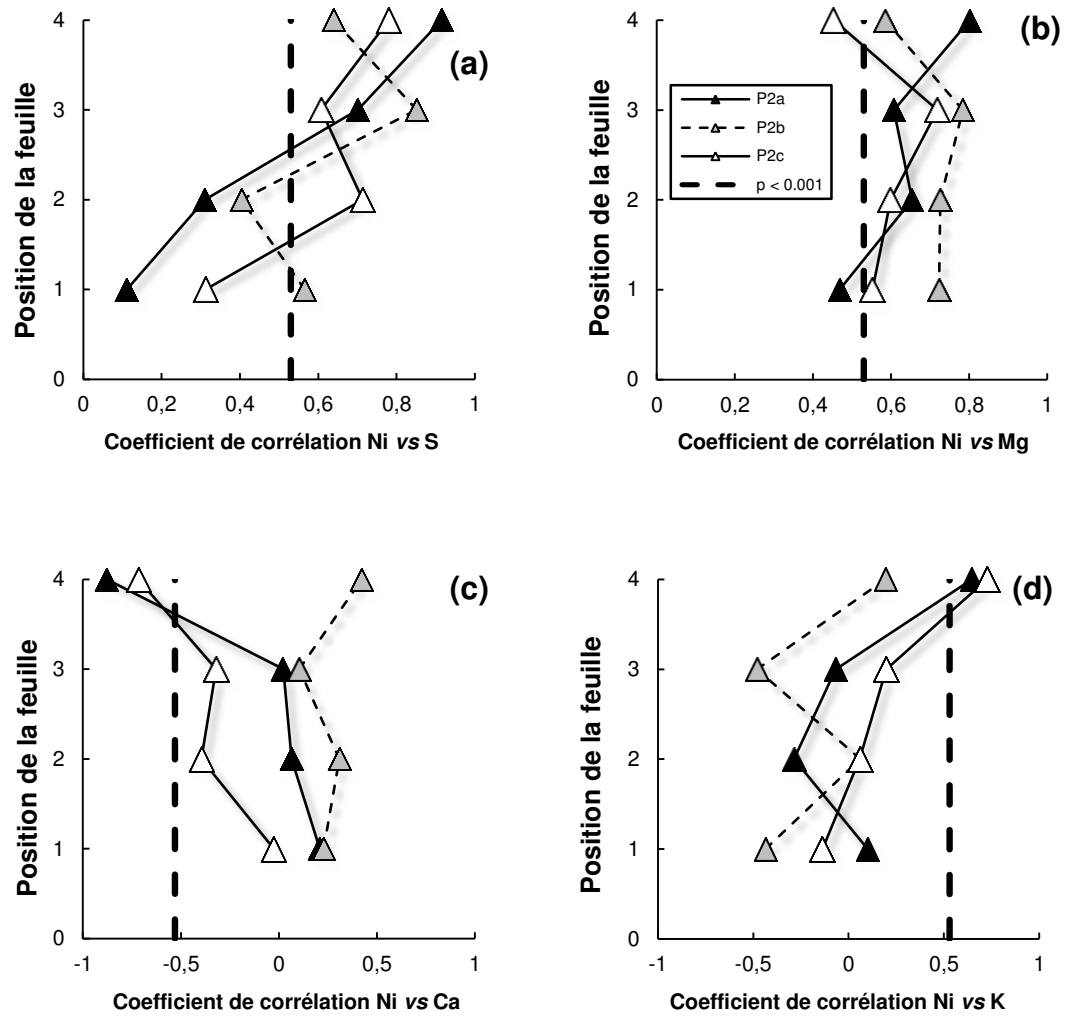


Figure 52. Coefficients de corrélation entre le Ni et (a) le soufre, (b) le magnésium, (c) le calcium et (d) le potassium pour les plantes P2. La limite pointillée représente le seuil de significativité de la corrélation ($p < 0,001$).

Tableau 16. Moyennes des concentrations des principaux éléments minéraux présents dans les feuilles déterminées par analyses EDX sur des pastilles de feuilles broyées comprimées; la concentration en nickel a été déterminée à la fois en MEB-EDX et en ICP-AES, avec une corrélation positive très significative (Ni MEB-EDS = 1,226 Ni ICP-AES, $r = 0,994$, $p < 0,001$). Les nombres entre parenthèses correspondent aux erreurs standards des moyennes ($n = 9$). Pour chaque paramètre et chaque type de milieu les différences statistiques entre les jeunes et les vieilles feuilles sont marquées par des lettres différentes (test de Student avec $t < 0,05$).

Plantes	Feuilles	Ni ICP-AES (mg g ⁻¹)	Ni MEB-EDX (mg g ⁻¹)	S MEB-EDX (mg g ⁻¹)	Mg MEB-EDX (mg g ⁻¹)	Ca MEB-EDX (mg g ⁻¹)	P MEB-EDX (mg g ⁻¹)	K MEB-EDX (mg g ⁻¹)
<i>P4</i>	jeunes	0,0187	0,02 (0,02) a	5,18 (0,11) b	2,73 (0,12) a	21,43 (1,34) a	3,20 (0,14) a	30,76 (0,73) a
Sol non contaminé	vieilles	0,0135	-0,02 (0,03) a	3,93 (0,08) a	2,98 (0,09) a	24,68 (0,56) a	3,05 (0,18) a	35,64 (1,53) a
<i>P1-P2</i>	jeunes	1,8859	2,56 (0,11) b	7,31 (0,20) b	2,78 (0,13) b	23,55 (1,01) a	4,04 (0,13) a	25,28 (0,90) a
Sol contaminé	vieilles	1,4021	1,91 (0,09) a	4,57 (0,12) a	2,22 (0,12) a	21,75 (0,82) a	8,16 (0,15) b	36,83 (1,20) b
<i>P5</i>	jeunes	7,3563	9,63 (0,45) a	9,55 (0,20) b	1,75 (0,05) a	17,19 (0,52) b	7,20 (0,15) a	18,94 (0,93) a
Sable contaminé	vieilles	7,5884	8,63 (0,37) a	5,95 (0,12) a	1,68 (0,11) a	14,28 (0,47) a	8,23 (0,26) b	25,01 (0,95) b

Tableau 17. Principales corrélations inter-élémentaires calculées sur l'ensemble des pastilles de feuilles broyées analysées en MEB-EDX ($n = 36$). Les chiffres surlignés correspondent aux coefficients de corrélation les plus significatifs ($p < 0,001$ pour $R > 0,53$), avec en vert une corrélation positive significative entre deux éléments et en jaune une corrélation négative entre deux éléments.

	C	O	Na	Mg	Al	Si	P	S	Cl	K	Ca	Mn	Ni
C	1												
O	0,12	1											
Na	-0,06	0,28	1										
Mg	-0,33	0,65	0,10	1									
Al	0,37	0,06	-0,17	-0,20	1								
Si	0,54	0,42	-0,06	-0,02	0,41	1							
P	0,65	-0,34	-0,10	-0,78	0,33	0,42	1						
S	0,28	-0,62	-0,27	-0,45	0,17	-0,27	0,27	1					
Cl	0,05	0,81	0,20	0,60	0,08	0,41	-0,31	-0,70	1				
K	-0,08	0,72	0,23	0,48	-0,09	0,34	-0,21	-0,87	0,87	1			
Ca	-0,22	0,67	0,11	0,85	-0,08	0,18	-0,64	-0,40	0,71	0,47	1		
Mn	0,12	-0,24	-0,30	-0,23	-0,07	-0,01	0,15	0,30	-0,35	-0,33	-0,15	1	
Ni	0,30	-0,80	-0,28	-0,80	0,15	-0,14	0,70	0,73	-0,82	-0,75	-0,77	0,36	1

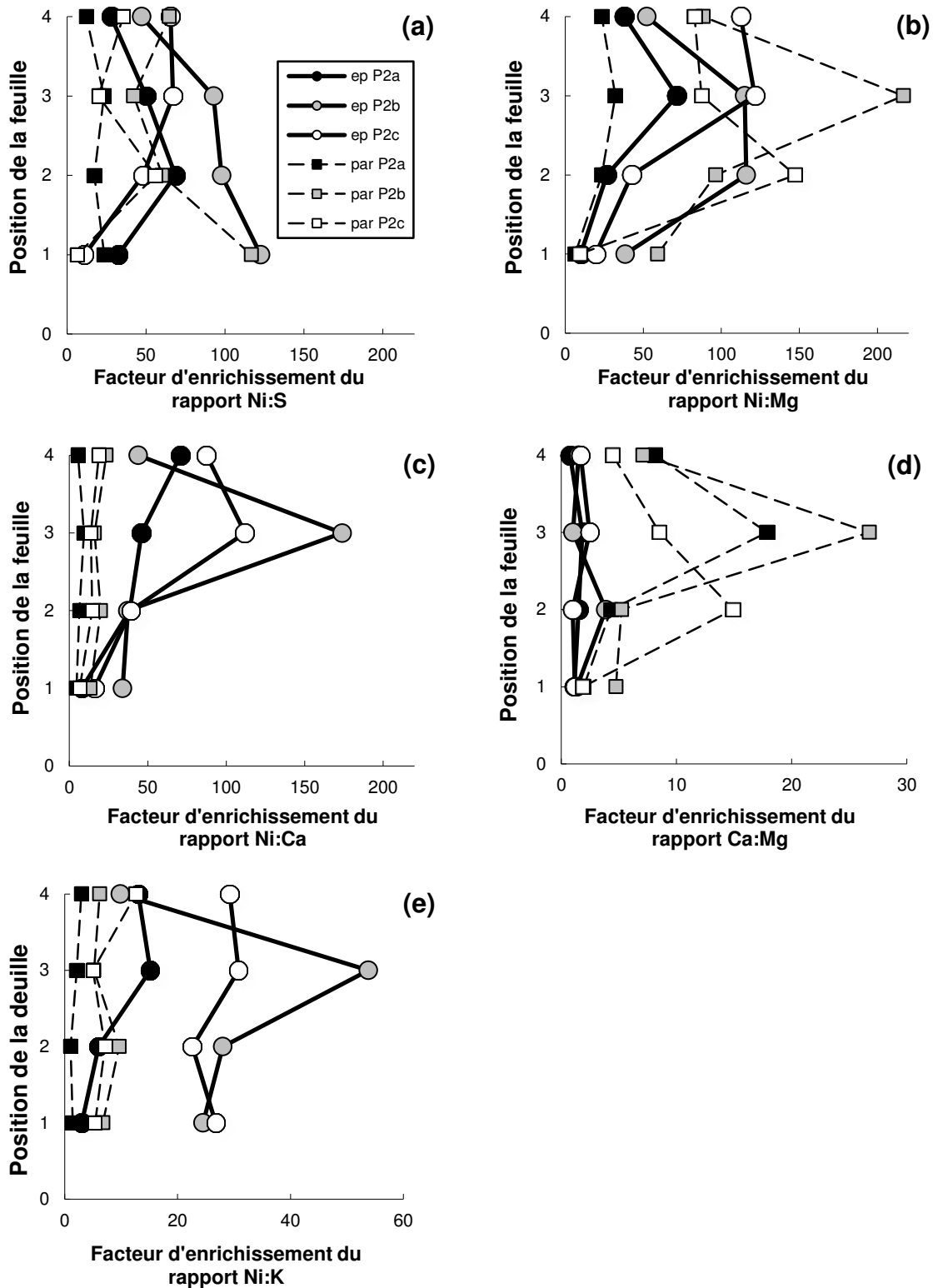


Figure 53. Facteurs d'enrichissement des rapports de concentration entre éléments (rapport des concentrations dans les épidermes ou les parenchymes pour deux éléments, sur le rapport des concentrations dans la solution du sol pour ces deux mêmes éléments) pour les plantes *P2*. Les deux épidermes ont été regroupés (ep), de même pour les parenchymes (par). Les concentrations dans la solution du sol ont été estimées à partir des analyses en chromatographie ionique des ions majeurs dans la solution du sol des pots témoins sans plantes du chapitre 2, où les conditions de cultures étaient similaires.

Les facteurs d'enrichissement des rapports de concentration entre éléments (rapport des concentrations dans les tissus pour deux éléments sur le rapport des concentrations dans la solution du sol pour ces mêmes éléments) sont représentés dans la Figure 53. Mis à part quelques cas particuliers, tous les facteurs d'enrichissement relatifs au Ni étaient supérieurs à 1, démontrant une accumulation largement préférentielle du nickel par rapport aux autres minéraux. On note une tendance à ce que ces facteurs soient plus élevés pour les épidermes que pour les parenchymes, en particulier pour Ca (Figure 53c) et K (Figure 53e). On note les facteurs d'enrichissement les plus élevés dans les épidermes pour les rapports Ni:Ca (de 39 à 174).

Il ne semble pas y avoir d'effet de l'âge de la feuille sur le facteur d'enrichissement des rapports Ni:S (Figure 53a), avec des facteurs pour les épidermes allant de 48 à 93, contrairement aux rapports Ni:Mg (Figure 53b) où l'on note les rapports les plus élevés dans les feuilles matures (*F3*). Nous observons la même chose dans les épidermes, pour les rapports Ni:Ca (Figure 53c) et Ni:K (Figure 53e), où les facteurs d'enrichissement sont maximales pour les feuilles *F3*. Le facteur d'enrichissement des rapports Ca:Mg dans les épidermes ne semble pas être influencé par l'âge des feuilles (Figure 53d), alors que dans les parenchymes on note des facteurs d'enrichissement maximums chez les feuilles matures.

3.4.3 Localisation du Ni dans les cellules des tissus foliaires (MET-EDX)

Lors de la fixation et de l'imprégnation des échantillons de feuille nous avons noté une grosse perte de nickel (analyses des solutions de fixation non montrées). Cependant, nous avons pu faire deux observations originales à partir des analyses du nickel résiduel. Nous avons d'abord observé du nickel résiduel dans les parois des cellules épidermiques (Figure 54), et ce avec ou sans précipitation du Ni avec Na₂S. Ainsi, le nickel dans les parois épidermiques serait fortement séquestré car le traitement Na₂S n'a pas permis la rétention de plus de Ni. Notons que nous avons localisé un peu de Ni résiduel dans la cuticule, à des teneurs plus faibles que dans les parois, en prenant en compte le fait que la zone d'analyse EDX étant plus grande que la cuticule, il y a un effet de dilution due à la résine. Enfin, nous avons différencié deux catégories de chloroplastes, une première contenant beaucoup de thylakoïdes et où nous avons localisé du nickel résiduel après traitement au Na₂S (Figure 55a), et une seconde contenant surtout de l'amidon et où nous n'avons pas trouvé de Ni résiduel (Figure 55b).

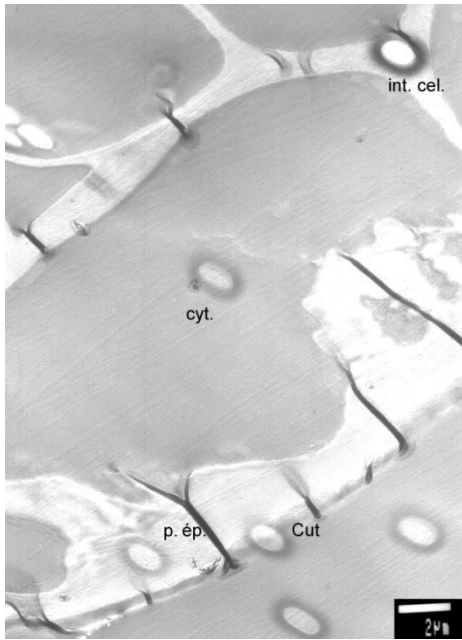


Figure 54. Photographies en microscopie électronique à transmission (MET) d'une cellule épidermique. Les tâches claires sur la photo correspondent aux points d'impact de l'analyse EDX sur la cuticule (*cut.*), la paroi épidermique (*p. ép.*), le cytoplasme (*cyt.*) et l'intersection cellulaire (*int. cel.*).



Figure 55. Photographies en microscopie électronique à transmission de chloroplastes contenant surtout de l'amidon (a) et beaucoup de thylakoïdes (b).

4 Discussion et conclusion

4.1 Distributions spatiales du nickel à l'échelle des feuilles

4.1.1 Relations entre les distributions spatiales du nickel et celles des caractéristiques écophysiologicals

Pour les hyperaccumulateurs *Leptoplax emarginata* moyennement développés (plantes *P2*) et à l'échelle de la feuille, nous avons observé des gradients positifs, corrélés entre eux, de concentration en nickel foliaire, de transpiration et de densités de stomates, des feuilles les plus vieilles aux feuilles les plus jeunes. Le fait que les feuilles les plus jeunes transpirent le plus, avec des densités de stomates maximales, est bien connu (par exemple Václavík, 1974; Yeo *et al.*, 1985; Keutgen & Chen, 2001). Ces gradients de transpiration et de concentration en nickel foliaire ont été aussi mis en évidence pour des plantes plus développées (plantes *P1*), au moins des feuilles à biomasses maximales aux feuilles les plus jeunes, par ailleurs de plus en plus fines et de plus en plus hydratées. Ceci montre que plus la feuille est jeune plus sa densité de stomates est élevée, plus elle transpire et plus elle concentre le nickel dans sa biomasse. La transpiration étant fortement couplée à la production de biomasse, on peut avoir, lorsque l'hyperaccumulateur est suffisamment développé (plantes *P1*), des lois de dilution souvent peu marquées, la concentration en nickel foliaire diminuant alors avec la biomasse foliaire.

Des résultats tout à fait analogues aux nôtres ont été obtenus pour la moutarde indienne, *Brassica juncea* (Salt *et al.*, 1995) et pour l'arabette *Arabidopsis thaliana* (Dauthieu *et al.*, 2009), avec une accumulation préférentielle de ^{109}Cd dans les feuilles les plus jeunes. De plus, Page *et al.* (2005, 2006) ont démontré, à la fois pour le blé de Printemps et pour le lupin blanc, que le ^{63}Ni était très rapidement redistribué des vieilles feuilles aux feuilles les plus jeunes via le phloème, ce mécanisme étant donc probable dans notre cas, bien que restant à valider.

Si pour les feuilles les plus jeunes, on peut directement relier les modes d'accumulation du nickel aux caractéristiques écophysiologicals de ces feuilles, comme discuté plus haut, et aux accumulations différentielles d'éléments minéraux nutritifs, comme nous le verrons ultérieurement au cours de cette discussion, il n'en est pas de même pour les feuilles les plus vieilles pour lesquelles les processus de translocation du nickel des racines aux feuilles et d'accumulation du nickel dans les tissus foliaires sont cumulatifs, alors que les caractéris-

tiques écophysiologicals sont représentatives d'un court instant. Nos résultats établissent bien une relation entre la concentration en nickel foliaire et la transpiration des feuilles matures aux feuilles les plus jeunes mais celle-ci serait à valider à l'aide de traçages isotopiques (radioéléments ou isotopes stables du nickel) comme l'ont par exemple réalisés Page *et al.* (2005, 2006) et Dauthieu *et al.* (2009) pour suivre, sur des pas de temps courts de quelques heures, la translocation d'une combinaison d'ETM ou du cadmium et leur redistribution dans les feuilles, en fonction de leurs âges.

A l'opposé de nos résultats, Robinson *et al.* (2003b) ont montré que la concentration en nickel foliaire diminuait progressivement des vieilles feuilles aux jeunes feuilles dans le cas de *Berkheya coddii*, plante hyperaccumulatrice de nickel. Pour *Thlaspi caerulescens*, hyperaccumulateur de Cd et de Zn, les vieilles feuilles sont aussi plus concentrées en Cd et Zn que les jeunes feuilles (Küpper *et al.*, 2004). Pour le saule *Salix viminalis*, Cosio *et al.* (2006) ont trouvé des profils de concentrations en ^{109}Cd foliaire analogues à ceux des biomasses foliaires. De même, pour l'hyperaccumulateur *Phytolacca acinosa*, Xu *et al.* (2006) ont mis en évidence des profils de biomasse foliaire et de concentration en manganèse foliaire analogues. Pour cet hyperaccumulateur et pour le saule, l'allocation du métal dans les feuilles serait donc d'autant plus marquée que la biomasse est élevée mais ces résultats sont toutefois à nuancer car, à une échelle un peu plus fine, le métal étudié (Mn : Xu *et al.*, 2006; Cd : Cosio *et al.*, 2006) semble surtout localisé dans les zones de bordure des feuilles, notamment pour les feuilles assez mûres, ce qui serait attribuable à la transpiration. Cosio *et al.* (2006) ont même pu préciser, à l'aide d'autoradiographies, que la distribution spatiale du Cd était uniforme pour des feuilles de saule jeunes, puis que le métal s'accumulait à l'extrémité puis sur les bordures puis enfin aussi dans la veine centrale, en fonction de l'âge de la feuille.

4.1.2 Relations entre le nickel et les éléments minéraux majeurs à l'échelle des feuilles

De façon complémentaire, les résultats obtenus lors des analyses MEB-EDX sur les pastilles de feuilles broyées ont révélé que les feuilles jeunes étaient toujours plus riches en soufre que les feuilles vieilles, que ce soit pour l'hyperaccumulateur cultivé sur du sol fertilisé mais non contaminé en Ni ou pour les hyperaccumulateurs cultivés sur du sol fertilisé et contaminé en Ni ou sur du sable fertilisé et fortement contaminé en Ni (car milieu faiblement

réactif), la concentration en soufre augmentant avec celle de nickel. La question est de savoir si cela est attribuable à (i) l'augmentation concomitante de sulfate et de nickel dans la solution du sol, le nickel étant intégré sous forme de sulfate de nickel à la solution fertilisante et contaminante, tout comme le magnésium et les oligoéléments fer, manganèse et zinc, ou (ii) s'il s'agit d'une augmentation de la synthèse de protéines soufrés à groupements thiols ou d'une augmentation d'absorption racinaire de sulfates, comme cela a été bien établi lors d'une augmentation de concentration en ETM dans la solution (Freeman *et al.*, 2004; Na & Salt, 2010). En effet, pour ce dernier point, le ^{35}S , initialement concentré dans les premières feuilles, migre vers les nouvelles feuilles au cours de la croissance (Bollard, 1960) et les feuilles les plus jeunes sont les feuilles qui produisent le plus d'acides aminés et de protéines, notamment de protéines soufrés à groupements thiols qui se complexent alors au métal (Küpper *et al.*, 2004). Afin d'aller plus loin dans l'interprétation, des expériences futures seraient donc à réaliser avec des solutions ne contenant pas de sulfates et des solutions, comme celles que nous avons utilisé, contenant des sulfates.

Les résultats obtenus lors des analyses MEB-EDX sur les pastilles de feuilles broyées montrent aussi, qu'à l'opposé, le phosphore et le potassium sont préférentiellement localisés dans les feuilles vieilles, sans savoir aujourd'hui le pourquoi de cette différenciation. Enfin, une forte accumulation foliaire de nickel lié à une forte disponibilité du nickel en solution induit une nette diminution des concentrations en calcium, magnésium et potassium dans les feuilles, révélant des mécanismes sous-jacents de compétition et d'utilisation de l'énergie complexes.

4.2 Distributions spatiales du Ni à l'échelle des tissus foliaires

4.2.1 Relations entre le nickel et le soufre

A l'échelle des tissus, nous avons montré que le nickel était localisé de façon largement prépondérante dans les épidermes, tout comme le soufre, donc loin des parenchymes où s'effectuent les processus photosynthétiques, ce qui a été toujours reporté pour les plantes hyperaccumulatrices d'ETM (Mesjasz-Przybylowicz *et al.*, 1994; Kupper *et al.*, 1999; Lombi *et al.*, 2002; Robinson *et al.*, 2003; Broadhurst *et al.*, 2004; Tappero *et al.*, 2007; Vogel-Mikuš *et al.*, 2008; Kachenko *et al.*, 2008), excepté les cellules de garde et les cellules accotées aux stomates nettement plus pauvres en ETM (Frey *et al.*, 2000; Psaras *et al.*, 2000; Küp-

per *et al.*, 2001). Par contre, il semble que le rapport des concentrations en nickel des épidermes et des parenchymes soient souvent de 2 à 4 pour les hyperaccumulateurs étudiés par les auteurs cités alors qu'il est bien plus élevé, de l'ordre de 5 à 9, pour l'hyperaccumulateur *Leptoplax emarginata*, ce qui serait attribuable à son exceptionnelle capacité de transpiration par rapport à sa production de biomasse foliaire, comme noté dans le chapitre 1. Notre hypothèse que le nickel suivrait le flux de transpiration jusqu'aux stomates puis serait redistribué de façon continue et homogène dans les épidermes, par voie apoplasmique, pour se retrouver dans les parois des cellules épidermiques (révélé de façon qualitative en MET-EDX) coassocié au soufre est donc en partie validée mais des travaux ultérieurs seraient souhaitables, par exemple en utilisant des autoradiographies et des méthodes permettant de faire de la spéciation, comme l'ont par exemple mis en œuvre Page *et al.* (2005, 2006) et Küpper *et al.* (2004).

Des investigations plus fines ont révélé que cette concentration prédominante des ETM dans les épidermes foliaires était souvent localisée dans les vacuoles sous forme de complexes avec des protéines soufrées à groupements thiols (Vazquez *et al.*, 1992; Kupper *et al.*, 1999; Broadhurst *et al.*, 2004; Wójcik *et al.*, 2005; Mijovilovich *et al.*, 2009), ce qui précise la corrélation positive ETM-S souvent reportée, mais le stockage de Ni dans les vacuoles a aussi été identifiée sans association avec le soufre (Bidwell *et al.*, 2004). Pour notre part, la perte importante de Ni lors de la fixation des échantillons pour les analyses MET-EDX pourrait correspondre à une libération du Ni contenu dans les vacuoles.

Nous avons aussi montré de façon qualitative (MET-EDX) que le nickel résiduel des épidermes était localisé sur les parois des cellules épidermiques avec un léger enrichissement au niveau de leurs intersections, ce qui suggérerait un mode de transport de type apoplasmique.

De plus si, dans les tissus, la corrélation positive entre le nickel et le magnésium est toujours présente, quel que soit l'âge de la feuille, il n'en va pas de même pour la corrélation positive que nous avons identifiée entre le nickel et le soufre, plus marquée pour les feuilles matures à biomasses maximales et les feuilles jeunes. Ces résultats sont à relier à ceux obtenues en MEB-EDX sur les pastilles de feuilles broyées et compressées. Plus les feuilles sont jeunes, plus elles transpirent et plus elles produiraient aussi de protéines à groupements thiols permettant ainsi de concentrer de façon combinée le nickel dans leurs épidermes. Le mécanisme de détoxification probable par complexation entre ces groupements thiols et le métal a été établi par différents chercheurs, comme Küpper *et al.* (2004), qui ont montré qu'il était particulièrement prononcé au niveau des feuilles les plus jeunes.

4.2.2 Relations avec le nickel et les autres éléments minéraux

Nous avons aussi pu mettre en évidence des gradients de corrélation entre, d'une part, le nickel et le calcium, avec une forte corrélation négative entre eux pour les feuilles les plus jeunes, et, d'autre part, le nickel et le potassium, avec une forte corrélation positive entre eux pour les feuilles les plus jeunes. Le fait qu'au niveau des feuilles les plus jeunes le calcium, jusqu'alors bien réparti entre les différents tissus, soit surtout localisé dans les parenchymes serait attribuable au besoin de la plante de ne pas être "gênée" dans la transpiration maximale de ses feuilles les plus jeunes, ce transport rapide du métal par le flux de sève étant probablement une première étape cruciale de détoxification. Il a été ainsi suggéré que le calcium pouvait freiner l'ouverture des stomates et donc réduire fortement la transpiration (par exemple (De Silva *et al.*, 1985; Song *et al.*, 2008) et pourrait aussi protéger l'activité photosynthétique en se concentrant dans les parenchymes (Vogel-Mikus *et al.*, 2008).

De plus, l'étude des facteurs d'enrichissement des concentrations en éléments minéraux des tissus par rapport à leurs concentrations dans la solution du sol initiale nous ont permis de valider nos résultats concernant leurs localisation dans les tissus tout en précisant les modes d'absorption différentielles de ces éléments minéraux nutritifs par rapport au nickel ou entre eux (nous avons pour cela choisi de comparer uniquement le calcium et le magnésium), ainsi qu'entre les épidermes et les parenchymes. Dans les épidermes, hormis ceux des feuilles ayant poussé avant la culture (F1), ces facteurs d'enrichissement relatifs du nickel par rapport à un élément minéral augmentent selon les éléments de référence suivants : $K > S > Mg > Ca$, ce qui révèle que le nickel est concentré de façon largement préférentielle dans les épidermes par rapport à tous ces éléments. De façon complémentaire, nous avons pu mettre en évidence le fait que le calcium était 4 à 26 fois plus transporté et accumulé dans les parenchymes foliaires que le magnésium, ce qui serait attribuable au fait que dans les sols sur serpentines riches en Ni et en Mg, les hyperaccumulateurs ont dû "s'adapter" pour détoxifier ces deux éléments mais aussi pour prélever de façon privilégiée le calcium, élément essentiel de biofortification des tissus foliaires.

Enfin, bien que des concentrations élevées de calcium aient déjà été trouvées dans les tissus de feuilles d'hyperaccumulateurs (mais seulement jusqu'à 3 % dans les parenchymes palissadiques, Vogel-Mikus *et al.*, 2008), c'est la première fois, à notre connaissance, que de telles concentrations exceptionnellement élevées en éléments minéraux nutritifs (en plus du nickel) ont été mises en évidence dans les tissus foliaires d'une plante hyperaccumulatrice,

que ce soit pour le soufre (jusqu'à 3 % dans les épidermes), le magnésium (jusqu'à 2 à 2,5 % dans les épidermes), le calcium (jusqu'à 8 % dans les différents tissus), le phosphore (jusqu'à 2,5 % dans les différents tissus) et le potassium (jusqu'à 7 à 8 % dans les différents tissus) ! Ceci serait à nouveau attribuable à l'exceptionnelle capacité de transpiration de l'hyperaccumulateur *Leptoplax emarginata*, par rapport à sa production de biomasse foliaire, comme noté dans le chapitre 1. Ces observations mériteraient donc vraiment d'entamer d'autres recherches dans ce domaine.

Conclusion générale et perspectives



Station expérimentale d'Homécourt -54 (GISFI)

Malgré de nombreuses recherches effectuées depuis une vingtaine d'année sur le sujet, la phytoextraction des éléments traces métalliques (ETM) n'est toujours pas opérationnel. Une des raisons à ce « succès manqué » est l'absence d'outils d'aide à la décision pour évaluer l'efficacité de ce bioprocédé de dépollution des sols. De tels outils doivent se baser, entre autres, sur des modèles prédictifs simples de prélèvement d'ETM par des plantes hyperaccumulatrices. Des modèles ont déjà été adaptés pour les hyperaccumulateurs mais ils se sont avérés inadaptés car trop simples ou trop complexes. Ainsi, des modèles biophysiques basés sur le type de transport du métal par rapport à l'eau et le couplage croissance foliaire/transpiration pourraient être de bons candidats, car relativement simples d'utilisation mais toutefois robustes.

Dans ce contexte, nos objectifs étaient de concevoir un modèle permettant à la fois la prédiction de l'accumulation foliaire nickel par la plante hyperaccumulatrice *Leptoplax emarginata* et l'évolution des teneurs en Ni dans la solution du sol contaminé. Pour ce faire, nous avons couplé un modèle biophysique à un modèle de mise en solution des ETM dans le sol. Le modèle de disponibilité de l'ETM a été adapté à partir du modèle basé sur des isothermes d'adsorption, développé et validé par Ingwersen *et al.* (2006). Quant au modèle biophysique, il intègre le couplage croissance foliaire/transpiration ainsi qu'un facteur de bioconcentration lié à la transpiration (TSCF). Ce facteur caractérise le mode de transport prédominant du soluté à travers la racine et permet par ailleurs de décrire la stratégie de défense d'une plante contre les ETM. Ainsi un TSCF inférieur à 1 décrit une stratégie d'exclusion et un TSCF > 1 une stratégie d'accumulation, le transport actif de l'ETM étant prédominant.

1. Dans un premier temps, nous avons déterminé le facteur de bioconcentration TSCF du nickel pour l'hyperaccumulateur de Ni sélectionné, *Leptoplax emarginata*, comparative-ment à une plante exclusive, le blé de Printemps, ces plantes étant intactes et transpirantes, ce qui est le reflet de la réalité et évite l'important biais et le manque de fiabilité des mesures de concentrations de solutés dans le xylème, effectuées sur des plantes décapitées. Nous avons cherché à comprendre et à hiérarchiser les mécanismes impliqués dans la valeur de ce facteur de bioconcentration (Chapitre 1). Pour ce faire, nous avons suivi de façon cinétique l'absorption racinaire et l'accumulation foliaire du nickel, ainsi que le couplage de la croissance et de la transpiration, les plantes étant cultivées dans un sable fertilisé et contaminé en nickel. Nous avons pu mettre en évidence :

Un facteur de bioconcentration TSCF caractéristique du mode de transport prédominant du Ni dans la plante

Comme nous le supposons, le $TSCF_{Ni}$ était extrêmement faible pour la plante exclusive ($TSCF_{Ni}$ du blé inférieur à 0,02) qui limite très fortement l'accumulation de Ni dans ses parties aériennes grâce à une forte rétention du métal dans ses racines, ce qui pourrait être attribuable à la très forte adsorption du nickel sur les surfaces racinaires (8 fois plus que pour l'hyperaccumulateur, à mêmes pH et concentration en nickel dans la solution du sable) et surtout au fait que les racines sont quasiment imperméables au nickel mais pas à l'eau, comme l'indique la valeur du coefficient de réflexion proche de 1 ($\sigma = 0.993$). Ceci serait attribuable à la présence de barrières (exoderme) ainsi qu'à la probable complexation du nickel par des phytochélatines dans un très large volume de stockage (7 à 9 couches de cellules corticales contre seulement deux pour l'hyperaccumulateur).

Au contraire, pour l'hyperaccumulateur *Leptoplax emarginata*, le facteur de concentration était supérieur à 1 ($TSCF_{Ni}$ d'environ 6), indiquant un mode de transport actif largement prédominant et une forte translocation du nickel des racines vers les feuilles. De façon plus précise, nous avons pu établir que ce transfert de Ni des racines aux feuilles était facilité (i) par une grande perméabilité des racines à la fois au nickel et à l'eau, comme l'indique la valeur du coefficient de réflexion souvent proche de zéro, ce qui serait notamment attribuable à l'absence de bandes de Caspary dans l'hypoderme (absence d'exoderme), ce qui est extrêmement rare, et (ii) surtout par un transport actif du nickel largement prédominant, de l'ordre de 80 % du transport total de nickel dans l'hyperaccumulateur (complément du transport convectif moyen du nickel estimé à près de 18 % du transport total de nickel dans l'hyperaccumulateur), si l'on fait l'hypothèse, largement admise, que le transport diffusif du nickel à travers les membranes racinaires est négligeable. Par ailleurs, nous avons montré que le $TSCF_{Ni}$, même s'il fluctuait, était relativement stable au cours de la croissance de *L. emarginata* et était constant pour la gamme de concentration en Ni dans la solution du sable choisie.

En résumé, le $TSCF_{Ni}$ était un bon outil pour caractériser le mode de transport principal du Ni à travers la plante et sa stratégie de défense contre le nickel, et qu'il était relativement stable au cours de la croissance, que la plante soit exclusive comme le blé de Printemps ou hyperaccumulatrice comme la *Brassicaceae Leptoplax emarginata*.

Une « élasticité » de l'hyperaccumulateur à valider

Nous avons observé un stockage provisoire du Ni dans les racines de l'hyperaccumulateur en début de culture et des variations des régimes de transpiration et d'efficacité d'utilisation de l'eau au cours des cultures. La transpiration étant plus forte la première moitié de culture, période pendant laquelle les racines transféraient le Ni stocké dans les racines vers les parties foliaires. Ces observations nous laissent présumer d'une grande « élasticité » écophysiological de la part de *L. emarginata*, lui permettant, dans notre cas de figure, de s'adapter à des variations de teneurs en Ni dans le milieu de culture, une augmentation de la concentration en nickel dans la solution du sable induisant une forte diminution de l'efficacité de l'utilisation de l'eau pour la photosynthèse et pour la production de biomasse foliaire, du fait d'une nette diminution de l'assimilation du CO₂ et de la production de biomasse foliaire.

2. Nous avons ensuite intégré ce facteur de bioconcentration $TSCF_{Ni}$ à un modèle biophysique d'accumulation foliaire du nickel que l'on a couplé au modèle non-spatialisé de mise en solution des ETM d'Ingwersen *et al.* (2006) (Chapitre 2). Les paramètres du modèle ont été identifiés à partir d'isothermes d'adsorption du Ni, de cinétique d'évolution de la concentration en Ni dans la solution d'un sol contaminé, planté avec *L. emarginata* ou non. Le modèle a ensuite été validé sur un suivi cinétique d'accumulation foliaire du Ni et d'évolution des teneurs en Ni dans la solution du sol. Suite à l'optimisation et à la validation du modèle nous avons conclu que :

Optimisation de l'adsorption/désorption du nickel meilleure en utilisant les données de la série temporelle de la concentration en nickel de la solution du sol sans plantes plutôt que les données des isothermes d'adsorption du nickel sur le sol

L'optimisation des paramètres physico-chimiques du modèle (coefficients k et m de l'isotherme d'adsorption du nickel, coefficient α de désorption du nickel) à partir d'isothermes d'adsorption s'est avéré inadaptée car elle était non représentative des propriétés d'adsorption/désorption du sol et elle ne prenait pas en compte les cinétiques de désorption du Ni. Par contre, l'optimisation combinée de ces trois paramètres à l'aide

des cinétiques d'évolution des concentrations en Ni dans la solution du sol contaminé sans plantes s'est avérée très performante.

Des paramètres physico-chimiques du sol rhizosphérique très sensibles

La prédiction simultanée de la teneur en Ni dans la solution rhizosphérique et de la quantité de Ni accumulé dans les parties foliaires de *L. emarginata*, a mis en évidence que le coefficient de partition solide/liquide du Ni (coefficient k de l'isotherme d'adsorption de Freundlich) était le paramètre qui avait le plus d'influence sur les deux prédictions, loin devant les paramètres de la plante (transpiration et $TSCF_{Ni}$). Ainsi, lorsque la valeur de k est doublée, la prédiction de la concentration en Ni dans la solution est divisée par 9. Il faudra donc être particulièrement vigilant pour un sol contaminé à faible pouvoir tampon dans lequel le pH peut varier et donc la réactivité du sol vis-à-vis de l'ETM (utilisation de l'isotherme d'adsorption de Freundlich généralisé en intégrant les variations de pH).

3. Après avoir étudié certains mécanismes macroscopiques d'accumulation foliaire du nickel et les avoir modélisés, nous avons voulu mieux comprendre, de l'échelle de la feuille à celle du tissu foliaire, l'extraordinaire capacité de *L. emarginata* à accumuler le nickel dans ses feuilles (Chapitre 3). Pour ce faire, nous avons étudié les distributions spatiales de ses concentrations en nickel foliaire, en relation avec les distributions spatiales des caractéristiques écophysiologiques des feuilles (transpiration et assimilation du CO_2 par unités de surface foliaire et efficacité de l'utilisation de l'eau pour la photosynthèse) et des concentrations des autres éléments nutritifs majeurs (S, Ca, Mg, P, K) dans les feuilles. Nous avons aussi étudié la distribution spatiale du nickel dans les tissus foliaires en fonction de l'âge de la feuille, en la reliant à celles des autres éléments nutritifs majeurs (MEB-EDX) Cette étude nous a permis de montrer :

Un effet de l'âge de la feuille sur l'accumulation foliaire du nickel

Nous avons observé, pour les plantes les moins développées, des gradients positifs de concentration en Ni foliaire, de densité de stomates, et de transpiration, des feuilles les

plus vieilles aux feuilles les plus jeunes. Plus la feuille est jeune, plus sa densité de stomates est élevée, plus elle transpire et plus elle concentre du nickel dans sa biomasse. Bien que nous n'ayons pas réalisé d'expérience de découplage production de biomasse foliaire/transpiration ni utilisé de traceurs (radioéléments ou isotopes stables), nous avons donc néanmoins pu établir une relation directe, à l'échelle de la feuille, entre la concentration en nickel foliaire et la transpiration, fonction de la densité de stomates. La transpiration étant fortement couplée à la production de biomasse, nous avons tout de même observé, pour les plantes les plus développées, des lois de dilution du Ni, avec des concentrations en Ni qui diminuaient avec la biomasse foliaire.

Une accumulation préférentielle du Ni dans les épidermes

Nous avons montré à l'aide de l'analyse MEB-EDX que le nickel était localisé de façon prépondérante dans les épidermes, comme il a été toujours reporté pour les hyperaccumulateurs. Un gradient positif de concentration en nickel dans les épidermes a été observé des feuilles les plus vieilles aux feuilles les plus jeunes, tout comme lors de l'analyse des distributions spatiales en concentration du nickel foliaire sur les feuilles entières. Par ailleurs, les épidermes étaient près de 9 fois plus concentrés que les feuilles entières et le nickel était toujours préférentiellement accumulé par rapport aux autres minéraux. L'analyse en MET-EDX a permis de localiser du Ni résiduel (beaucoup de Ni a été perdu lors de la fixation des échantillons de feuille) dans les parois des cellules épidermiques, sous une forme très stable comparativement aux Ni résiduel trouvé dans des chloroplastes après traitement au Na_2S pour précipiter le Ni. Nous avons donc validé notre hypothèse que le nickel suivrait le flux de transpiration jusqu'aux stomates puis serait redistribué de façon continue et homogène dans les épidermes, par voie apoplasmique, pour se retrouver dans les parois des cellules épidermiques. Il semble aussi que le rapport des concentrations en nickel des épidermes et des parenchymes soit souvent de 2 à 4 pour les hyperaccumulateurs étudiés par différents auteurs alors qu'il est bien plus élevé, de l'ordre de 6 à 10, pour l'hyperaccumulateur *Leptoplax emarginata*, ce qui serait attribuable à son exceptionnelle capacité de transpiration par rapport à sa production de biomasse foliaire, comme noté dans le chapitre 1.

Corrélation positive entre le nickel et le soufre et corrélation négative entre le nickel et le calcium

Des corrélations positives ont été trouvées entre le nickel et le magnésium (jusqu'à 2 % de Mg dans le tissu) pour toutes les feuilles alors qu'elles n'ont été trouvées que pour les feuilles matures et les jeunes feuilles entre le nickel et le soufre. La corrélation entre le nickel et le soufre serait attribuable aux mécanismes de détoxification du Ni qui consistent, entre autres, à la formation de complexes de Ni avec les groupements thiols des protéines soufrées. Cependant, cette hypothèse reste à valider et à préciser, du fait que le nickel était apporté au milieu de culture sous forme de sel sulfaté. Le calcium était quant à lui bien réparti dans tous les tissus foliaires ou, pour les feuilles les plus jeunes, majoritairement localisé dans les parenchymes, à des teneurs très élevées (jusqu'à 8 % dans le tissu), et était près de 20 fois plus accumulé que le magnésium. Cette forte accumulation serait attribuable au fait que les sols sur serpentines, où se développe *L. emarginata*, sont extrêmement riches en nickel et en magnésium, et par contre pauvres en calcium, pourtant essentiel pour la biofortification des cellules des plantes. Ainsi, les hyperaccumulateurs, comme nous le montrons dans notre étude, ont dû s'adapter pour détoxifier le nickel et le magnésium, et pour prélever de façon privilégiée le calcium.

4. **En conclusion**, notre étude a révélé qu'une **caractérisation approfondie de l'écophysiologie de la phytoaccumulation d'ETM** telle que nous l'avons entreprise était prometteuse et nécessaire, pour mieux comprendre les **mécanismes de la phytoaccumulation de l'ETM**, dans les racines pour les plantes exclusives et dans les feuilles pour les plantes accumulatrices et hyperaccumulatrices, mais aussi pour les hiérarchiser et les modéliser dans le cadre d'un **modèle biophysique prédictif d'accumulation foliaire d'ETM**, que nous avons développé, calibré et validé.

Les **perspectives** de ce travail de thèse se situent à deux niveaux, à un niveau « fondamental » et un niveau « appliqué ».

Au niveau fondamental, « l'élasticité » de *L. emarginata* serait à étudier. Est-elle capable de réguler sa production de biomasse aérienne ou/et transpiration pour faciliter la

translocation du nickel des racines aux feuilles ? Pour y répondre, des cultures dans des milieux différents, contaminés et non contaminés, seraient à mener afin de comparer les régimes transpiratoires de l'hyperaccumulateur dans les deux modalités. Ce lien entre transpiration et accumulation foliaire de Ni serait aussi à démontrer en réalisant un découplage de la transpiration et de la croissance foliaire. La plante qui transpire plus, accumule-t-elle plus de nickel, comme postulé dans le modèle biophysique d'accumulation du nickel foliaire ? Afin de découpler les deux phénomènes, des cultures pourraient être suivies dans des conditions climatiques différentes (différentes valeurs de déficit de pression de vapeur d'eau) afin de faire varier la transpiration sans faire varier la croissance foliaire. A l'échelle des feuilles, cette relation transpiration/accumulation nécessiterait aussi l'usage de Ni marqué (ou d'un de ses isotopes stables) afin de suivre, sur des pas de temps courts, la redistribution du nickel en fonction de l'âge des feuilles et de leur flux de transpiration. De quelle façon précise l'accumulation foliaire du nickel est-elle reliée à l'accumulation du soufre ? Pour répondre à cette question, des cultures dans des milieux contaminés avec différentes doses de soufre seraient à mener pour vérifier si l'augmentation des teneurs en S dans les tissus est liée à l'augmentation des teneurs en Ni. Il serait aussi souhaitable d'utiliser des autoradiographies et des méthodes permettant de faire de la spéciation, comme l'ont par exemple mis en œuvre Page *et al.* (2005, 2006) et Küpper *et al.* (2004).

A un niveau plus appliqué, le modèle biophysique d'accumulation d'ETM (que nous avons développé, calibré et validé) nécessite l'acquisition de plus de données afin d'assurer une meilleure validation, son utilisation à d'autres ETM que le nickel, mais aussi et surtout de fortes adaptations, c'est-à-dire un nouveau développement, de nouvelles optimisations et validations afin de pouvoir l'utiliser sur le terrain, soumis à de fortes variations climatiques et édaphiques (notamment au niveau du cycle des matières organiques, en relation avec l'activité biologique). Ceci pourrait être mis en œuvre, dans un délai espéré de près de quatre ans, avec :

- une prise en compte plus complète des mécanismes complexes régulant l'adsorption/désorption d'ETM dans un sol rhizosphérique donné (par exemple en utilisant des isothermes de Freundlich généralisées prenant en compte les variations de pH ou de teneurs en carbone organique),

- une meilleure étude et utilisation de la relation de couplage reliant la production de biomasse aérienne à la transpiration, celle-ci étant très difficile à estimer sur le terrain,
- une spatialisation en une dimension (la profondeur) du fait des cycles de dessiccation et d'humectation se déroulant dans les horizons de surface des sols, souvent non saturés, ce qui nécessite d'utiliser l'équation de Richards de transfert d'eau en conditions non saturées.

« Il n'y a pas de réussite facile ni d'échecs définitifs »

Marcel Proust

Références bibliographiques

- Antosiewicz, Wierzbicka. 1999.** Localization of lead in *Allium cepa* L. cells by electron microscopy. *Journal of Microscopy* **195**: 139-146.
- Baker AJM. 1981.** Accumulators and excluders strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition* **3**: 643.
- Bani A. 2009.** Phytoextraction du Ni dans les sols ultramafiques d'Albanie. Thèse INPL.
- Barber SA, Cushman JH. 1981.** Nitrogen uptake model for agronomic crops. Modeling Wastewater Renovation-land Treatment. New York: I K Iskandar, 382-409.
- Baxter I, Hosmani PS, Rus A, Lahner B, Borevitz JO, Muthukumar B, Mickelbart MV, Schreiber L, Franke RB, Salt DE. 2009.** Root Suberin Forms an Extracellular Barrier That Affects Water Relations and Mineral Nutrition in Arabidopsis. *PLoS Genetics* **5**.
- Bhatia NP, Walsh KB, Baker AJM. 2005.** Detection and quantification of ligands involved in nickel detoxification in a herbaceous Ni hyperaccumulator *Stackhousia tryonii* Bailey. *J. Exp. Bot.* **56**: 1343-1349.
- Bidwell SD, Crawford SA, Woodrow IE, Sommer-Knudsen J, Marshall AT. 2004.** Sub-cellular localization of Ni in the hyperaccumulator, *Hybanthus floribundus* (Lindley) F. Muell. *Plant, Cell & Environment* **27**: 705-716.
- Bierhuizen J, Slatyer R. 1965.** Effect of atmospheric concentration of water vapour and CO₂ in determining transpiration-photosynthesis relationships of cotton leaves. *Agricultural Meteorology* **2**: 259-270.
- Bollard EG. 1960.** Transport in the Xylem. *Annual Review of Plant Physiology* **11**: 141-166.
- Bourennane H, Douay F, Sterckeman T, Villanneau E, Ciesielski H, King D, Baize D. 2010.** Mapping of anthropogenic trace elements inputs in agricultural topsoil from Northern France using enrichment factors. *Geoderma* **157**: 165-174.
- Brady KU, Kruckeberg AR, Bradshaw Jr. H. 2005.** Evolutionary ecology of plant adaptation to serpentine soils. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **36**: 243-266.
- Broadhurst CL, Chaney RL, Angle JS, Erbe EF, Maugel TK. 2004.** Nickel localization and response to increasing Ni soil levels in leaves of the Ni hyperaccumulator *Alyssum murale*. *Plant and Soil* **265**: 225-242.
- Brooks R, Lee J, Reeves R, Jaffre T. 1977.** Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *Journal of Geochemical Exploration* **7**: 49-57.
- Callahan D, Baker A, Kolev S, Wedd A. 2006.** Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **11**: 2-12.
- Chaney RL, Angle JS, Broadhurst CL, Peters CA, Tappero RV, Sparks DL. 2007.** Improved Understanding of Hyperaccumulation Yields Commercial Phytoextraction and Phytomining Technologies. *J Environ Qual* **36**: 1429-1443.
- Chardot V, Massoura ST, Echevarria G, Reeves RD, Morel J. 2005.** Phytoextraction Potential of the Nickel Hyperaccumulators *Leptoplax emarginata* and *Bornmuellera tymphaea*. *International Journal of Phytoremediation* **7**: 323.
- Chardot V, Echevarria G, Gury M, Massoura, Morel JL, 2007.** Nickel bioavailability in an ultramafic toposequence in the Vosges Moutains (France). *Plant and Soil* **293**: 7-21.
- Clemens S, Palmgren MG, Krämer U. 2002.** A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* **7**: 309-315.
- Cosio C, Vollenweider P, Keller C. 2006.** Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.): I. Macrolocalization and phytotoxic effects of cadmium. *Environmental and Experimental Botany* **58**: 64-74.

- Dalton F, Raats P, Gardner W. 1975.** Simultaneous uptake of water and solutes by plant roots. *Agronomy Journal* **67**: 334-339.
- Dauthieu M, Denaix L, Nguyen C, Panfili F, Perrot F, Potin-Gautier M. 2009.** Cadmium uptake and distribution in *Arabidopsis thaliana* exposed to low chronic concentrations depends on plant growth. *Plant and Soil* **322**: 239-249-249.
- De Silva DLR, Hetherington AM, Mansfield TA. 1985.** Synergism between calcium ions and abscisic acid in preventing stomatal opening. *New Phytologist* **100**: 473-482.
- Degenhardt B, Gimmler H. 2000.** Cell wall adaptations to multiple environmental stresses in maize roots. *Journal of Experimental Botany* **51**: 595-603.
- Denaix L. 2007.** Transfert sol-eau-plante d'éléments traces dans les écosystèmes cultivés contaminés. *Mémoire de HDR*.
- Elzinga EJ, Grinsven JJMV, Swartjes FA. 1999.** General purpose Freundlich isotherms for cadmium, copper and zinc in soils. *European Journal of Soil Science* **50**: 139-149.
- Enstone DE, Peterson CA, Ma F. 2003.** Root Endodermis and Exodermis: Structure, Function, and Responses to the Environment. *Journal of Plant Growth Regulation* **21**: 335-351.
- Fernandez-Garcia N, Lopez-Perez L, Hernandez M, Olmos E. 2009.** Role of phi cells and the endodermis under salt stress in *Brassica oleracea*. *New Phytologist* **181**: 347-360.
- Filius A, Streck T, Richter J. 1998.** Cadmium Sorption and Desorption in Limed Topsoils as Influenced by pH: Isotherms and Simulated Leaching. *J Environ Qual* **27**: 12-18.
- Fiscus EL. 1986.** Diurnal Changes in Volume and Solute Transport Coefficients of Phaseolus Roots. *Plant Physiol.* **80**: 752-759.
- Freeman JL, Persans MW, Nieman K, Albrecht C, Peer W, Pickering IJ, Salt DE. 2004.** Increased Glutathione Biosynthesis Plays a Role in Nickel Tolerance in *Thlaspi* Nickel Hyperaccumulators. *Plant Cell* **16**: 2176-2191.
- Frey B, Keller C, Zierold K. 2000.** Distribution of Zn in functionally different leaf epidermal cells of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant, Cell & Environment* **23**: 675-687.
- Gonzaga MIS, Ma LQ, Santos JAG, Matias MIS. 2009.** Rhizosphere characteristics of two arsenic hyperaccumulating *Pteris* ferns. *Science of The Total Environment* **407**: 4711-4716.
- Goodger JQD, Sharp RE, Marsh EL, Schachtman DP. 2005.** Relationships between xylem sap constituents and leaf conductance of well-watered and water-stressed maize across three xylem sap sampling techniques. *J. Exp. Bot.* **56**: 2389-2400.
- Green-Pederson H, Jensen BT, Pind N. 1997.** Nickel adsorption on MnO₂, Fe(OH)₃, Montmorillonite, Humic Acid and Calcite: A comparative study. *Environmental technology* **18**: 807-815.
- Greger M, Lofstedt M. 2004.** Comparison of Uptake and Distribution of Cadmium in Different Cultivars of Bread and Durum Wheat. *Crop Sci* **44**: 501-507.
- Grifferty A, Barrington S. 2000.** Zinc Uptake by Young Wheat Plants under Two Transpiration Regimes. *J Environ Qual* **29**: 443-446.
- Hart JJ, Welch RM, Norvell WA, Kochian LV. 2006.** Characterization of cadmium uptake, translocation and storage in near-isogenic lines of durum wheat that differ in grain cadmium concentration. *New Phytologist* **172**: 261-271.
- Haydon MJ, Cobbett CS. 2007.** Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytologist* **174**: 499-506.
- Hernandez-Allica J, Garbisu C, Bercerril JM, Barrutia O, Garcia-Plazaola JI, Zhao FJ, McGrath SP. 2006.** Synthesis of low molecular weight thiols in response to Cd exposure in *Thlaspi caerulescens*. *Plant, Cell & Environment* **29**: 1422-1429.
- Hopmans JW, Bristow KL. 2002.** Current capabilities and future needs of root water and nutrient uptake modelling. *Advances in agronomy* **77**: 103-183.

- Ingwersen J, Streck T. 2005.** A Regional-Scale Study on the Crop Uptake of Cadmium from Sandy Soils: Measurement and Modelling. *J Environ Qual* **34**: 1026-1035.
- Ingwersen J, Bucherl B, Neumann G, Streck T. 2006.** Cadmium Leaching from Micro-Lysimeters Planted with the Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*: Experimental Findings and Modeling. *J Environ Qual* **35**: 2055-2065.
- Kachenko AG, Singh B, Bhatia NP, Siegele R. 2008.** Quantitative elemental localisation in leaves and stems of nickel hyperaccumulating *Hybanthus floribundus floribundus* using micro-PIXE spectroscopy. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **266**: 667-676.
- Kalis EJJ, Temminghoff EJM, Weng L, van Riemsdijk WH. 2006.** Effects of humic acid and competing cations on metal uptake by *Lolium perenne*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**: 702-711.
- Kemanian AR, Stöckle CO, Huggins DR. 2005.** Transpiration-use efficiency of barley. *Agricultural and Forest Meteorology* **130**: 1-11.
- Keutgen N, Chen K. 2001.** Responses of citrus leaf photosynthesis, chlorophyll fluorescence, macro-nutrient and carbohydrate contents to elevated CO₂. *Journal of Plant Physiology* **158**: 1307-1316.
- Knight B, Zhao F, McGrath SP, Shen Z. 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 and Soil* **197**: 71-78.
- Kramer U, Cotter-Howells JD, Charnock JM, Baker AJM, Smith JAC. 1996.** Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* **379**: 635-638.
- Kramer U, Pickering IJ, Prince RC, Raskin I, Salt DE. 2000.** Subcellular Localization and Speciation of Nickel in Hyperaccumulator and Non-Accumulator *Thlaspi* Species. *Plant Physiol.* **122**: 1343-1354.
- Kupper H, Jie Zhao F, McGrath SP. 1999.** Cellular Compartmentation of Zinc in Leaves of the Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol.* **119**: 305-312.
- Kupper H, Lombi E, Zhao F, Wieshammer G, McGrath SP. 2001.** Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*. *J. Exp. Bot.* **52**: 2291-2300.
- Kupper H, Mijovilovich A, Meyer-Klaucke W, Kroneck PM. 2004.** Tissue- and Age-Dependent Differences in the Complexation of Cadmium and Zinc in the Cadmium/Zinc Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges Ecotype) Revealed by X-Ray Absorption Spectroscopy. *Plant Physiol.* **134**: 748-757.
- Lasat MM, Baker AJ, Kochian LV. 1998.** Altered Zn Compartmentation in the Root Symplasm and Stimulated Zn Absorption into the Leaf as Mechanisms Involved in Zn Hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol.* **118**: 875-883.
- Li Y, Chaney R, Brewer E, Roseberg R, Angle JS, Baker A, Reeves R, Nelkin J. 2003.** Development of a technology for commercial phytoextraction of nickel: economic and technical considerations. *Plant and Soil* **249**: 107-115.
- Li T, Di Z, Islam E, Jiang H, Yang X. 2010.** Rhizosphere characteristics of zinc hyperaccumulator *Sedum alfredii* involved in zinc accumulation. *Journal of Hazardous Materials In Press, Corrected Proof*.
- Liu X, Peng K, Wang A, Lian C, Shen Z. 2010.** Cadmium accumulation and distribution in populations of *Phytolacca americana* L. and the role of transpiration. *Chemosphere* **78**: 1136-1141.
- Lombi E, Zhao F, Fuhrmann M, Ma LQ, McGrath SP. 2002.** Arsenic distribution and speciation in the fronds of the hyperaccumulator *Pteris vittata*. *New Phytologist* **156**: 195-203.
- Lu L, Tian S, Yang X, Li T, He Z. 2009.** Cadmium uptake and xylem loading are active processes in the hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *Journal of Plant Physiology* **166**: 579-587.
- Ma F, Peterson CA. 2003.** Current insights into the development, structure, and chemistry of the endodermis and exodermis of roots. *Canadian Journal of Botany* **81**: 405-421.

- Mari S, Gendre D, Pianelli K, Ouerdane L, Lobinski R, Briat J, Lebrun M, Czernic P. 2006.** Root-to-shoot long-distance circulation of nicotianamine and nicotianamine–nickel chelates in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany* **57**: 4111–4122.
- McGrath SP, Shen Z, Zhao F. 1997.** Heavy metal uptake and chemical changes in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi ochroleucum* grown in contaminated soils. *Plant and Soil* **188**: 153–159.
- McNear Jr. DH, Chaney RL, Sparks DL. 2010.** The hyperaccumulator *Alyssum murale* uses complexation with nitrogen and oxygen donor ligands for Ni transport and storage. *Phytochemistry* **71**: 188–200.
- Mehra O, Jackson M. 1960.** Iron oxide removal from soils and clays by a dithionite-citrate buffered with sodium bicarbonate. *Clays and clay minerals* **7**: 317–327.
- Mench M, Baize D. 2004.** Contamination des sols et de nos aliments d'origine végétale par les éléments en traces, mesures pour réduire l'exposition. *Courrier de l'environnement de l'INRA* **52** : 31–56.
- Menon M, Hermle S, Günthardt-Goerg M, Schulin R. 2007.** Effects of heavy metal soil pollution and acid rain on growth and water use efficiency of a young model forest ecosystem. *Plant and Soil* **297**: 171–183.
- Mesjasz-Przybyłowicz J, Balkwill K, Przybyłowicz W, Annegarn H. 1994.** Proton microprobe and X-ray fluorescence investigations of nickel distribution in serpentine flora from South Africa. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **89**: 208–212.
- Meuser J, Frensch J. 1998.** Hydraulic properties of living late metaxylem and interactions between transpiration and xylem pressure in maize. *Journal of Experimental Botany* **49**: 69–77.
- Migeon A. 2009.** Etude de la variabilité naturelle dans la réponse du peuplier aux métaux : Bases physiologiques et exploitation en phytoremédiation.
- Mijovilovich A, Leitenmaier B, Meyer-Klaucke W, Kroneck PM, Gotz B, Kupper H. 2009.** Complexation and Toxicity of Copper in Higher Plants. II. Different Mechanisms for Copper versus Cadmium Detoxification in the Copper-Sensitive Cadmium/Zinc Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges Ecotype). *Plant Physiol.* **151**: 715–731.
- Miller DM. 1985.** Studies of Root Function in *Zea mays*: III. Xylem Sap Composition at Maximum Root Pressure Provides Evidence of Active Transport into the Xylem and a Measurement of the Reflection Coefficient of the Root. *Plant Physiol.* **77**: 162–167.
- Milner MJ, Kochian LV. 2008.** Investigating Heavy-metal Hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a Model System. *Annals of Botany* **102**: 3–13.
- Montargès-Pelletier E, Chardot V, Echevarria G, Michot LJ, Bauer A, Morel J. 2008.** Identification of nickel chelators in three hyperaccumulating plants: An X-ray spectroscopic study. *Phytochemistry* **69**: 1695–1709.
- Na G, Salt DE. 2010.** The role of sulfur assimilation and sulfur-containing compounds in trace element homeostasis in plants. *Environmental and Experimental Botany* **In Press, Corrected Proof**.
- Nakamura S, Akiyama C, Sasaki T, Hattori H, Chino M. 2008.** Effect of cadmium on the chemical composition of xylem exudate from oilseed rape plants (*Brassica napus* L.). *Soil Science & Plant Nutrition* **54**: 118–127.
- do Nascimento CWA, Xing B. 2006.** Phytoextraction: A review on enhanced metal availability and plant accumulation. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)* **63**: 299–311.
- Page V, Feller U. 2005.** Selective Transport of Zinc, Manganese, Nickel, Cobalt and Cadmium in the Root System and Transfer to the Leaves in Young Wheat Plants. *Annals of Botany* **96**: 425–434.
- Page V, Weisskopf L, Feller U. 2006.** Heavy metals in white lupin: uptake, root-to-shoot transfer and redistribution within the plant. *New Phytologist* **171**: 329–341.

- Peer WA, Mahmoudian M, Freeman JL, Lahner B, Richards EL, Reeves RD, Murphy AS, Salt DE. 2006.** Assessment of plants from the *Brassicaceae* family as genetic models for the study of nickel and zinc hyperaccumulation. *New Phytologist* **172**: 248-260.
- Perriguet J. 2006.** Modélisation du prélèvement de cadmium par le maïs (*Zea mays* L.) et le tabouret calaminaire (*Thlaspi caerulescens* J. & c. Presl). Thèse INPL.
- Perumalla CJ, Peterson CA, Enstone DE. 1990.** A survey of angiosperm species to detect hypodermal Gasparian bands. I. Roots with a uniseriate hypodermis and epidermis. *Botanical Journal of the Linnean Society* **103**: 93-112.
- Poorter H, Remkes C, Lambers H. 1990.** Carbon and Nitrogen Economy of 24 Wild Species Differing in Relative Growth Rate. *Plant Physiol.* **94**: 621-627.
- Psaras GK, Constantinidis T, Cotsopoulos B, Manetas Y. 2000.** Relative Abundance of Nickel in the Leaf Epidermis of Eight Hyperaccumulators: Evidence that the Metal is Excluded from both Guard Cells and Trichomes. *Annals of Botany* **86**: 73 -78.
- Puschenreiter M, Schnepf A, Millán IM, Fitz WJ, Horak O, Klepp J, Schrefl T, Lombi E, Wenzel WW. 2005.** Changes of Ni biogeochemistry in the rhizosphere of the hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Plant and Soil* **271**: 205-218.
- Rascio N, Navari-Izzo F. 2010.** Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science* doi:10.1016/j.plantsci.2010.08.016.
- Ray JD, Sinclair TR. 1998.** The effect of pot size on growth and transpiration of maize and soybean during water deficit stress. *Journal of Experimental Botany* **49**: 1381 -1386.
- Ray JD, Gesch RW, Sinclair TR, Hartwell Allen L. 2002.** The effect of vapor pressure deficit on maize transpiration response to a drying soil. *Plant and Soil* **239**: 113-121-121.
- Reeves RD, Brooks RR, Press JR. 1980.** Nickel Accumulation by Species of *Peltaria* Jacq. (*Cruciferae*). *Taxon* **29**: 629-633.
- Richards LA. 1931.** Capillary conduction of liquids through porous mediums. *Physics* **1**: 318-333.
- Robinson BH, Fernandez J, Madejon P, Marañón T, Murillo JM, Green SR, Clothier BE. 2003a.** Phytoextraction: an assessment of biogeochemical and economic viability. *Plant and Soil* **249**: 117-125.
- Robinson BH, Lombi E, Zhao FJ, McGrath SP. 2003b.** Uptake and distribution of nickel and other metals in the hyperaccumulator *Berkheya coddii*. *New Phytologist* **158**: 279-285.
- Robinson BH, Schulin R, Nowack B, Roulier S, Menon M, Clothier B, Green S, Mills T. 2006.** Phytoremediation for the management of metal flux in contaminated sites. *For. Snow Landsc. Res.* **80**: 221-234.
- Russell RS, Barber DA. 1960.** The Relationship Between Salt Uptake and the Absorption of Water by Intact Plants. *Annual Review of Plant Physiology* **11**: 127-140.
- Russell RS. 1977.** *Plant Root Systems: Their Function and Interaction with the Soil*. England.
- Rygol J, Pritchard J, Zhu JJ, Tomos AD, Zimmermann U. 1993.** Transpiration Induces Radial Turgor Pressure Gradients in Wheat and Maize Roots. *Plant Physiol.* **103**: 493-500.
- Salt DE, Blaylock M, Kumar NP, Dushenkov V, Ensley BD, Chet I, Raskin I. 1995a.** Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants. *Bio/Technology* **13**: 468-474.
- Salt DE, Prince RC, Pickering IJ, Raskin I. 1995b.** Mechanisms of Cadmium Mobility and Accumulation in Indian Mustard. *Plant Physiol.* **109**: 1427-1433.
- Sarret G, Vangronsveld J, Manceau A, Musso M, D'Haen J, Menthonnex J, Hazemann J. 2001.** Accumulation Forms of Zn and Pb in *Phaseolus vulgaris* in the Presence and Absence of EDTA. *Environmental Science & Technology* **35**: 2854-2859.

- Schneider H, Wistuba N, Miller B, Geßner P, Thürmer F, Melcher P, Meinzer F, Zimmermann U. 1997a.** Diurnal variation in the radial reflection coefficient of intact maize roots determined with the xylem pressure probe. *Journal of Experimental Botany* **48**: 2045-2053.
- Schneider H, Zhu J, Zimmermann U. 1997b.** Xylem and cell turgor pressure probe measurements in intact roots of glycophytes: transpiration induces a change in the radial and cellular reflection coefficients. *Plant, Cell & Environment* **20**: 221-229.
- Schurr U. 1998.** Xylem sap sampling--new approaches to an old topic. *Trends in Plant Science* **3**: 293-298.
- Seregin I, Kozhevnikova A. 2006.** Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology* **53**: 257-277-277.
- Seregin I, Kozhevnikova A. 2008.** Roles of root and shoot tissues in transport and accumulation of cadmium, lead, nickel, and strontium. *Russian Journal of Plant Physiology* **55**: 1-22.
- Sheoran V, Sheoran A, Poonia P. 2009.** Phytomining: A review. *Minerals Engineering* **22**: 1007-1019.
- Song W, Zhang Z, Shao H, Guo X, Cao H, Zhao H, Fu Z, Hu X. 2008.** Relationship between calcium decoding elements and plant abiotic-stress resistance. *International Journal of Biological Sciences* **4**: 116-125.
- Sterckeman T, Perriguet J, Caël M, Schwartz C, Morel JL. 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 and Soil* **262**: 289-302.
- Stedle E, Oren R, Schulze E. 1987.** Water Transport in Maize Roots : Measurement of Hydraulic Conductivity, Solute Permeability, and of Reflection Coefficients of Excised Roots Using the Root Pressure Probe. *Plant Physiol.* **84**: 1220-1232.
- Stedle E, Murrmann M, Peterson CA. 1993.** Transport of Water and Solutes across Maize Roots Modified by Puncturing the Endodermis (Further Evidence for the Composite Transport Model of the Root). *Plant Physiol.* **103**: 335-349.
- Stedle E, Peterson CA. 1998.** How does water get through roots? *Journal of Experimental Botany* **49**: 775-788.
- Su YH, McGrath SP, Zhu YG, Zhao FJ. 2008.** Highly efficient xylem transport of arsenite in the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*. *New Phytologist* **180**: 434-441.
- Tani F, Barrington S. 2005a.** Zinc and copper uptake by plants under two transpiration rates. Part I. Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environmental Pollution* **138**: 538-547.
- Tani F, Barrington S. 2005b.** Zinc and copper uptake by plants under two transpiration rates. Part II. Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* L.). *Environmental Pollution* **138**: 548-558.
- Tappero R, Peltier E, Gräfe M, Heidel K, Ginder-Vogel M, Livi KJT, Rivers ML, Marcus MA, Chaney RL, Sparks DL. 2007.** Hyperaccumulator *Alyssum murale* relies on a different metal storage mechanism for cobalt than for nickel. *New Phytologist* **175**: 641-654.
- Temminghoff E, Van der Zee S, De Haan F. 1995.** Speciation and calcium competition effects on cadmium sorption by sandy soil at various pHs. *European Journal of Soil Science* **46**: 649-655.
- Trapp S. 2000.** Modelling uptake into roots and subsequent translocation of neutral and ionisable organic compounds. *Pest Management Science* **56**: 767-778.
- Ueno D, Iwashita T, Zhao F, Ma JF. 2008.** Characterization of Cd Translocation and Identification of the Cd Form in Xylem Sap of the Cd-Hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant and Cell Physiology* **49**: 540-548.
- Uraguchi S, Mori S, Kuramata M, Kawasaki A, Arai T, Ishikawa S. 2009.** Root-to-shoot Cd translocation via the xylem is the major process determining shoot and grain cadmium accumulation in rice. *Journal of Experimental Botany* **60**: 2677-2688.

- Václavík J. 1974.** CO₂ and water vapour exchange through adaxial and abaxial surfaces of tobacco leaves of different insertion level. *Biologia Plantarum* **16**: 389-394-394.
- Van der Vliet L, Peterson C, Hale B. 2007.** Cd accumulation in roots and shoots of durum wheat: the roles of transpiration rate and apoplastic bypass. *Journal of Experimental Botany* **58**: 2939 -2947.
- Van Nevel L, Mertens J, Oorts K, Verheyen K. 2007.** Phytoextraction of metals from soils: How far from practice? *Environmental Pollution* **150**: 34-40.
- Vazquez MD, Barcelo J, Poschenrieder C, Madico J, Hatton O, Baker AJM, Cope GH. 1992.** Localization of zinc and cadmium in *Thlaspi caerulescens* (*Brassicaceae*), a metallophyte that can hyperaccumulate both metals. *Journal of Plant Physiology* **140**: 350-355.
- Verbruggen N, Hermans C, Schat H. 2009.** Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* **181**: 759-776.
- Vogel-Mikuš K, Regvar M, Mesjasz-Przybyłowicz J, Przybyłowicz WJ, Simčič J, Pelicon P, Budnar M. 2008.** Spatial distribution of cadmium in leaves of metal hyperaccumulating *Thlaspi praecox* using micro-PIXE. *New Phytologist* **179**: 712-721.
- Wang W, Brusseau ML, Aftiola JF. 1997.** The use of calcium to facilitate desorption and removal of cadmium and nickel in subsurface soils. *Journal of Contaminant Hydrology* **25**: 325-336.
- Wenzel WW, Bunkowski M, Puschenreiter M, Horak O. 2003.** Rhizosphere characteristics of indigenously growing nickel hyperaccumulator and excluder plants on serpentine soil. *Environmental Pollution* **123**: 131-138.
- Whiting SN, Broadley MR, White PJ. 2003.** Applying a solute transfer model to phytoextraction: Zinc acquisition by *Thlaspi caerulescens*. *Plant and Soil* **249**: 45-56.
- Wilkins BJ, Brummel N, Loch JPG. 1998.** Influence of pH and Zinc Concentration on Cadmium Sorption in Acid, Sandy Soils. *Water, Air, & Soil Pollution* **101**: 349-362-362.
- Wilson PJ, Thompson K, Hodgson JG. 1999.** Specific leaf area and leaf dry matter content as alternative predictors of plant strategies. *New Phytologist* **143**: 155-162.
- Wójcik M, Vangronsveld J, D'Haen J, Tukiendorf A. 2005.** Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens*: II. Localization of cadmium in *Thlaspi caerulescens*. *Environmental and Experimental Botany* **53**: 163-171.
- Xing JP, Jiang RF, Ueno D, Ma JF, Schat H, McGrath SP, Zhao FJ. 2008.** Variation in root-to-shoot translocation of cadmium and zinc among different accessions of the hyperaccumulators *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi praecox*. *New Phytologist* **178**: 315-325.
- Xu X, Shi J, Chen Y, Chen X, Wang H, Perera A. 2006.** Distribution and mobility of manganese in the hyperaccumulator plant *Phytolacca acinosa* Roxb. (*Phytolaccaceae*). *Plant and Soil* **285**: 323-331.
- Yang X, Feng Y, He Z, Stoffella PJ. 2005.** Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **18**: 339-353.
- Yeo AR, Yeo ME, Caporn SJM, Lachno DR, Flowers TJ. 1985.** The Use of ¹⁴C-Ethane Diol as a Quantitative Tracer for the Transpirational Volume Flow of Water and an Investigation of the Effects of Salinity upon Transpiration, Net Sodium Accumulation and Endogenous ABA in Individual Leaves of *Oryza sativa* L. *Journal of Experimental Botany* **36**: 1099 -1109.
- Zelko I, Lux A, Czibula K. 2008.** Difference in the root structure of hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and non-hyperaccumulator *Thlaspi arvense*. *International Journal of Environment and Pollution* **33**: 123-132.
- Zhao FJ, Hamon RE, McLaughlin MJ. 2001.** Root exudates of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* do not enhance metal mobilization. *New Phytologist* **151**: 613-620.
- Zhao FJ, Hamon RE, Lombi E, McLaughlin MJ, McGrath SP. 2002.** Characteristics of cadmium uptake in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany* **53**: 535-543

Zhao FJ, Jiang RF, Dunham SJ, McGrath SP. 2006. Cadmium uptake, translocation and tolerance in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *New Phytologist* **172**: 646-654.

Zhu JJ, Zimmermann U, Thürmer F, Haase A. 1995. Xylem pressure response in maize roots subjected to osmotic stress: determination of radial reflection coefficients by use of the xylem pressure probe. *Plant, Cell & Environment* **18**: 906-912.

Zimmermann U, Rygol J, Balling A, Klock G, Metzler A, Haase A. 1992. Radial Turgor and Osmotic Pressure Profiles in Intact and Excised Roots of *Aster tripolium*: Pressure Probe Measurements and Nuclear Magnetic Resonance-Imaging Analysis. *Plant Physiol.* **99**: 186-196.

Liste des figures

Introduction bibliographique

Figure 1. Enrichissement en ETM des sols du Nord de la France d'après (Bourennane <i>et al.</i> , 2010).....	12
Figure 2. Exemple de processus impliqués dans le transfert d'un ETM dans la rhizosphère, son absorption et séquestration dans les racines, son transfert dans le xylème et son accumulation dans les parties aériennes, d'après Clemens <i>et al.</i> (2002).	15
Figure 3. Localisation des ETM dans/sur les différentes phases solides du sol, processus mis en jeu et niveau de mobilité (d'après Denaix, 2007).....	19
Figure 4. Mouvement de l'eau et des solutés dans la plante induit par la transpiration, croissance et redistribution du carbone induits par l'assimilation foliaire du CO ₂ et la photosynthèse (d'après une communication de Steudle, 2010).....	22
Figure 5. Il existe deux voies de passages pour l'eau et les solutés, la voie apoplasmique (espace entre les parois cellulaires) et la voie symplasmique (dans les cellules). Dans l'endoderme, une barrière (la bande de Caspari) empêche le passage apoplasmique des solutés qui doivent alors emprunter la voie symplasmique pour entrer dans la stèle.	22
Figure 6. Schéma conceptuel du modèle couplé de mise en solution, d'absorption racinaire et de phytoaccumulation des ETM.....	25

Chapitre 1

Figure 7. <i>Leptoplax emarginata</i> (feuilles + hampe florale) dans son milieu naturel (photo R. Reeves).	31
Figure 8. Fleurs et fruits de <i>Leptoplax emarginata</i> (photo G. Echevarria).	31
Figure 9. Photographie des grains de quartz blancs, oranges, roses. On distingue au centre de la photo un grain particuliers plus sombre et avec des tâches noires.....	33
Figure 10. Pot de culture non planté.....	34
Figure 11. Tuyau Tygon [®] placé sur une tige incisée afin de récupérer la sève dans un vial	38
Figure 12. Valeurs moyennes des concentrations en Ni, C _s (a) et pH des solutions du sable (b) pour chaque prélèvement de T1, L1, L10 et B1.....	39
Figure 13. Concentrations des cations et anions majeurs dans la solution du sable pour chaque prélèvement hebdomadaires de solution (le prélèvement 1 débutant après le 14 ^{ème} jour de culture)..	40
Figure 14. Différences morphologiques entre les quatre répétitions de L1 (premier plan) et les quatre répétitions de L10 (arrière-plan) lors du dernier prélèvement (42 ^{ème} jour de culture).	42
Figure 15. Cinétiques de croissance et de transpiration : valeurs moyennes des biomasses foliaires sèches, BF (a), des surfaces foliaires, SF (b), des biomasses racinaires sèches, BR (c) et des volumes cumulés d'eau transpirée, VT (d) pour chaque prélèvement des hyperaccumulateurs L1 et L10, et du blé B1.....	42
Figure 16. Evolution, au cours des cinétiques de croissance, des humidités foliaires moyennes des hyperaccumulateurs L1 et L10, et du blé B1.....	44
Figure 17. Evolutions, au cours des cinétiques de croissance et de phytoaccumulation du nickel, des valeurs moyennes des rapports de la biomasse racinaire sur la biomasse aérienne, BR/ BF (a), des surfaces foliaires spécifiques, SFS (b), des taux de transpiration quotidiens normés à la surface foliaire, T (c) et des coefficients d'efficacité d'utilisation de l'eau, EUE (d) pour chaque prélèvement de L1, L10 et B1.....	45
Figure 18. Rapport hebdomadaire de la production de biomasse aérienne sur le volume d'eau transpirée entre deux prélèvements (a) et volume hebdomadaire d'eau transpirée entre deux prélèvements (b).	46
Figure 19. Evolutions, au cours des cinétiques de croissance et de phytoaccumulation du nickel, des valeurs moyennes des concentrations en Ni dans les feuilles, C _F (a) et dans les racines, C _R (c), ainsi que des valeurs moyennes des quantités de Ni dans les feuilles, Q _F (b) et les racines, Q _R (d) pour chaque prélèvement de L1, L10 et B1.....	49

- Figure 20.** Evolutions des proportions de Ni dans les feuilles (gris), dans les racines (blanc) et adsorbés dans les racines (noir) par rapport à la quantité totale de Ni dans la plante pour *L1* (a), *L10* (b) et *B1* (c) prélevés au cours de leurs cinétiques de croissance et de phytoaccumulation du nickel..... 50
- Figure 21.** Evolutions, au cours des cinétiques de croissance et de phytoaccumulation du nickel, du coefficient de réflexion apparent σ_{Ni} déterminé comme le rapport des flux de Ni entre la racine et toute la plante (a), du flux convectif de Ni entrant dans la racine (dQ_c), du flux de Ni transloqué des racines aux feuilles (dQ_F) et du flux total de Ni entrant dans la racine (dQ_p) pour *B1* (b), *L1* (c) et *L10* (d). 51
- Figure 22.** Evolutions, au cours des cinétiques de croissance et de phytoaccumulation du nickel, du facteur de bioconcentration lié à la transpiration $TSCF_{Ni}$ calculé à partir d'un bilan sur les flux d'eau et de Ni (a) et relation entre $TSCF_{Ni}$ et $(1-\sigma_{Ni})$ 52

Chapitre 2

- Figure 23.** Schéma conceptuel du modèle d'Ingwersen *et al.* (2006) à un seul compartiment. 63
- Figure 24.** Photographie du sol sableux observé à la loupe binoculaire. On observe des grains de quartz et des revêtements de matières organiques. 66
- Figure 25.** Evolutions des valeurs moyennes des concentrations en Ni (a) et de pH (b) des solutions du sol sableux fertilisé et contaminé en Ni au cours des cinétiques de phytoaccumulation du nickel par l'hyperaccumulateur *L100*, comparativement aux témoins sans plantes *T100*. 72
- Figure 26.** Concentrations moyennes des cations et anions majeurs dans la solution du sol sableux fertilisé et contaminé en Ni pour chacun des trois prélèvements de *L100* et *T100*, effectués au cours des 7^{ème}, 21^{ème} et 35^{ème} jours de culture. 72
- Figure 27.** Evolutions des valeurs moyennes des biomasses foliaires sèches, BF (a), des surfaces foliaires, SF (b), des surfaces foliaires spécifiques, SFS (c) et des humidités foliaires (d) au cours des cinétiques de croissance de l'hyperaccumulateur *L100* cultivé dans le sol fertilisé et contaminé en Ni. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard de la moyenne (n = 4). 74
- Figure 28.** Photographies des quatre répétitions du dernier prélèvement de l'hyperaccumulateur *L100* (35^{ème} jour de culture). 75
- Figure 29.** Evolution du volume d'eau transpirée quotidiennement, T, pour chaque plant de l'hyperaccumulateur *L100* et loi exponentielle moyenne modélisant l'ensemble de ces cinétiques de transpiration (beaucoup plus de données en début de culture). 76
- Figure 30.** Evolutions des valeurs moyennes des taux de transpiration (a) et des efficacités d'utilisation de l'eau pour la production de biomasse foliaire (b) au cours des cinétiques de croissance de l'hyperaccumulateur *L100* cultivé dans le sol fertilisé et contaminé en Ni. 77
- Figure 31.** Evolutions des valeurs moyennes des concentrations foliaires en Ni (a) et des quantités foliaires de Ni (b) au cours des cinétiques de croissance de l'hyperaccumulateur *L100* cultivé dans le sol fertilisé et contaminé en Ni. 77
- Figure 32.** Quantités moyennes de nickel accumulées dans les feuilles des plantes au cours d'une période de culture, dQ_F , en fonction du produit du volume cumulé moyen d'eau transpirée pendant cette même période, dVT , avec la concentration moyenne en Ni dans la solution, $C_{s\ moy}$, de cette même période pour les hyperaccumulateurs *L1* et *L10* cultivés sur des sables fertilisés et contaminés en Ni (a) et pour *L1*, *L10* mais aussi pour l'hyperaccumulateur *L100* cultivé dans le sol sableux (b). 79
- Figure 33.** Optimisation des paramètres k et m de la loi puissance d'adsorption de Freundlich, à partir des isothermes d'adsorption du Ni sur le sol sableux réalisées avec des solutions de $Ca(NO_3)_2$ 10^{-2} mol l^{-1} (protocole (a) du Tableau 13). 80
- Figure 34.** Optimisation du paramètre de désorption du Ni α à partir des données expérimentales de la concentration en Ni dans la solution du sol, C_s , des pots sans plantes *T100* et en fixant k à 250,5 l kg^{-1} et m à 0,38 (protocole (b) du Tableau 13). 81
- Figure 35.** Optimisation des paramètres k, m et α à partir des données expérimentales de la concentration en Ni dans la solution du sol, C_s , des pots sans plantes *T100* (protocole (c) du Tableau 13). 82
- Figure 36.** Optimisation des paramètres k, m et α à partir des données expérimentales de la concentration en Ni dans la solution du sol, C_s , des pots cultivés *L100* (protocole (d) du Tableau 13). 83
- Figure 37.** Optimisation du paramètre α à partir des données expérimentales de la concentration en Ni dans la solution du sol, C_s , des pots cultivés *L100* et en fixant k à 16,8 l kg^{-1} et m à 0,28 (protocole (e) du Tableau 13). 83

- Figure 38.** Prédiction simultanée de la concentration en Ni dans la solution du sol (C_s) et dans la phase solide (S), et de la quantité de Ni dans les feuilles de *L. emarginata* (Q_F) cultivée sur le sol sableux fertilisé et contaminé en Ni par rapport aux mesures expérimentales. 85
- Figure 39.** Relations entre les concentrations en Ni dans la solution du sol, C_s , simulées par le modèle et celles mesurées dans les solutions du sol au cours des trois prélèvements successifs des systèmes sol-hyperaccumulateur *L100*. 87
- Figure 40.** Relations entre les quantités de Ni accumulées dans les feuilles de *L. emarginata*, Q_F , simulées par le modèle et celles mesurées dans les plantes lors des trois prélèvements de *L100* effectués au cours de leurs cinétiques de croissance et de phytoaccumulation de Ni. 87
- Figure 41.** Analyse de sensibilité du modèle portant sur la concentration en Ni dans la solution du sol, C_s , simulée (a) et sur la quantité de Ni dans les feuilles de *L. emarginata*, Q_F , simulée (b) pour chaque paramètre du modèle pris individuellement. 88

Chapitre 3

- Figure 42.** Photographie des plantes *P1* et *P2* à la cinquième semaine culture. 103
- Figure 43.** Profils des biomasses foliaires sèches pour *P1* (a) et *P2* (b), de surfaces foliaires spécifiques pour *P1* (c) et *P2* (d) et d'humidités foliaires pour les hyperaccumulateurs *P1* (e) et *P2* (f) 105
- Figure 44.** Profils d'assimilation du CO_2 (AN) pour *P1* (a) et *P2* (b), de flux de transpiration (E) pour *P1* (c) et *P2* (d) et d'efficacité d'utilisation de l'eau pour la photosynthèse (EUE) pour *P1* (e) et *P2* (f). 106
- Figure 45.** Profils des teneurs en Ni foliaire pour les plantes *P1* (a) et *P2* (b). Relations entre les teneurs en Ni foliaire et la biomasse foliaire sèche pour les plantes *P1* (c) et *P2* (d), l'assimilation du CO_2 (AN) pour les plantes *P1* (e) et *P2* (f), et le flux de transpiration (E) pour les plantes *P1* (g) et *P2* (h) 107
- Figure 46.** Densités de stomates sur les faces inférieures (ép. Inf.) et supérieures (ép. Sup.) des quatre catégories de feuilles des hyperaccumulateurs *P2a* (a), *P2b* (b) et *P2c* (c) 109
- Figure 47.** Photographies MEB des faces inférieures des feuilles avant repiquage *F1* (a), des vieilles feuilles *F2* (b), des feuilles matures *F3* (c) et des jeunes feuilles *F4* (d) de la plante *P1a*. 110
- Figure 48.** Relation entre le flux de transpiration, E et la densité stomatique, pour chacune des quatre catégories de feuille (*F1*, *F2*, *F3*, *F4*) des trois plantes *P2*. 110
- Figure 49.** Photographies en microscopie photonique de coupes fines transversales, colorées au bleu de toluidine, pour chaque catégorie de feuille de la plante *P0*. 111
- Figure 50.** Profils des concentrations massiques en Ni dans les épidermes et les parenchymes pour les plantes *P2a* (a), *P2b* (c) et *P2c* (e) 114
- Figure 51.** Profils des concentrations massiques en magnésium dans les épidermes et les parenchymes pour les plantes *P2a* (a), *P2b* (c) et *P2c* (e). 115
- Figure 52.** Coefficients de corrélation entre le Ni et (a) le soufre, (b) le magnésium, (c) le calcium et (d) le potassium pour les plantes *P2*. 117
- Figure 53.** Facteurs d'enrichissement des rapports de concentration entre éléments (rapport des concentrations dans les épidermes ou les parenchymes pour deux éléments, sur le rapport des concentrations dans la solution du sol pour ces deux mêmes éléments) pour les plantes *P2*. 119
- Figure 54.** Photographies en microscopie électronique à transmission (MET) d'une cellule épidermique. 121
- Figure 55.** Photographies en microscopie électronique à transmission de chloroplastes contenant surtout de l'amidon (a) et beaucoup de thylakoïdes (b). 121

Liste des tableaux

Introduction bibliographique

Tableau 1. Applications industrielles et effets sur la santé humaine de quelques polluants métalliques (Cd, Pb, Zn et Ni).	11
Tableau 2. Seuils d'hyperaccumulation et nombres d'espèces hyperaccumulatrices par ETM, d'après Verbruggen <i>et al.</i> (2009).....	14
Tableau 3. Principaux facteurs liés au sol contrôlant le disponibilité des ETM, d'après la synthèse réalisée par (Migeon, 2009).....	19

Chapitre 1

Tableau 4. Principales caractéristiques du sable quartzeux utilisé (Fe_{CBD} = extraction au dithionite dans tampon citrate-bicarbonate, (Mehra & Jackson, 1960).	33
Tableau 5. Analyses en spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X (XPS) des grains de quartz.	33
Tableau 6. Moyennes des surfaces foliaires, des biomasses foliaires et racinaires sèches, et des humidités foliaires pour les hyperaccumulateurs <i>L1</i> et <i>L10</i> prélevés au cours de leurs cinétiques de croissance et de phytoaccumulation du nickel.	43
Tableau 7. Moyennes des transpirations journalières par unité de surface foliaire et des volumes cumulés d'eau transpirée pour les hyperaccumulateurs <i>L1</i> et <i>L10</i> prélevés au cours de leurs cinétiques de croissance et de phytoaccumulation du nickel.	43
Tableau 8. Moyennes des rapports biomasse racinaire sur biomasse aérienne, des surfaces foliaires spécifiques, des rapports d'efficacité d'utilisation de l'eau pour la production de biomasse foliaire et des transpirations journalières par unité de surface foliaire pour les hyperaccumulateurs <i>L1</i> et <i>L10</i> prélevés au cours de leurs cinétiques de croissance et de phytoaccumulation du nickel.	47
Tableau 9. Moyennes des concentrations en Ni dans les feuilles, dans les racines et sur les racines pour les hyperaccumulateurs <i>L1</i> et <i>L10</i> prélevés au cours de leurs cinétiques de croissance et de phytoaccumulation du nickel.	47

Chapitre 2

Tableau 10. Principales caractéristiques du sol sableux utilisé.....	65
Tableau 11. Analyses en spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X (XPS) des grains de quartz.	66
Tableau 12. Paramètres utilisés dans le modèle d'Ingwersen <i>et al.</i> (2006).....	70
Tableau 13. Paramètres d'adsorption/désorption de nickel, du modèle optimisés à partir des différents protocoles d'identification.	79

Chapitre 3

Tableau 14. Résumé des modalités de culture et des études associées à chaque plante	99
--	-----------

Tableau 15. Moyennes des biomasses foliaires totales (BF), des surfaces foliaires totales (SF) et des surfaces foliaires spécifiques (SFS) de <i>P3</i> et <i>P4</i> . Pour les trois feuilles les plus développées : moyennes de leurs biomasses foliaires (BF max) et de leurs caractéristiques écophysiologicalues (AN = assimilation en CO ₂ par unité de surface foliaire, E = transpiration par unité de surface foliaire et EUE = efficacité de l'utilisation de l'eau pour la photosynthèse).	103
Tableau 16. Moyennes des concentrations des principaux éléments minéraux présents dans les feuilles déterminées par analyses EDX sur des pastilles de feuilles broyées comprimées; la concentration en nickel a été déterminée à la fois en MEB-EDX et en ICP-AES, avec une corrélation positive très significative (Ni MEB-EDS = 1,226 Ni ICP-AES, r = 0,994, p < 0,001)).	118
Tableau 17. Principales corrélations inter-élémentaires calculées sur l'ensemble des pastilles de feuilles broyées analysées en MEB-EDX (n = 36).	118

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Madame Laurence DENAIX, Directeur de Recherche, INRA, Bordeaux

Monsieur Pierre Berthomieu, Professeur, SUPAGRO-INRA, Montpellier

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur COINCHELIN David

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Mécanismes et modélisation de l'accumulation foliaire du nickel par
l'hyperaccumulateur *Leptoplax emarginata* "**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Sciences agronomiques** »

Fait à Vandoeuvre, le 04 février 2011

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

Résumé: Des modèles prédictifs de prélèvement d'éléments traces métalliques (ETM) par des plantes hyperaccumulatrices sont à développer pour rendre la phytoextraction opérationnelle. Ce travail a pour objectif de développer, calibrer et valider un modèle biophysique combiné d'accumulation foliaire et de mise en solution du nickel lors de cultures de l'hyperaccumulateur *Leptoplax emarginata* sur un sol fertilisé et contaminé en Ni. Une partie de ce modèle intègre un facteur de bioconcentration lié à la transpiration (TSCF) qui caractérise le mode de transport principal du Ni à travers la racine et jusqu'aux feuilles, lors d'une cinétique couplée de production de biomasse foliaire et de transpiration. Sur des plantes intactes et transpirantes, nous avons déterminé un $TSCF_{Ni}$ supérieur à 1 du fait : (i) d'une grande perméabilité des racines à la fois au nickel et à l'eau et (ii) d'un transport actif du Ni largement prédominant. A l'opposé, le $TSCF_{Ni}$ du blé de Printemps, plante exclusive, était inférieur à 0,02, et le coefficient de réflexion correspondant proche de 1, ce qui caractérise des racines perméables à l'eau mais quasiment pas au nickel. L'exceptionnelle capacité de *L. emarginata* à accumuler et à tolérer le nickel dans ses feuilles, et plus précisément dans ses épidermes, serait également attribuable à ses transpiration et production de protéines soufrées très élevées, tout particulièrement au niveau de ses feuilles les plus jeunes. Enfin, après avoir couplé notre modèle biophysique d'accumulation foliaire du nickel au modèle de mise en solution des ETM développé par Ingwersen *et al.* (2006), nous avons optimisé les paramètres du modèle, notamment les paramètres physico-chimiques, et avons validé notre modèle sur des données cinétiques conjointes de quantités de nickel accumulé dans les feuilles de l'hyperaccumulateur et de concentration en nickel dans la solution du sol. Les perspectives de ce travail sont (i) un approfondissement des relations entre l'accumulation foliaire du nickel (ou d'un autre ETM) par un hyperaccumulateur, la transpiration et la production de protéines soufrées permettant une complexation de l'ETM et (ii) une adaptation du modèle pour le terrain, ce qui nécessite notamment une meilleure utilisation du couplage production de biomasse foliaire/transpiration et une prise en compte des cinétiques d'humectation et de dessiccation du sol (équation de Richards de transport d'eau en conditions non saturées), ce qui conduira à la mise au point d'un modèle 1D (la profondeur du sol) d'accumulation foliaire et de mise en solution d'ETM.

Mots clefs: phytoextraction, hyperaccumulation, nickel, *Leptoplax emarginata*, modélisation biophysique, facteur de bioconcentration, coefficient de réflexion, transpiration

Summary: To make phytoextraction practically feasible, predictive models of metal uptake by hyperaccumulators need to be developed. The aim of this work was to design, calibrate and validate a biophysical combined model of nickel foliar accumulation and availability in soil solution during cultures of the hyperaccumulator *Leptoplax emarginata* on a fertilized and Ni-contaminated sandy topsoil. We succeed in this. Part of the model integrates a transpiration bioconcentration factor (TSCF) which characterized the main Ni transport through the root and to the leaves. We determined a TSCF value greater than 1 for *L. emarginata*, which was attributed to (i) a high root permeability to both Ni and water and (ii) a predominant Ni active transport. By contrast, Spring wheat was characterized by a TSCF value less than 0.02 and a reflection coefficient very near 1, indicating that its roots are permeable to water but quite unpermeable to nickel. The high capacity of *L. emarginata* to tolerate and accumulate Ni in their leaves should also be attributed to its large transpiration and sulfur accumulation, particularly in their youngest leaves. Perspectives of this work are (i) a detailed study on relations between Ni accumulation, transpiration and production of sulphur proteins and (ii) a field adaptation of the model taken into account water transport in unsaturated conditions, leading to design a combined 1D model of nickel foliar accumulation and availability in soil solution.

Keywords: phytoextraction, hyperaccumulation, nickel, *Leptoplax emarginata*, modelling, bioconcentration factor, reflection coefficient, transpiration