

Ecophysiologie de la phytoaccumulation du cadmium pour quelques populations de la plante hyperaccumulatrice Noccaea (Thlaspi) caerulescens

Dimitri Ubersfeld

▶ **To cite this version:**

Dimitri Ubersfeld. Ecophysiologie de la phytoaccumulation du cadmium pour quelques populations de la plante hyperaccumulatrice Noccaea (Thlaspi) caerulescens. Sciences de l'environnement. 2011. hal-01877198

HAL Id: hal-01877198

https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01877198

Submitted on 19 Sep 2018

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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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

Nancy-Université Université Henri Poincaré **2010-2011** Nancy-Université INPL

MASTER FAGE
Biologie et Ecologie pour la Forêt, l'Agronomie et l'Environnement

Spécialité BIPE

Ecophysiologie de la phytoaccumulation du cadmium pour quelques populations de la plante hyperaccumulatrice *Noccaea (Thlaspi) caerulescens*

DIMITRI UBERSFELD

Mémoire de stage, soutenu à Nancy le 06/09/2011

François BARTOLI, Directeur de Recherche, CNRS
Catherine SIRGUEY, Maître de Conférences, INPL/ENSAIA
Christophe ROBIN, Directeur de Recherche, INRA
(Laboratoire Agronomie et Environnement UMR 1121 (ENSAIA) INPL-INRA)

Laboratoire Sols et Environnement UMR 1120
(ENSAIA)INPL-INRA, BP 172
54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex
http://www.lse.inpl-nancy.fr/

Remerciements

Je tiens à présenter mes sincères remerciements à Monsieur François BARTOLI et Madame Catherine SIRGUEY qui m'ont donné l'opportunité de réaliser mon stage au sein de l'équipe « Phytoremédiation des sols contaminés » du laboratoire Sols et Environnement. Leur expérience, leur disponibilité et leur patience sont tout autant de qualités qui m'ont permis d'évoluer dans le monde de la recherche scientifique et d'affirmer mon intérêt pour la phytoremédiation.

De même, je souhaite remercier Monsieur Christophe ROBIN et Monsieur Claude GALLOIS pour leur aide au cours de ce stage.

Je remercie également tous les membres du laboratoire pour leur accueil chaleureux et leur soutien précieux durant ces six mois de stage.

Présentation du Laboratoire Sols et Environnement

Le Laboratoire Sols et Environnement (UMR 1120) est une unité mixte de recherche INPL(ENSAIA)-INRA, localisé à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSAIA) de l'Institut National Polytechnique de Lorraine. Créé en 1994, il est reconnu par l'INPL en 1995 et devient UMR INRA en 1996.

Cette unité accueille aujourd'hui une trentaine de personnes appartenant à l'INPL, l'INRA et le CNRS. Elle comprend 7 enseignant-chercheurs, 3 chercheurs, 4 ingénieurs, 7 personnels techniques et 11 doctorants.

Les recherches du LSE se placent dans un contexte d'anthropisation croissante des sols, conséquence de l'expansion des infrastructures urbaines, industrielles et de transport, ainsi que de l'intensification de l'agriculture. Deux grands thèmes orientent ces recherches : la pédogenèse des sols fortement anthropisés et la phytoremédiation des sols contaminés.

Dans le premier cas, il s'agit principalement de comprendre le fonctionnement et de modéliser l'évolution future des sols très anthropisés, en particulier les Technosols. Inventaire et caractérisation de ces sols sont indispensables à la compréhension de leur fonctionnement et permettent la modélisation des processus pédogénétiques dominants.

Dans le second cas, l'objectif est de développer et d'optimiser des cultures de phytoremédiation. Il s'agit donc de mettre au point des outils d'évaluation de la biodisponibilité des polluants, de prévision de leur transfert vers les plantes ainsi que des modèles pour la conception et le pilotage des cultures sur les sols contaminés par des éléments en traces ou des molécules organiques.

Le LSE est également membre du Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles (GISFI). Celui-ci est un consortium de 12 laboratoires de recherche publique de Lorraine relevant de Nancy-Université (INPL, UHP, Nancy II), de l'université de Metz, de l'INRA, du CNRS, de l'INERIS et du BRGM, spécialisé dans la réhabilitation de friches industrielles. Une station expérimentale, unique en Europe, a été établie en milieu industriel à Homécourt (54) et permet de travailler en conditions réelles, de valider les travaux de laboratoire et de tester de nouvelles solutions de traitement à différentes échelles et en conditions climatiques réelles. Le LSE conduit également des travaux de recherche sur un second site complémentaire localisé en milieu agricole périurbain (domaine expérimental de la Bouzule, centre de référence sécurité et traçabilité des aliments).

Glossaire

ABA : acide abscissique

AG : acide gibbérélique

BA : biomasse aérienne

BF : biomasse foliaire

BR : biomasse racinaire

CAL : sol calaminaire

Cf : concentration dans les feuilles

Csable : concentration dans le sable

EDTA : acide éthylène diamine tétracétique

ENSAIA : Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie

ETM : éléments traces métalliques

EUE : efficacité de l'utilisation de l'eau

GISFI : Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles

ICP-AES : Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy

INPL : Institut National Polytechnique de Lorraine

IRGA : InfraRed Gas Analyzer

LAE : Laboratoire Agronomie et Environnement

LSE : Laboratoire Sols et Environnement

MEEDDTL : ministère de l'Ecologie, du Développement durable, des Transports et du Logement

nF : nombre de feuilles

NM : sol non métallicole

RBC : rapport de bioconcentration

S : sol sur serpentine

SF : surface foliaire

SFS : surface foliaire spécifique

SOL : solution

T : transpiration

TSCF : Transpiration Stream Concentration Factor

UHP : Université Henri Poincaré

Vt : volume cumulé d'eau transpirée

Sommaire

I. Introduction 1

II. Matériels et méthodes 3

A. Matériels 3

1. La plante 3
2. Le substrat 3
3. Les solutions fertilisantes 4

B. Dispositif de culture 4

1. Préparation des pots 4
2. Pré-culture 5
3. Culture 5

C. Données expérimentales 6

1. Mesures des paramètres écophysiologiques des plantes 6
2. Prélèvements et mesures de caractéristiques de croissance 6
3. Analyses des métaux et éléments nutritifs des solutions du sol 7
4. Analyses des métaux et éléments nutritifs des plantes 7

D. Traitements statistiques 7

III. Résultats et discussion 8

A. Germination, croissance et caractéristiques écophysiologiques 8

1. Germination 8
2. Croissance et biomasse foliaire 8
3. Evolution de la transpiration cumulée et de l'efficacité de l'utilisation de l'eau pour la production de biomasse foliaire 9
4. Caractéristiques morphométriques 10
5. Transpiration et photosynthèse 12

B. Accumulation des métaux et des éléments nutritifs Ca et Mg dans les feuilles 14

C. Concentrations en métaux et en éléments nutritifs des solutions 16

D. Bilans biogéochimiques 19

E. Facteurs de bioconcentration 19

IV. Conclusions 23

V. Références bibliographiques 24

Annexes

I. Introduction

Les éléments traces métalliques (ETM) sont présents naturellement au sein de la croûte terrestre et des organismes vivants. De nombreuses activités anthropiques, comme la sidérurgie, les pratiques agricoles, conduisent à une augmentation environnementale de leurs concentrations. Ainsi, 4186 sites pollués seraient recensés en France (MEEDDTL, 2009), dont sept des dix polluants les plus rencontrés sont des ETM. Ces pollutions peuvent engendrer des problèmes environnementaux, généralement à long terme, mais également des problèmes de santé publique à court terme. Ainsi, certaines cultures agricoles, poussant sur ces sols pollués, peuvent accumuler les ETM, et contaminer toute la chaîne alimentaire. Bien que les sols pollués soient de plus en plus nombreux, avec diverses sources de polluants, l'agriculture se doit de produire des végétaux non contaminés en ETM.

La dépollution et la réhabilitation des sols pollués par les ETM sont donc des enjeux majeurs. De nombreuses méthodes pour remédier à ces pollutions sont des procédés physico-chimiques, qui permettent un traitement rapide de la pollution, mais nécessitent une excavation de la terre considérée. Ceci n'est envisageable que dans le cas de contaminations locales de surfaces relativement faibles. A l'opposé, ce mode de dépollution est quasiment impossible à appliquer dans le cas des contaminations diffuses, les surfaces contaminées pouvant s'étendre sur plusieurs km^2 (par exemple les sols de la Région Nord Pas de Calais contaminés en cadmium, plomb et zinc, à partir d'une source industrielle (Métaleurop) de pollution atmosphérique). Pour ces grandes surfaces contaminées, les traitements chimiques deviennent trop coûteux à mettre en œuvre. Ainsi, des méthodes biologiques, par utilisation de bactéries et/ou de plantes, seraient une alternative pour y remédier.

L'utilisation de plantes hyperaccumulatrices est un procédé biologique de dépollution des sols contaminés en ETM comme le cadmium, le zinc ou le plomb (Chaney, 1983 cité par Sirguey, 2004). Cette remédiation consiste à réaliser des cultures, successives dans le temps, de ces plantes qui absorbent et hyperaccumulent les métaux en grande quantité dans leurs parties aériennes. Cette technique n'est cependant pas opérationnelle du fait de la petite taille des plantes hyperaccumulatrices, de la forte diversité d'hyperaccumulation intraspécifique, et du peu de pratiques agronomiques de la phytoextraction. Les plantes hyperaccumulatrices de cadmium appartiennent à la famille des Brassicaceae, et ne sont représentées que par les genres *Noccaea* et *Arabidopsis*. Elles se développent sur les sites naturels, riches en métaux, et sur les gisements miniers. Un seuil de 0,01% de Cd dans la biomasse aérienne sèche a été défini pour qualifier une plante comme hyperaccumulatrice de Cd (Brooks *et al*., 1977). Aucun rôle physiologique du Cd n'est connu à ce jour sur les organismes vivants. Seules les plantes hyperaccumulatrices de Cd peuvent absorber et tolérer de fortes concentrations à l'aide de transporteurs actifs (Bernard *et al.*, 2004), de mécanismes de stockage au niveau des organes foliaires (Matthew *et al.*, 2008) et de mécanismes de détoxication (Mari *et al.*, 2006; Clemens, 2006). La transpiration, couplée à la production de biomasse foliaire, ainsi que le mode de transport actif prédominant du métal dans la plante, constituent pourrait être un des mécanismes écophysiologiques impliqués dans l'hyperaccumulation des ETM, (Hopmans and Bristow, 2002; Coinchelin, 2011) notamment en tant que moteur de la translocation des ETM des parties racinaires vers les parties aériennes.

La phytoextraction d'ETM par des plantes hyperaccumulatrices n'est cependant pas opérationnelle du fait de la petite taille de ces plantes et de la forte diversité d'hyperaccumulation intraspécifique. Ces plantes étant allogames ou autogames, selon les conditions locales de reproduction, elles ont ainsi une forte variabilité génétique intraspécifique, comme cela a été montré pour le tabouret calaminaire *Noccaea (Thlaspi)*

caerulescens (Escarré *et al*., 2000; Reeves *et al*., 2001; Dubois *et al*., 2002; Frérot *et al*., 2002; Meerts *et al*., 2003; Zha *et al*., 2004; Basic *et al*., 2006a, 2006b; Schwartz *et al*., 2006; Besnard *et al.*, 2009). Il est donc essentiel de choisir les bonnes populations voire les bons individus de l'espèce hyperaccumulatrice choisie puis de les domestiquer afin d'augmenter largement la phytoextraction, en la rendant beaucoup moins variable. Ce travail de recherche est lié à cet enjeu. Enfin, le phytoextraction n'est pas encore opérationnelle du fait du peu de pratiques agronomiques (irrigation, fertilisation) de la phytoextraction.

L'objectif de mon stage est de participer au choix raisonné d'une population de *Noccaea caerulescens* la plus performante pour tolérer et accumuler de grande quantité de Cd. Afin de répondre à mon objectif principal, des objectifs secondaires ont été définis**:**

- **mesurer la capacité d'hyperaccumulation du Cd de chaque population et la relier à leurs caractéristiques écophysiologiques (croissance, échanges gazeux) et à leurs caractéristiques de bioconcentration, attribuables à leur identité génétique associée aux transporteurs de Cd,**
- **étudier l'impact d'une contamination au Cd sur les caractéristiques écophysiologiques et la nutrition de chaque population.**

Deux hypothèses sont à tester pour répondre à mes objectifs :

- **une hyperaccumulation de Cd plus importante serait expliquée par:**
  - **une efficacité de l'utilisation de l'eau (EUE) plus élevée pour la production de biomasse foliaire (BF) ou pour la photosynthèse (assimilation de CO_2), l'eau non utilisée pour la photosynthèse étant alors utilisée pour le transport du métal (écophysiologie intrinsèque à chaque population)**
  - **par un transport actif du Cd plus élevé**
- **pour chaque population, le Cd aurait un effet positif sur la croissance et sur l'absorption d'éléments nutritifs.**

Les travaux de ce stage sont constitués d'une expérimentation en conditions contrôlées de laboratoire, d'une durée de 83 jours. Pour ce faire, nous avons choisi la plante hyperaccumulatrice *Noccaea caerulescens* pour sa capacité à hyperaccumuler le Cd, ETM étudié dans ce cas précis. Du fait de leur diversité génétique à hyperaccumuler le Cd (Scharwtz *et al.*, 2006), quatre populations contrastées ont été choisies. La culture s'est déroulée en sol sableux fertilisé, contaminé ou non en Cd, à une humidité volumétrique et conditions climatiques contrôlées. Des paramètres morphométriques (diamètre de la rosette, nombre de feuilles) ont été mesurés chaque semaine. Trois prélèvements ont été effectués afin de déterminer les concentrations et les quantités en métaux et éléments nutritifs dans les feuilles ainsi que dans la solution du sable. De manière concomitante, des mesures de croissance végétale (biomasse aérienne et racinaire, humidité foliaire et racinaire, surface foliaire totale) ont été adjointes aux analyses chimiques. Des mesures de transpiration ont été effectuées quotidiennement par pesées, ainsi que des mesures d'échanges gazeux à l'échelle de la plante entière, sous l'encadrement de C. Robin (Laboratoire Agronomie et Environnement, INPL/INRA).

Ce mémoire est organisé de la façon suivante. Après une présentation des matériels et des analyses effectuées, nous évoquerons successivement nos résultats sur (**1**) la germination, la croissance et les caractéristiques écophysiologiques des plantes, (**2**) l'accumulation des métaux et des éléments nutritifs dans les feuilles, (**3**) les concentrations en métaux et en éléments nutritifs des solutions, (**4**) les bilans biogéochimiques et (**5**) les facteurs de bioconcentration.

II. Matériels et méthodes

A. Matériels

1. La plante

Noccaea caerulescens (figure 1) est une plante de la famille des Brassicaceae qui a pour particularité d'hyperaccumuler plusieurs ETM tels que Cd, Ni et Zn. Elle présente une large répartition sur le territoire français (figure 2, d'après Reeves *et al.*, 2001). C'est une plante poussant en forme de rosette, dont les fleurs sont présentées sur une hampe. Quatre populations ont été sélectionnées afin de **participer au choix raisonné d'une population de *N.caerulescens* la plus performante pour tolérer et accumuler de grande quantité de Cd :**

- deux populations métallicoles originaires de deux sites calaminaires miniers: **CAL1** (Durfort, Massif Central) qui hyperaccumule le plus d'après des travaux récents effectués au LSE et **CAL2** (Ganges, Massif Central) très étudiée au niveau des mécanismes de l'hyperaccumulation (Dessureault-Rompré *et al.*, 2010; Ueno *et al.*, 2011)

- une population développée sur un sol serpentinique: **S** (Fellering, Vosges)

- une population non métallicole: **NM** (Geishouse, Vosges)



Figure 1 : *Noccaea caerulescens* (feuilles et hampe florale) en milieu naturel.

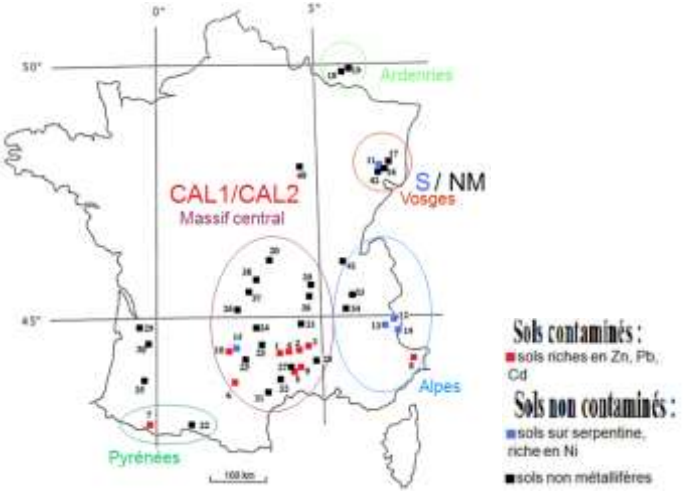


Figure 2 : Localisation des populations de *Noccaea caerulescens* sur le territoire français (d'après Reeves *et al.*, 2001)

2. Le substrat

Le milieu de culture utilisé était un sable de quartz calibré (tableau 1) (HN 0,4-0,8 mm, Sibelco (site de Hostun), France). Ce sable a la particularité d'être très poreux (porosité de 0,45 cm^3 cm^{-3}), très drainant, et peu réactif au niveau physico-chimique (revêtements de fer sur une partie des surfaces des grains de quartz, Coinchelin, 2011).

Tableau 1 : Principales caractéristiques du sable quartzeux utilisé

Distribution granulométrique	Argiles Limons Sables	7 0 993	g kg^{-1}
Porosité totale		0,45	cm^3 cm^{-3}
Teneur en eau résiduelle à 0kPa		0,42	cm^3 cm^{-3}
Fe		0,41	g kg^{-1}
$CaCO_3$		<1	g kg^{-1}
pH à l'eau		8,09	
Carbone organique		0,062	g kg^{-1}

3. Les solutions fertilisantes

Une solution nutritive (**SOL1**) a été préparée suivant la composition suivante (en mg L^{-1} avec entre parenthèse le sel utilisé) : 80,16 Ca ($Ca(NO_3)_2$, $4H_2O$) ; 24,31 Mg ($MgSO_4$, $7H_2O$) ; 12,388 P (KH_2PO_4) ; 15,636 K (KH_2PO_4) ; 1,117 Fe ($C_{10}H_{12}FeN_2NaO_8$, $3H_2O$) ; 0,005494 Mn ($MnSO_4$, H_2O) ; 0,6539 Zn ($ZnSO_4$, $7H_2O$) ; 0,1081 B (H_3BO_3) ; 0,006355 Cu ($CuSO_4$, $5H_2O$) ; 0,019188 Mo (Na_2MoO_4, $2H_2O$) ; 0,029345 Ni ($NiSO_4$, $7H_2O$). La composition de cette solution s'est inspirée de celle préconisée par Küpper *et al.* (2007) pour cultiver *Noccaea caerulescens* en hydroponie, avec les mêmes concentrations pour Fe, Mn, Zn, B, Cu, Mo et Ni, des concentrations deux fois plus élevées pour Ca, Mg, K, N (uniquement sous forme de NO_3), près de deux fois plus élevées pour S, et huit fois plus élevées pour P. Une deuxième solution nutritive (**SOL2**) a été réalisée sur la base de la solution SOL1 à laquelle du Cd a été ajouté à la hauteur de 5,62 mg L^{-1} sous forme de $(CdSO_4)_3$, $8H_2O$.

B. Dispositif de culture

1. Préparation des pots

Les cultures ont été réalisées dans des pots en terre cuite d'un volume de 0,795 L préalablement tapissés d'un sac plastique pour éviter le drainage. Chaque pot a été rempli à hauteur de 1,268 kg de sable et légèrement tassé afin d'obtenir une porosité de 40 cm^3 cm^{-3}. Un volume de 159 mL de SOL1 a été ajouté pour obtenir une humidité volumétrique de 20 % pour les pots non contaminés en Cd. Un ajout similaire de SOL2 a été réalisé pour les pots contaminés en Cd. Afin de limiter l'évaporation, chaque pot a été recouvert par un film plastique blanc, opaque, percé en son centre d'un trou de 1 cm de diamètre pour permettre la croissance de la plante (figure 3). Un second trou, à équidistance entre le bord du pot et le trou central, a recueilli le dispositif d'arrosage permettant l'irrigation des plantes (figure 4). Des pots similaires, sans plantes, ont été réalisés en tant que témoin pour mesurer l'évaporation liée au dispositif et la composition de la solution en absence de plante.



Figure 3 : Pots de culture non plantés avec et sans dispositif

2. Pré-culture

70 graines de chaque population ont été mises à germer dans des bacs de germination remplis de 7,4 kg de sable humidifié avec 4,5 L de solution SOL1 diluée au demi. Ces bacs ont été placés en phytotron pour une durée de 25 jours, à l'obscurité durant les cinq premiers jours, puis découverts dès le début de la germination. Une photopériode de 16 h/jour a été appliquée, à une température variant de 22°C en période diurne à 18°C en période nocturne. Une irrigation avec de l'eau déminéralisée a été réalisée quotidiennement en fin de période nocturne.

3. Culture

A la fin de la pré-culture, les plantules ont été repiquées dans les dispositifs de culture, en phytotron. Des modalités contaminés (+Cd) ou non (-Cd) en cadmium ont été réalisés avec les pots plantés et leurs pots témoins. Du fait de l'absence de germination des populations NM et S, deux prélèvements (quatre répétitions par pot) des populations CAL1 et CAL2 ont été ajoutés aux dates 62 et 76 jours de culture (pour chaque temps, quatre répétitions par population/traitement), après repiquage initial de plantules aux stades 6 et 4 feuilles. Un prélèvement final à 83 jours (huit répétitions par pot) a été réalisé sur l'ensemble des plantes restantes. Une étude de la luminosité du phytotron, par mesure du PAR (*Photosynthetically Active Radiation*), a permis de mettre en évidence une hétérogénéité de ce paramètre. De ce fait, un dispositif en 8 blocs (avec une répartition tiré au sort pour la localisation de chaque pot dans chaque bloc, annexe 1) a été réalisé afin d'obtenir le maximum de puissance statistique dans le traitement des données (figure 4).

Les conditions climatiques du phytotron étaient une hygrométrie de 40 %, une photopériode de 16 h/jour avec une intensité lumineuse moyenne de 196 µmol photons m^{-2} s^{-1} et des températures de 24°C jour/18°C nuit. Un capteur (annexe 2) enregistrait en continu l'intensité lumineuse, la température et l'hygrométrie, avec un pas de temps de 40 minutes. L'évapotranspiration de chaque plante est mesurée par pesée. Chaque pot est irrigué tous les deux jours avec la solution SOL1 de façon à atteindre une humidité volumétrique de 20 %. L'évaporation est calculée comme la masse moyenne d'eau perdue par les pots témoins sans plantes par unité de temps. De façon similaire, l'évapotranspiration des plantes est calculée en soustrayant l'évaporation moyenne des pots témoins sans plante à celle des pots plantés. Aucune correction de l'évaporation n'a été apportée sur les pots plantés après 57 jours du fait du recouvrement du trou central par la plante. Une correction finale a été enfin apportée en soustrayant la matière fraîche de la plante afin d'obtenir la transpiration.



Figure 4 : Vue d'ensemble du phytotron à 38 jours après repiquage (blocs 5 à 7)

C. Données expérimentales

1. Mesures des paramètres écophysiologiques des plantes

La croissance des plantes a été mesurée toutes les semaines à l'aide de plusieurs paramètres morphométriques non destructifs : diamètre de la rosette, nombre de feuilles, et longueur de la plus grande feuille. Des mesures d'assimilation en CO_2 et de transpiration foliaire ont également été réalisées, au début de la période diurne, à l'aide d'un analyseur à infrarouge (InfraRed Gas Analyzer, figure 5). Deux IRGA sont présents au sein du dispositif de sorte à analyser séparément l'air entrant et l'air sortant. La chambre de mesure, construite pour mon stage (collaboration C. Gallois, LAE) permet les mesures d'échanges gazeux sur toute la partie aérienne de la plante. Lors des mesures, les plantes sont disposées sous la même lampe du phytotron.

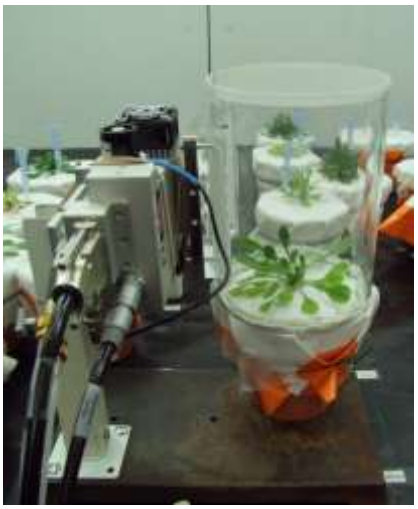


Figure 5 : Dispositif de mesures d'échanges gazeux sur une plante entière

2. Prélèvements et mesures de caractéristiques de croissance

Les prélèvements de plantes et de solutions ont été réalisés le lendemain d'irrigation aux $62^{ème}$, $76^{ème}$ et $83^{ème}$ jours de culture. Ont été mesurés : la surface foliaire (SF), la biomasse aérienne fraîche et sèche (BF), ainsi que la biomasse racinaire sèche. La biomasse aérienne du tabouret calaminaire est quasiment exclusivement foliaire du fait de son organisation en rosette. La surface foliaire a été mesurée sur le matériel végétal frais à l'aide d'un planimètre. Les biomasses foliaires récoltées ont été pesées avant et après passage à l'étuve à 70°C durant

48 h (BF). La teneur en eau des feuilles a été calculée ainsi que la surface foliaire spécifique (rapport de la surface foliaire totale sur la biomasse foliaire sèche) et le rapport entre les biomasses foliaire et racinaire.

3. Analyses des métaux et éléments nutritifs des solutions du sol

Les solutions du sol ont été prélevées après récolte, soit à 62, 76 et 83 jours de culture. L'extraction est réalisée sur 250 cm^3 de sable à l'aide d'un Büchner relié à une pompe à vide délivrant une dépression de -45 kPa (figure 6), le temps nécessaire à l'obtention de chaque solution étant de l'ordre de la demi-heure. Au cours de cette extraction, les solutions sont filtrées à 0,45 µm sur une membrane en acétate de cellulose disposée sur un verre fritté formant la base de la colonne de sable. Les pH des solutions ont été mesurés après l'extraction. Les analyses de métaux et d'éléments nutritifs ont été réalisées par ICP-AES (Liberty II, Varian), après acidification de ces solutions.



Figure 6 : Dispositif d'extraction et de filtration de solution du sable par dépression

4. Analyses des métaux et éléments nutritifs des plantes

Les parties aériennes sèches ont été broyées finement dans un broyeur à mortier en agate. Les échantillons ont par la suite été minéralisés afin de mettre en solution les éléments minéraux des feuilles (8 mL de HNO_3 et 4 mL de H_2O_2 pour une attaque à froid, puis à chaud à l'aide d'un bloc thermostaté ; DigiPREP SCP Sciences, annexe 3). Les mesures de métaux et d'éléments nutritifs ont été réalisées par ICP-AES (Liberty II, Varian).

D. Traitements statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel XLStat 2010. L'effet de la contamination en Cd et de la population sur les paramètres étudiés a été testé en réalisant des analyses de la variance à un ou deux facteurs, suivi du test de Fischer avec un risque d'erreur α de 0,05 et $p < 0,05$. Les résultats des analyses statistiques sont présentés dans les tableaux et figures en adjoignant une lettre aux valeurs présentées. Les données suivies d'une même lettre ne présentent pas de différence statistiquement significative au seuil de probabilité 0,05 (ou proche, mais inférieur à 0,1).

III. Résultats et discussion

A. Germination, croissance et caractéristiques écophysiologiques

1. Germination

D'après le tableau 2, nous remarquons des différences au niveau des taux de germination des populations NM, S, CAL1 et CAL2 avec respectivement 3, 0, 54 et 57 %. Les résultats montrent une hétérogénéité de ce paramètre, avec un taux de germination nul ou négligeable pour les populations non calaminaires. Des essais de levée de dormance par vernalisation ont été effectués sans succès. D'après Cadman *et al.* (2006) l'utilisation d'acide gibbérélique (AG) servirait à lever la dormance chez une plante proche de *Noccaea caerulescens* ou *Arabidopsis thaliana*. Ainsi, il est possible que les graines des populations NM et S aient une balance hormonale AG/ABA en faveur de l'acide abscissique (ABA). Un ajout d'AG pourrait peut-être permettre la germination de ces deux populations récalcitrantes.

Tableau 2 : Taux de germination des graines des différentes populations *N. caerulescens* : NM = non métallicole, S = sol sur serpentine, CAL = site calaminaire (CAL1 Durfort, Massif Central et CAL2 Ganges, Massif Central).

Population	Nombre de graines semées	Nombre de plantules obtenues	Taux de germination après 25 jours
NM	70	2	3%
S	70	0	0%
CAL1	70	38	54%
CAL2	70	40	57%

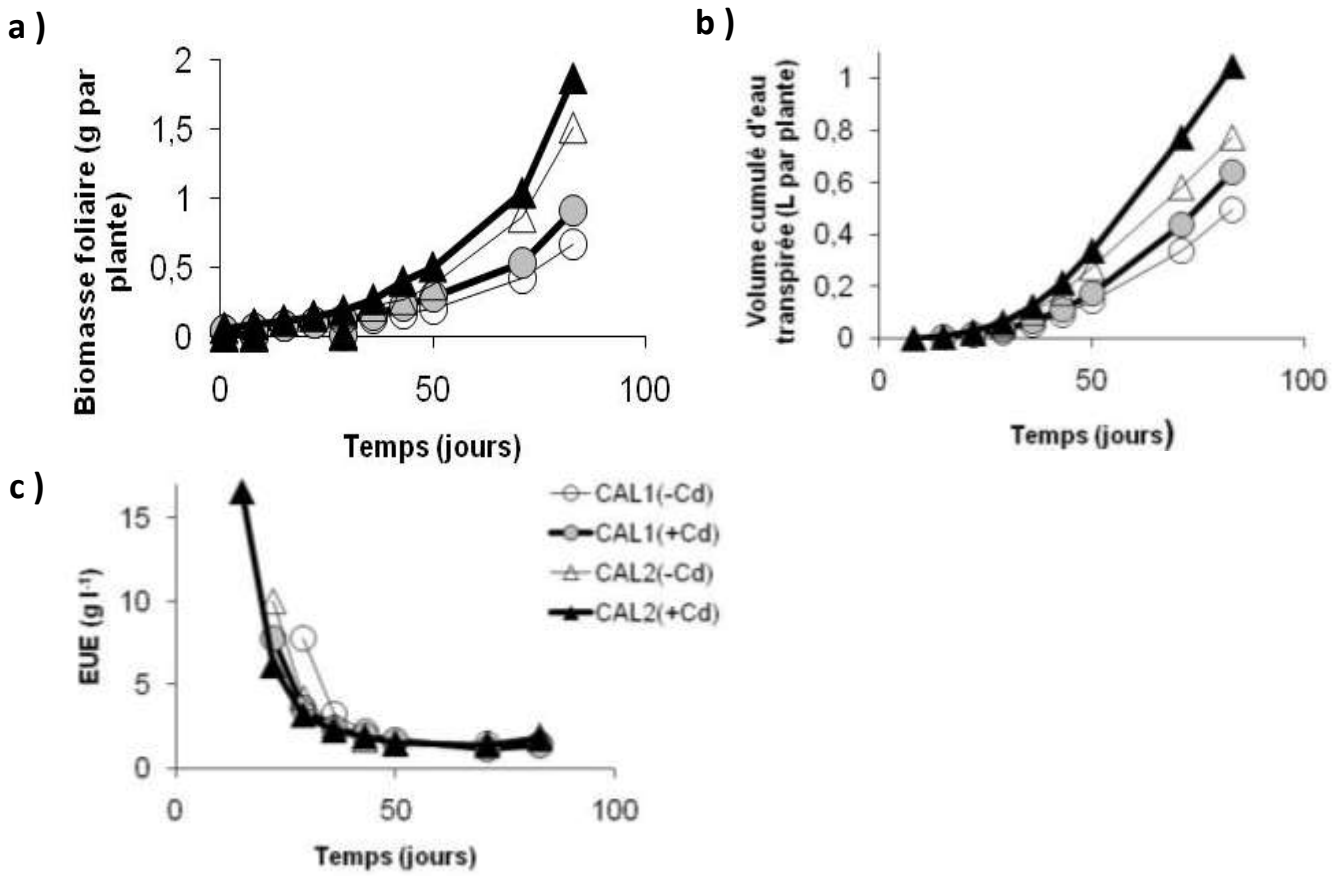
2. Croissance et biomasse foliaire

Initialement, les plantules des populations CAL1 et CAL2 prélevées en fin de culture avaient le même nombre de feuilles (7 plantules sur 8 au stade 6 feuilles) et une biomasse foliaire moyenne équivalente (6,0 mg et 5,9 mg, respectivement). Hormis quelques symptômes de chlorose pour quelques plantes, qui se sont estompés au cours du temps, toutes les autres plantes se sont très bien développées (figure 7a).

Les biomasses foliaires (BF) de toutes les plantes prélevées ont été corrélées à leurs nombres de feuilles (nF), avec deux corrélations positives discriminant les deux populations, sans effet traitement (pour CAL1 (-Cd et +Cd) : $BF = 0{,}0104\ nF$, $r = 0{,}801$, $n = 29$, $p < 0{,}001$; pour CAL2 (-Cd et +Cd) : $BF = 0{,}0071\ nF$, $r = 0{,}860$, $n = 26$, $p < 0{,}001$). Ces droites de régression d'étalonnage nous ont ainsi permis de quantifier les évolutions des biomasses foliaires des plantes prélevées en fin de culture. Les deux populations se différencient nettement, avec une croissance bien plus rapide pour CAL2 que pour CAL1 et une tendance, pour chacune de ces deux populations de *N. caerulescens*, à une meilleure croissance lorsque le sable de culture fertilisé a été contaminé en Cd (figure 7a). En fin de culture, les biomasses foliaires des plantes de la population CAL2 sont ainsi significativement plus élevées que celles de la population CAL1, avec respectivement 1,51 g et 1,87 g pour CAL2 (-Cd) et CAL2 (+Cd), et 0,75 g et 0,91 g pour CAL1 (-Cd) et CAL1 (+Cd), l'effet contamination en Cd n'étant pas significatif, bien qu'observé (figure 7e).

3. Evolution de la transpiration cumulée et de l'efficacité de l'utilisation de l'eau pour la production de biomasse foliaire

La figure 7b présente les évolutions des volumes cumulés d'eau transpirée par les plantes prélevées en fin de culture. Celles ci sont comparables aux évolutions de leurs biomasses foliaires (figure 7a) mais la discrimination entre les deux populations de *N. caerulescens* est moins nette. L'efficacité de l'utilisation de l'eau (EUE) pour la production de biomasse foliaire (aérienne) se définit comme le rapport de la biomasse foliaire (aérienne) produite sur le volume cumulé d'eau transpirée correspondant. La figure 7c montre que les évolutions des EUE de toutes les plantes étudiées sont similaires, avec une décroissance jusqu'au seuil de croissance de près de 40 jours précédemment observé (figure 7a), à partir duquel les valeurs d'EUE sont relativement constantes et proches de 1,4 à 2,0 g L^{-1}, selon les populations (figures 7c et 9b). Ceci met en évidence une photosynthèse marquée en début de culture suivi d'un couplage photosynthèse/transpiration « à l'équilibre ».



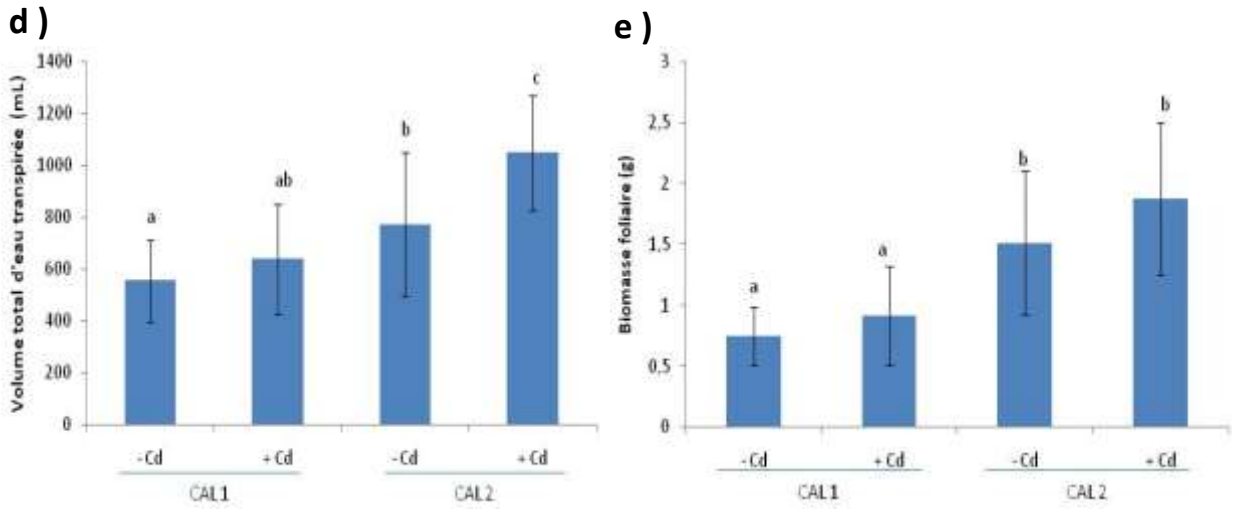


Figure 7 : Evolution, au cours de la culture, de la biomasse foliaire (a), du volume cumulé d'eau transpiré (b) et de l'efficience de l'utilisation de l'eau (EUE) pour la production de biomasse foliaire (c) des plantes des populations de *N. caerulescens* CAL1 et CAL2 cultivées sur du sable fertilisé avec (+Cd) et sans (-Cd) cadmium et prélevées le dernier jour de culture (seules les moyennes ont été utilisées par souci de clarté); leur volume cumulé d'eau transpiré pendant toute la culture (d) et leur biomasse foliaire correspondante (e).

4. Caractéristiques morphométriques

Le nombre de feuilles par gramme de biomasse foliaire permet de distinguer significativement les populations CAL1 et CAL2, avec des nombres moyens de feuilles par gramme de biomasse foliaire de 145 et 96 respectivement (figure 5a). Le nombre de feuilles par gramme de biomasse foliaire se révèle donc être un paramètre écophysiologique prometteur pour différencier et classer les populations de *N. caerulescens*, en croisant ces résultats avec leurs capacités à phytoextraire le Cd et le Zn. Il n'y a par contre pas de différence significative de surface foliaire spécifique (SFS) entre les deux populations calaminaires (figure 8b). CAL1 a néanmoins tendance à avoir une SFS plus importante, avec une valeur moyenne de 140 $cm^2\ g^{-1}$, contre 124 $cm^2\ g^{-1}$ pour CAL2. Cela indiquerait que CAL1 aurait des feuilles plus fines que CAL2.

Le rapport de la biomasse racinaire par la biomasse aérienne (foliaire) (BR/BA) décrit le mode d'allocation du carbone organique des parties aériennes aux racines. Ce rapport BR/BA ne permet pas de distinguer les deux populations de *N. caerulescens* étudiées (figure 8c). Il est à noter tout de même que parmi la population CAL1. Les plantes ayant reçdu du cadmium ont un rapport plus élevé (0,51) que celles n'en ayant pas reçu (0,36). Cela indiquerait une croissance accrue du système racinaire en présence de Cd pour CAL1. De même, nous avons également observé que la biomasse sèche aérienne a tendance à augmenter en présence de Cd (figure 7e). A l'opposé, pour la population CAL2, le rapport tend à diminuer en présence de Cd, avec 0,39 contre 0,46 sans Cd. Pour d'autres populations de *N. caerulescens*, le rapport BR/BA varie généralement de 0,1 à 0,5 (Sirguey, 2004 ; Wojcik *et al.*, 2005 ; Küpper and Kochian, 2010), ce qui est du même ordre de grandeur que les valeurs de BR/BA que nous avons déterminé. Ceci indiquerait que *N. caerulescens*, comme d'autres plantes hyperaccumulatrices d'ETM, aurait une stratégie de production de biomasse foliaire prioritaire afin sans doute de mieux phytoaccumuler les ETM dans les feuilles.

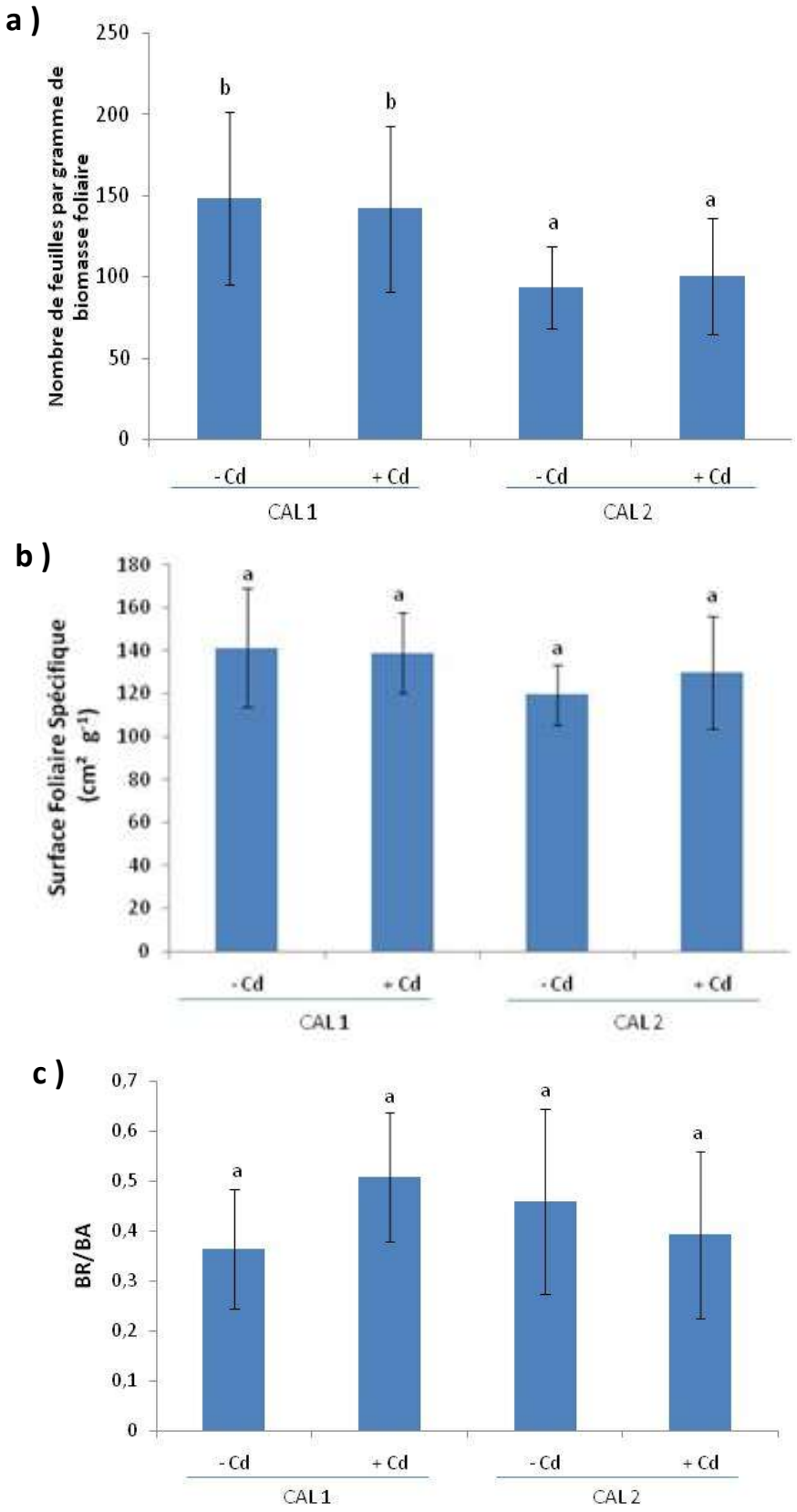


Figure 8 : Evolution des caractéristiques morphométriques des plantes des deux populations *N. caerulescens* CAL1 et CAL2 cultivées sur du sable fertilisé avec (+Cd) et sans (-Cd) cadmium : nombre de feuilles par gramme de biomasse foliaire (a), surface foliaire spécifique (b) et rapport entre la biomasse racinaire et la biomasse aérienne (foliaire) (c).

5. Transpiration et photosynthèse

A l'issue de la culture (jour 83), le volume cumulé d'eau transpirée est significativement plus élevé pour les plantes de la population CAL2 (respectivement 772 et 1047 mL sans et avec Cd) par rapport à la population CAL1 (respectivement 556 et 638 mL sans et avec Cd) (figure 7d). Il faut aussi noter que les plantes CAL2 (+Cd) ont significativement plus transpiré que leurs homologues CAL2 (-Cd) (figure 7d). Cet effet cadmium est également observé pour les plantes CAL1 mais il n'est pas significatif.

Lors du dernier jour de culture, la transpiration de chaque plante normalisée à sa biomasse foliaire (T/BF) est significativement plus importante pour la population CAL1 (29 mL g^{-1} j^{-1} sans et avec Cd) que pour la population CAL2 (respectivement 15 et 19 mL g^{-1} j^{-1} sans et avec Cd) (figure 9a). Ce paramètre paraît donc très pertinent pour différencier des populations de *N. caerulescens*. Ces valeurs sont plus élevées que celles mesurés par Whiting *et al.* (2003) lors d'une culture en hydroponie d'une population de *N. caerulescens* du Derbyshire (Royaume Uni), avec respectivement des valeurs de T/BF de 11,4 et 11,5 mL g^{-1} j^{-1} sans et avec Cd. Ces résultats sont confirmés par les mesures du flux de transpiration foliaire par IRGA le dernier jour de culture (figure 5) qui révèlent que les plantes CAL1 (0,68 mmol H_2O m^{-2} s^{-1} pour CAL1, avec et sans Cd) transpirent significativement plus que les plantes CAL2 (respectivement 0,45 et 0,38 mmol H_2O m^{-2} s^{-1} sans et avec Cd) (figure 9d).

Par contre, aucune différence significative de l'assimilation en CO_2 n'a été observée entre la population CAL1 (respectivement 2,42 et 2,51 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} sans et avec Cd) et la population CAL2 (respectivement 2,24 et 1,85 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} sans et avec Cd) (figure 9c). Néanmoins, les plantes CAL1 ont tendance à avoir une assimilation en CO_2 légèrement supérieure aux plantes CAL2.

L'EUE pour la production de biomasse foliaire des plantes CAL2 (respectivement 1,96 et 1,77 g L^{-1} sans et avec Cd) est significativement plus élevée que celles des plantes CAL1, quelque soit le niveau de Cd (respectivement 1,42 et 1,40 g L^{-1}) (figure 9b). Sans être significatif, l'apport de Cd aux plantes tendrait à diminuer l'EUE pour la production de biomasse foliaire. Ceci s'expliquerait par une augmentation plus élevée de la transpiration que de la production de biomasse (figures 7d et 7e). De façon convergente, mais à une toute autre échelle de temps, l'EUE pour la photosynthèse des plantes CAL2 (respectivement 5,01 et 4,95 µmol CO_2 $mmol^{-1}$ H_2O sans et avec Cd) est significativement plus élevée que celles des plantes CAL1 (respectivement 3,76 et 4,13 µmol CO_2 $mmol^{-1}$ H_2O sans et avec Cd), quelque soit le niveau de Cd (figure 9e).

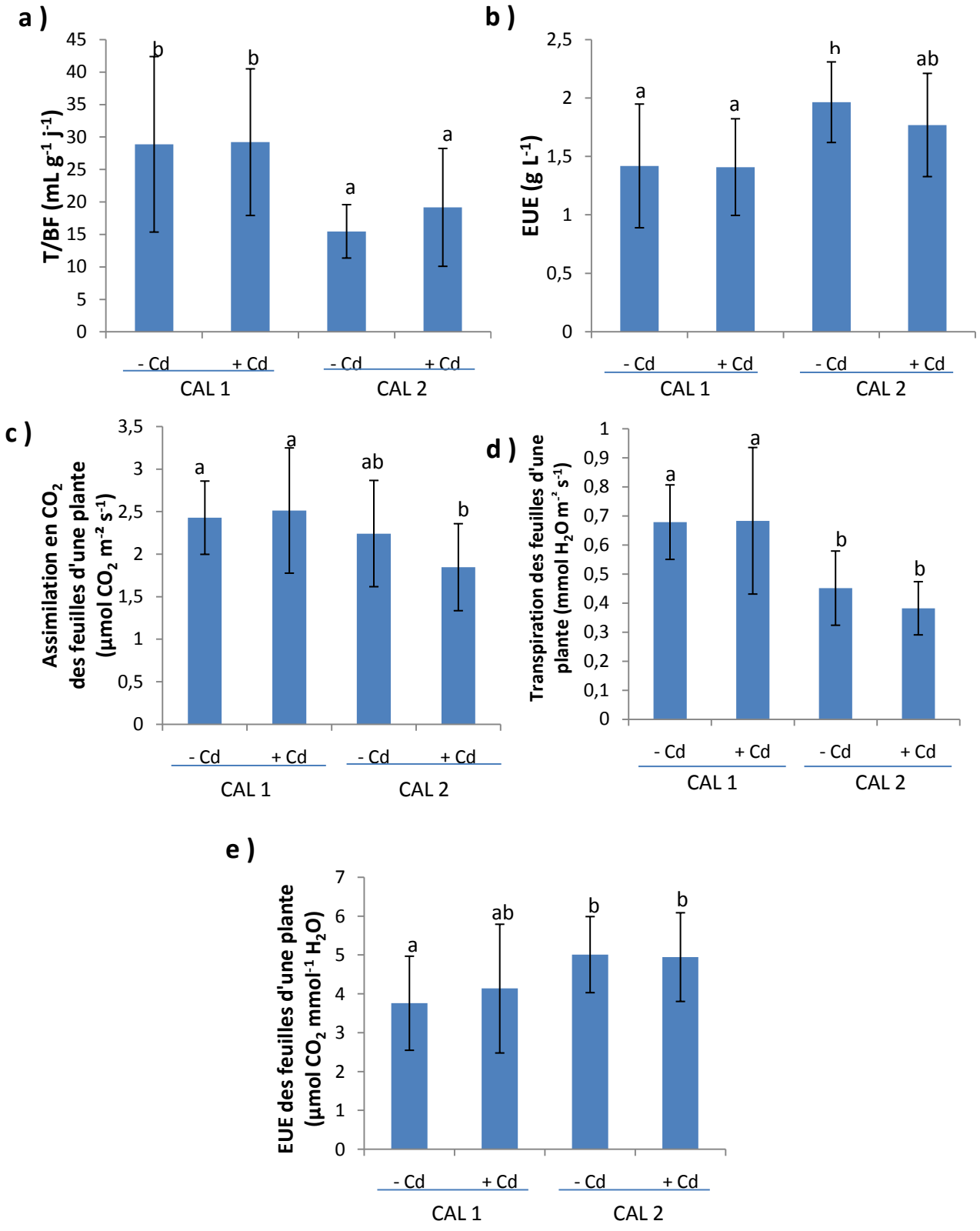


Figure 9 : Transpiration et photosynthèse, lors du dernier jour de culture, des plantes des populations de *N. caerulescens* CAL1 et CAL2 cultivées sur du sable fertilisé avec (+Cd) et sans (-Cd) cadmium (a : transpiration d'une plante normalisée à sa biomasse foliaire; c : assimilation en CO_2 par unité de surface foliaire pour toutes les feuilles d'une plante; d : transpiration correspondante et e : efficience de l'utilisation de l'eau (EUE) pour la photosynthèse) et EUE pour la production de biomasse foliaire = rapport de la biomasse foliaire d'une plante sur son volume cumulé d'eau transpiré pendant toute la culture (b).

B. Accumulation des métaux et des éléments nutritifs Ca et Mg dans les feuilles

Les résultats présentés dans la figure 10a ne montrent pas de différence significative pour les concentrations en Cd dans les feuilles des populations CAL1 (+Cd) et CAL2 (+Cd), avec respectivement 381 et 378 µg Cd g^{-1}. Ces valeurs sont largement supérieures au seuil d'hyperaccumulation de Cd de 100 µg Cd g^{-1} défini par Brooks *et al*. (1977). Les biomasses foliaires de la population CAL2 étant significativement plus élevées que celles de la population CAL1 (figure 7e), les quantités de cadmium foliaire sont significativement plus importantes pour CAL2 (+Cd) (698 µg par plante) que pour CAL1 (+Cd) (361 µg par plante) (figure 10c).

La concentration en zinc foliaire (figure 10a) est significativement plus élevée pour la population CAL2 (-Cd) (185 µg Zn g^{-1}) que pour la population CAL1 (-Cd) (129 µg Zn g^{-1}), et plus élevée, mais sans différence significative, pour la population CAL2 (+Cd) (197 µg Zn g^{-1}) que pour la population CAL1 (+Cd) (168 µg Zn g^{-1}), ce qui serait attribuable à une compétition entre le cadmium et le zinc pour leur phytoextraction, au détriment de ce dernier. Au niveau quantitatif, de par sa biomasse supérieure, CAL2 hyperaccumule significativement davantage de Zn que CAL1, avec des quantités respectives de Zn phytoextrait de 377 et 183 µg pour CAL2, et de 161 et 95 µg pour CAL1, avec et sans Cd respectivement (figure 10c).

Concernant les concentrations en Fe dans les feuilles, aucune différence significative n'est observée (figure 10a). Les deux populations CAL1 et CAL2 ont tout de même tendance à accumuler dans leurs feuilles plus de Fe en présence de Cd (respectivement 34 et 42 µg Fe g^{-1}) qu'en son absence (respectivement 28 et 33 µg Fe g^{-1}). Il en est de même pour les quantités phytoextraites en Fe (figure 10c) avec respectivement pour CAL1 et CAL2 35 et 84 µg avec Cd, et 21 et 46 µg sans Cd.

Les concentrations en Ca foliaire, présentées dans la figure 10b, adoptent la même tendance avec respectivement pour CAL1 et CAL2 26,05 et 20,10 mg Ca g^{-1} avec Cd, et 22,48 et 17,80 mg Ca g^{-1} sans Cd. Il en est de même pour le Mg, où nous voyons de façon significative une concentration plus élevée chez CAL2 avec Cd (6,08 mg Mg g^{-1}) par rapport aux plantes sans Cd (4,71 mg Mg g^{-1}) (figure 10b). Ce comportement n'est pas significatif pour CAL1 mais adopte toutefois la même tendance, avec respectivement 7,10 et 5,96 mg Mg g^{-1} avec et sans Cd. D'après la figure 10d, la quantité de Ca foliaire est significativement plus élevée en présence de Cd qu'en son absence chez CAL2, avec des valeurs respectives de 36,1 et 25,6 mg. Nous retrouvons une tendance similaire pour CAL1, avec 22,9 mg Ca contre 16,1 mg Ca avec et sans Cd. De la même façon, la quantité foliaire de Mg est significativement plus importante dans les populations avec Cd (6,2 mg pour CAL1 et 10,7 mg pour CAL2) que les populations sans Cd (4,2 mg pour CAL1 et 6,9 mg pour CAL2).

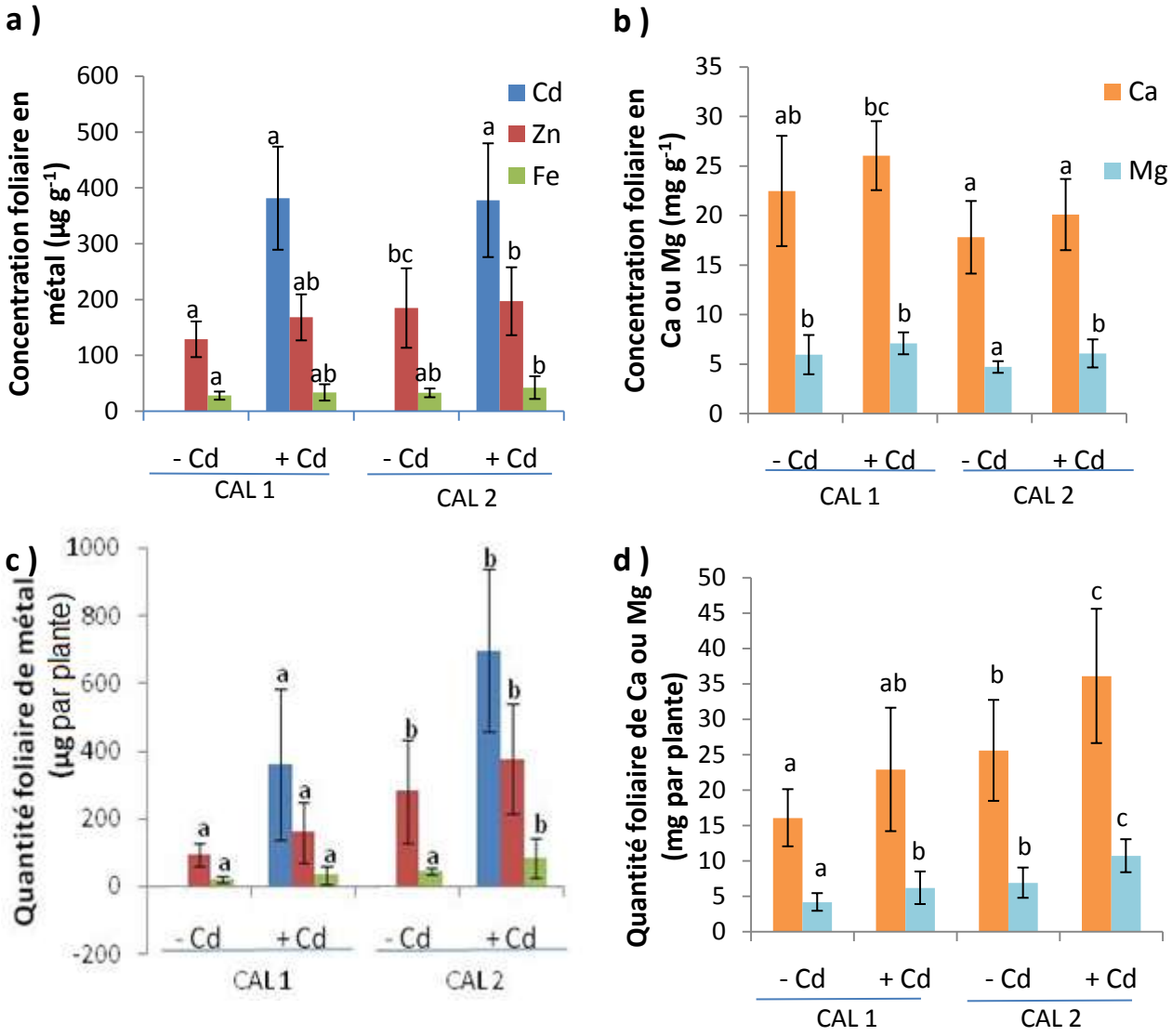


Figure 10 : Mesures des concentrations (a, b) et quantités (c, d) des métaux Cd, Zn, Fe (a, c) et des éléments nutritifs Ca et Mg (b, d) dans les feuilles des populations de *N. caerulescens* CAL1 et CAL2 cultivées sur du sable fertilisé avec (+Cd) et sans (-Cd) cadmium.

La figure 11a montre une corrélation positive significative ($p < 0,01$) entre les concentrations en Cd et en Zn dans les feuilles des deux écotypes métallicoles, avec un rapport Cd/Zn proche de 2 quelle que soit la population. Le rapport des concentrations Cd/Zn dans les feuilles est en moyenne de 0,01 à 0,02 pour des populations non métallicoles de *N. caerulescens* (Deschamps *et al.*, 2005; Molitor *et al.*, 2005) alors qu'il est bien plus élevé pour des populations métallicoles, variant le plus entre 0,03 et 0,1 (Sirguey, 2004; Zha *et al.*, 2004; Deschamps *et al.*, 2005; Xing *et al.*, 2008). Toutes ces différences laisseraient supposer un rôle prépondérant des transporteurs pour Cd et Zn, les concentrations en Cd et en Zn dans les feuilles pouvant être régulées génétiquement, comme énoncé par Deschamps *et al.* (2005). Dans cette étude, nous n'avons pas observé de différence entre les écotypes CAL1 et CAL2.

Nous pouvons également observer une corrélation positive très significative ($p < 0,001$) entre la concentration en Ca et en Mg dans les feuilles de toutes les plantes étudiées, avec un rapport moyen Ca/Mg de 0,27 (figure 11b). Il n'y a par contre aucune corrélation entre Cd ou Zn et Ca ou Mg (résultats non montrés). Des résultats tout à fait analogues ont été obtenus par Zha *et al.* (2004) qui ont caractérisé les compositions chimiques des feuilles des écotypes métallicoles Ganges (CAL2) et Prayon. En croisant les résultats de la figure 12b à ceux des figures 9a et d, indiquant une transpiration significativement plus importante pour CAL1 que

CAL2, avec ou sans Cd, nous pouvons supposer que plus une plante a un flux transpiratoire important, plus celle-ci concentre des éléments tels que le Ca et le Mg. Les corrélations entre concentrations et quantités de Ca ou de Mg dans les solutions et les volumes d'eau transpirée (résultats non montrés) vont aussi dans ce sens. **Il semble y avoir donc une relation forte et étroite entre la transpiration et le transport conjoint de Ca et de Mg, ce qui est nettement moins le cas pour Cd et Zn pour lesquels les transports actifs seraient prédominants.**

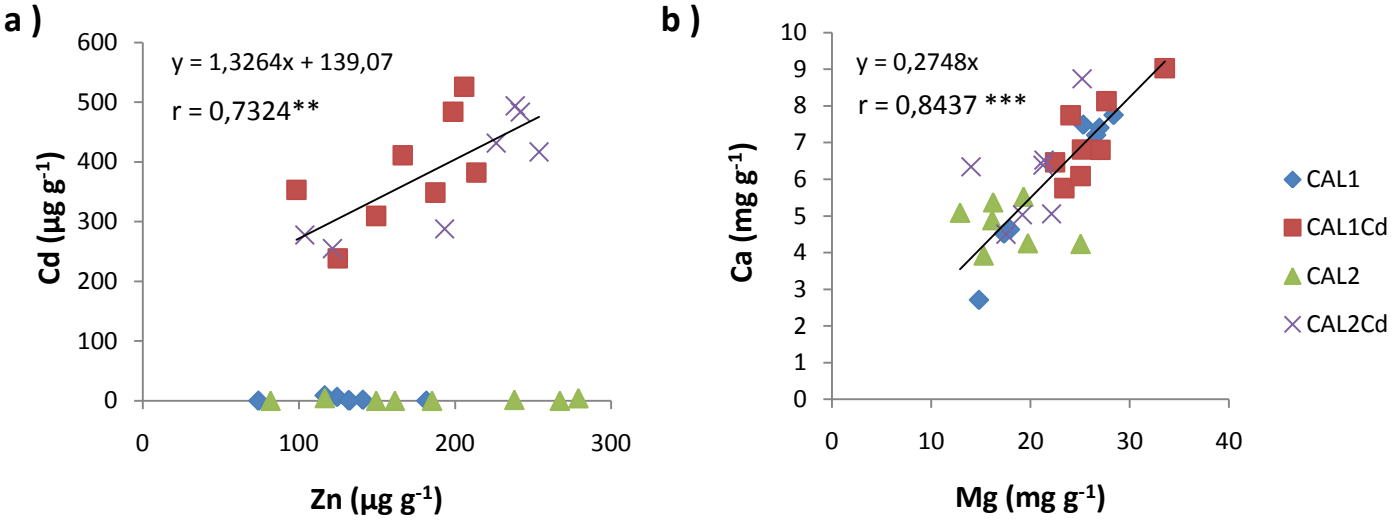


Figure 11 : Relations entre les concentrations en cadmium et en zinc (a) et entre les concentrations en calcium et en magnésium (b) dans les feuilles (** : significatif à $p < 0,01$ et *** : significatif à $P < 0,001$).

C. Concentrations en métaux et en éléments nutritifs des solutions

D'après la figure 12a, la concentration initiale en cadmium dans la solution extraite à – 45 kPa était en moyenne de 2,87 mg Cd L^{-1}, malgré un ajout de SOL2 à 5,62 mg Cd L^{-1}. Il y a donc eu précipitation/adsorption de 49 % du Cd, probablement sur les revêtements de fer des grains de quartz (Coinchelin, 2011), dès le premier jour. Au jour 65, nous observons que les concentrations en Cd dans les solutions étaient de 5,07, 3,97 et 3,88 mg Cd L^{-1} pour CAL1, CAL2 et T, respectivement. Il en est de même en fin de culture, avec des concentrations en Cd dans les solutions de 5,39, 3,22 et 3,92 mg L^{-1} pour CAL1, CAL2 et T, respectivement. La concentration en Cd dans la solution est donc relativement élevée, constante et stable. En centimoles de charges par litre, elle correspond au fer et au zinc co-précipités d'où l'hypothèse suggérée ci-après.

Suite à l'ajout de solution à 0,65 mg Zn L^{-1}, les analyses indiquent des concentrations en Zn de 0,02 mg L^{-1} dans toutes les solutions (figure 12b), soit une précipitation de 97 % dès le premier jour. A l'issue de l'expérimentation (jour 83), la concentration en Zn du témoin avec Cd a très peu varié (0,06 mg L^{-1}), tandis que le témoin sans Cd affiche une concentration de 0,53 mg L^{-1}. En présence de plante, les concentrations en Zn sont plus faibles avec cadmium (0,16 et 0,27 mg L^{-1} pour CAL1 et CAL2) que sans cadmium (0,53 et 0,80 mg L^{-1} pour CAL1 et CAL2).

Si l'on considère le fer (figure 12c), celui-ci a été dosé à une concentration initiale de 0,15 mg L^{-1} dans les solutions avec Cd, après un ajout en solution à 1,117 mg L^{-1}. Il y a donc eu dès le premier jour précipitation de 87 % du fer dans le cas du sable contaminé en Cd, ce qui pourrait expliquer des symptômes de chlorose qui se sont estompés au cours du temps. Le fer libéré aurait co-précipité avec le zinc sous forme, sous forme de ferrihydrite Zn (Waychunas

et al., 2002). Ceci serait attribuable à une dissociation du complexe Fe-EDTA rendant l'anion EDTA disponible pour complexer le cadmium, ce qui expliquerait le fait que la concentration en Cd dans la solution soit relativement élevée, constante et stable. En raisonnant en centimoles de charges par litre, cette hypothèse paraît très plausible. A l'opposé, les solutions sans Cd présentent des concentrations en Fe de 1,04 mg L^{-1}. La concentration en Fe des solutions témoins avec et sans Cd diminuent et se stabilisent au cours du temps pour atteindre respectivement 0,04 et 0,52 mg Fe $L^{-}1$ au jour 83. Cela révèle qu'il y a précipitation du Fe toujours présente malgré les apports continus via SOL1.

Les concentrations en Fe des solutions des dispositifs avec plantes et cadmium ont une évolution cinétique croissante, avec des valeurs finales de 0,74 mg Fe L^{-1} et 1,45 mg Fe L^{-1} pour CAL1 et CAL2 respectivement. Dans les solutions des dispositifs avec plantes sans Cd, le fer ne présente pas le même comportement : avec l'écotype CAL1, la concentration en Fe diminue au cours du temps pour atteindre 0,54 mg L^{-1} au jour 83 ; tandis qu'avec l'écotype CAL2, le fer précipite jusqu'à une concentration de 0,46 mg L^{-1} entre les jours 0 et 62, puis il se solubilise à nouveau pour atteindre une concentration finale de 1,52 mg Fe L^{-1}. Au fur et à mesure que la plante absorbe le Cd (seul Cd serait absorbé et non le complexe Cd-EDTA), l'EDTA formerait un complexe avec le Fe, le rendant à nouveau disponible pour la plante.

Le Ca et le Mg sont présents à des concentrations initiales respectives de 109 et 20 mg L^{-1}. Au cours du temps, les concentrations en Ca (figure 12d) et en Mg (figure 12e) restent stables dans les solutions témoins, avec des valeurs finales de 99 et 129 mg Ca L^{-1}, et de 25 et 35 mg Mg L^{-1}, respectivement sans et avec Cd. En présence de plantes, les concentrations en solution de Ca et Mg augmentent avec le temps, étant plus élevées pour CAL2 que pour CAL1, avec respectivement 195 et 219 mg Ca L^{-1} et 82 et 100 mg Mg L^{-1} sans et avec Cd, et 170 et 155 mg Ca L^{-1} et 86 et 75 mg Mg L^{-1} sans et avec Cd. Ces plus fortes concentrations d'éléments dans les pots plantés résultent d'un apport régulier de SOL1 afin de maintenir une humidité volumétrique du sable à 20%. Les corrélations entre concentrations et quantités de Ca ou de Mg dans les solutions et les volumes d'eau transpirée (résultats non montrés) vont également dans ce sens. Plus la plante transpire plus l'irrigation en solution nutritive est importante, ce qui induit cette augmentation continue des concentrations en Ca et en Mg dans les solutions des systèmes sable/plante.

Enfin, l'évolution du pH de la solution, qui était initialement de 7,15, révèle un remarquable effet rhizosphère (d'après figure 12f). Les solutions témoins montrent une évolution constante jusqu'au jour 62 (-Cd : 7,18 ; +Cd : 7,13) suivie par une faible acidification du milieu (-Cd : 6,94 ; +Cd : 6,58). A contrario, pour toutes les modalités plantées, la solution du sable montre une augmentation significative de pH pour atteindre des valeurs entre 7,98 et 8,13 à l'issue de l'expérimentation. Des résultats tout à fait analogues ont été reportés par Blossfeld *et al.* (2010) pour la rhizosphère d'un écotype de *N. caerulescens* cultivé dans un sol contaminé, et, dans une moindre mesure, par Luo *et al.* (2000) et par Monsant *et al.* (2008). D'autres chercheurs avaient au contraire noté une tendance à l'acidification (McGrath *et al.*, 1997). Cette alcalinisation de la rhizosphère serait liée à l'apport d'azote sous forme NO_3^- et à sa forte absorption par *N. caerulescens* qui absorberait plus d'anions que de cations (Blossfeld *et al.*, 2010), Ainsi, pour maintenir l'électroneutralité de la solution, la plante exsuderait des anions OH^- alcalinisant la rhizosphère. Les récents travaux de Monsant *et al.* (2008) et de Karray-Bouraoui *et al.* (2010) viennent conforter cette hypothèse : lorsque l'azote est exclusivement apporté sous forme de nitrates, comme c'est notre cas, la rhizosphère de *N. caerulescens* ou celle d'*Arabidopsis thaliana* s'alcalinise tandis qu'elle s'acidifie lorsque l'azote est exclusivement apporté sous forme d'ammoniaque. Des compléments d'analyses de nos solutions (anions dont les nitrates) permettraient de mieux appréhender la balance anions-cations de la solution qui régule le pH (Hedley *et al.*, 1982 ; Haynes, 1990).

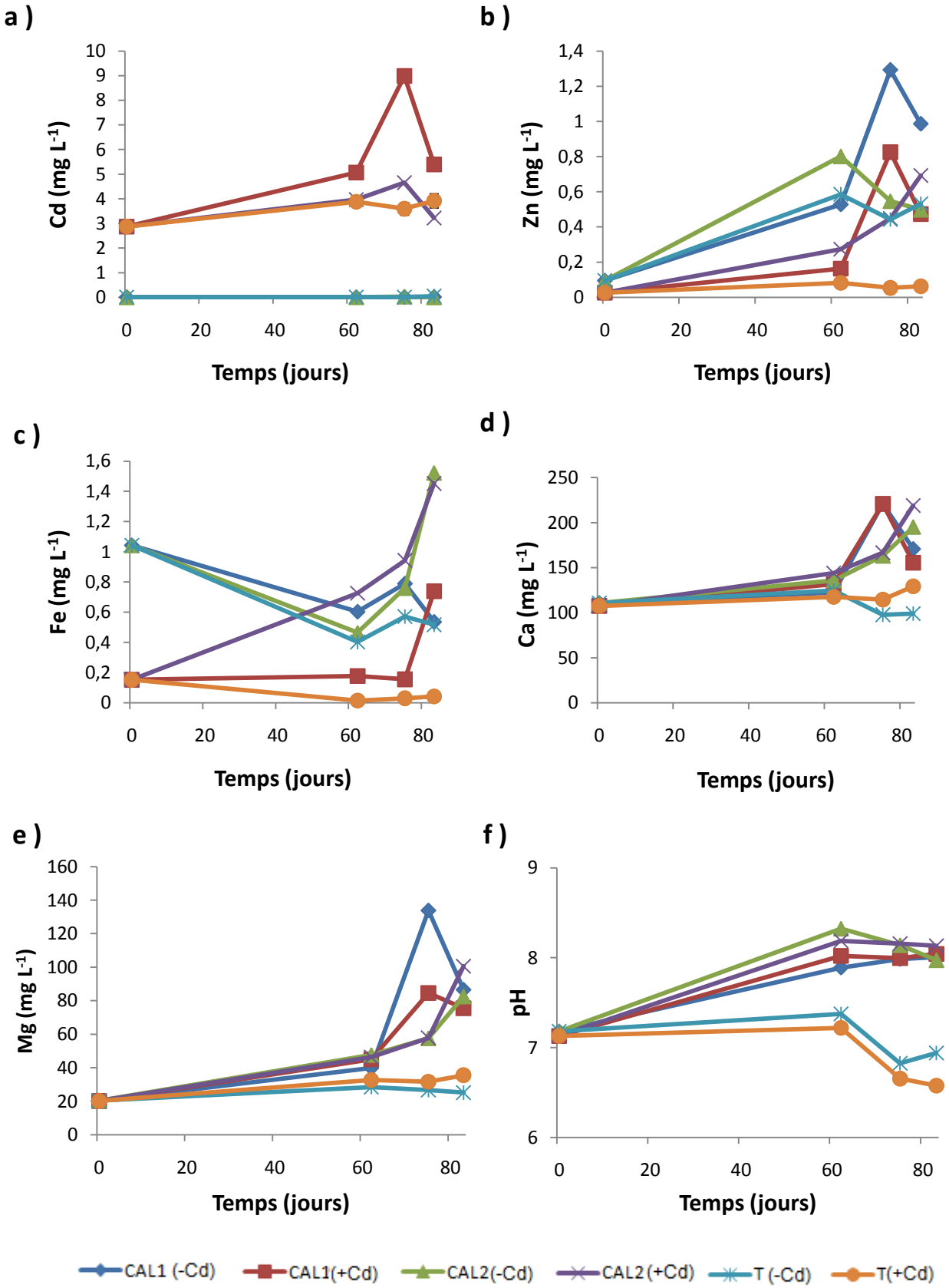


Figure 12 : Evolution cinétique des concentrations en Cd, Zn et Fe (a, b et c) et en Ca et Mg (d et e) en solution ainsi que des pH (f) avec (+Cd) et sans (-Cd) cadmium des populations de *N. caerulescens* CAL1 et CAL2, ou sans plantes (témoins T).

D. Bilans biogéochimiques

Comme vu précédemment dans la partie C, et résumé dans le tableau 3, nous avons observé que le Cd a davantage été phytoaccumulé par CAL2 que par CAL1. De même, l'écotype CAL2 a prélevé plus de Zn que CAL1. Il en est de même pour Fe, Ca et Mg, plus particulièrement en présence de Cd qui maximiserait l'absorption de ces éléments. Cette différence observée entre les deux populations peut s'expliquer soit par un apport en SOL1 plus important pour CAL2 dû à une biomasse transpirante plus développée, soit par un trait génétique exprimé en présence de Cd.

Tableau 3: Bilan biogéochimique des métaux et d'éléments nutritifs de chaque système plante hyperaccumulatrice/sable fertilisé (-Cd) ou (+Cd). (Moyennes avec leurs écart-types entre parenthèses).

Elément	Population et traitement	Apport initial (mg)	Apport total (mg)	Quantité phytoaccumulée (feuilles) (mg)	(% quantité apportée)
Cd	CAL1 (-Cd)	0	0	0,002 (0,003) c	
	CAL1 (+Cd)	0,8937	0,8937	0,36 (0,22) b	40 (25) b
	CAL2 (-Cd)	0	0	0,001 (0,002) c	
	CAL2 (+Cd)	0,8937	0,8937	0,70 (0,24) a	78 (27) a
Zn	CAL1 (-Cd)	0,1040	0,47 (0,10) b	0,08 (0,04) b	19 (9) b
	CAL1 (+Cd)	0,1040	0,52 (0,14) b	0,16 (0,09) b	31 (17) b
	CAL2 (-Cd)	0,1040	0,61 (0,18) b	0,28 (0,15) a	46 (25) a
	CAL2 (+Cd)	0,1040	0,79 (0,14) a	0,38 (0,16) a	48 (20) a
Fe	CAL1 (-Cd)	0,1776	0,79 (0,26) b	0,02 (0,01) b	2,5 (1,3) b
	CAL1 (+Cd)	0,1776	0,89 (0,23) b	0,04 (0,03) b	4,5 (3,4) b
	CAL2 (-Cd)	0,1776	1,04 (0,31) b	0,05 (0,01) b	4,8 (1,0) ab
	CAL2 (+Cd)	0,1776	1,35 (0,25) a	0,08 (0,06) a	5,9 (4,4) a
Ca	CAL1 (-Cd)	12,7454	52,3 (18,6) b	14,3 (6,2) b	27 (12) b
	CAL1 (+Cd)	12,7454	63,9 (16,8) b	22,9 (8,7) b	36 (14) ab
	CAL2 (-Cd)	12,7454	74,7 (22,3) b	25,6 (7,1) b	34 (9) ab
	CAL2 (+Cd)	12,7454	96,7 (17,7) a	36,1 (9,5) a	37 (10) a
Mg	CAL1 (-Cd)	3,8653	15,9 (5,6) b	3,7 (1,7) b	23 (11) b
	CAL1 (+Cd)	3,8653	19,4 (5,1) b	6,2 (2,3) b	32 (12) b
	CAL2 (-Cd)	3,8653	22,6 (6,8) b	6,9 (2,1) b	30 (9) b
	CAL2 (+Cd)	3,8653	29,3 (5,4) a	10,7 (2,3) a	36 (8) a

E. Facteurs de bioconcentration

Les différents facteurs de bioconcentration foliaire calculés ont été normalisés par rapport à la disponibilité du contaminant, c'est-à-dire sa concentration en solution. Or, si la concentration

en Cd dans la solution était relativement constante durant la culture, les concentrations en Ca et en Mg augmentaient très fortement en fonction de la transpiration/irrigation. Pour chaque plante et chaque élément nous avons donc choisi d'utiliser la moyenne des concentrations initiales et finales comme concentration représentative de ce que « voit » la plante pendant sa croissance. En effet, selon l'évolution de ces concentrations (figure 12), ces moyennes correspondent à des temps de culture de 50 à 70 jours, représentatifs d'une croissance de biomasse foliaire de 50 % (figure 7a). Ceci n'est qu'une première approximation qui parait assez réaliste bien qu'il aurait été préférable de travailler à concentration quasi-constante, ce qui n'a été le cas que pour le cadmium. Trois facteurs de bioconcentration ont été calculés.

Le premier rapport de bioconcentration foliaire, RBC_{sable}, le plus utilisé dans les références bibliographiques, représente le rapport sans dimensions entre la concentration de l'élément considéré dans les feuilles Cf (mg kg^{-1}) et sa concentration totale dans le sable Csable (mg kg^{-1}). Les plantes hyperaccumulatrices présenteraient un rapport de bioconcentration foliaire supérieur à 10 (Cluis, 2004). Ce rapport de bioconcentration prend implicitement en compte l'écophysiologie de la phytoaccumulation du métal ou de l'élément nutritif dans les feuilles mais ne considère pas leur disponibilité, c'est-à-dire leur passage en solution.

Le deuxième rapport de bioconcentration foliaire, $RBC_{solution}$, représente le rapport sans dimensions entre la concentration de l'élément considéré dans les feuilles Cf (mg kg^{-1}) et sa concentration moyenne en solution Cs (mg L^{-1}). Il prend implicitement en compte l'écophysiologie de la phytoaccumulation du métal ou de l'élément nutritif dans les feuilles ainsi que leur disponibilité, ce qui le rend plus pertinent que le rapport de bioconcentration foliaire RBC_{sable}.

Le troisième facteur de bioconcentration, *TSCF* (« Transpiration Stream Concentration Factor »), également sans dimensions, représente le rapport des concentrations de l'élément considéré dans le xylème et dans la solution (Russel and Barber, 1960 ; Russel, 1977). Il peut être calculé indirectement par bilan sur des plantes intactes transpirantes, ce qui évite les biais liés à la décapitation de la plante (voir par exemple Coinchelin, 2011; Bartoli *et al*., 2011) :

$$TSCF = (Cf*Bf)/(Cs*Vt)$$

où Cf est la concentration foliaire de l'élément considéré (mg g^{-1}), Cs sa concentration moyenne en solution (mg L^{-1}), Bf la biomasse foliaire (g) et Vt le volume cumulé d'eau transpiré (L). Il existe donc une relation simple entre $RBC_{solution}$ et TSCF (avec un facteur de 1000 du fait des unités). Le facteur de bioconcentration TSCF prend explicitement en compte l'écophysiologie de la phytoaccumulation du métal ou de l'élément nutritif dans les feuilles ainsi que leur disponibilité. Il nécessite toutefois de mesurer la transpiration.

La figure 13a présente les valeurs de RBC_{sable} déterminées pour Cd, Zn et Fe. Pour chaque métal, ces rapports de bioconcentration ne permettent pas de distinguer les différentes populations d'un point de vue statistique. Les valeurs de RBC_{sable} du fer sont de loin les plus faibles, ce qui serait attribuable à une forte rétention du fer dans les racines, ce que nous vérifierons par l'analyse de leur composition, et ce qui a déjà été préalablement établi pour *N. caerulescens* (Baker *et al.*, 1994). Le RBC_{sable} du cadmium est toujours supérieur à celui du zinc, tous deux étant élevés (de 300 à 600). Par comparaison, des valeurs de RBC_{sable} plus de 10 fois plus faibles ont été trouvées pour le Cd et le Zn accumulés dans les feuilles de *N. caerulescens* cultivée sur des sols contaminés (Lombi *et al.*, 2000; Yanai *et al.*, 2006; Epelde *et al.*, 2010), ce qui serait attribuable à une très faible disponibilité de ces métaux dans les sols comparativement à leur disponibilité élevée dans le sable (concentrations élevées dans la solution).

Les RBC_{sable} du Ca, respectivement sans et avec Cd, sont significativement plus élevés pour l'écotype CAL1 (500 et 567) que pour l'écotype CAL2 (326 et 273) (figure 13b). Une tendance similaire est observée pour le Mg (figure 13b). Il est à noter que les ordres de grandeur des valeurs de RBC_{sable} du Ca et du Mg sont similaires à celles du Cd et du Zn.

Les résultats de la figure 13c montrent une différence significative des valeurs de $RBC_{solution}$ du Cd entre les populations CAL1 (156) et CAL2 (376). Nous pouvons également noter une différence significative de $RBC_{solution}$ du Zn entre l'écotype CAL1 sans Cd (241) et les autres populations (696 CAL1 avec Cd, 735 CAL2 sans Cd et 731 CAL2 avec Cd). Dans les deux cas, les valeurs de $RBC_{solution}$ les plus faibles s'expliquent par des concentrations en solution plus faibles (figures 12a et b). Aucune différence significative dans les $RBC_{solutions}$ du Fe, dont les valeurs sont à nouveau extrêmement faibles, n'a été observée. Enfin, des différences significatives entre les populations CAL1 et CAL2 au niveau de leurs $RBC_{solution}$ pour Ca et Mg ont été observées, avec des valeurs plus importantes chez CAL1. Notons également une différence significative chez CAL1, avec et sans Cd. Nous avons ainsi pour Ca : 159 et 198 pour CAL1, sans et avec Cd, 119 et 124 pour CAL2, sans et avec Cd ; pour Mg : 118 et 157 pour CAL1, sans et avec Cd, 102 et 104 pour CAL, sans et avec Cd.

Il est essentiel de noter une grande différenciation de la bioconcentration de chaque élément étudié en utilisant $RBC_{solution}$ et non pas RBC_{sable} : maximale pour le Zn ($RBC_{solution}$ souvent proche de 700), forte mais près de 2 à 7 fois plus faible pour Cd, Ca et Mg, selon un ordre décroissant ($RBC_{solution}$ de 150 à 350, 120 à 190 et 95 à 160, respectivement) et très faible pour Fe ($RBC_{solution}$ proche de 20) (figures 13c et 13d).

Les TSCF pour Cd, Zn et Fe (figure 13e) suivent exactement les mêmes tendances observées que celles présentées précédemment pour leurs $RBC_{solution}$.

Les $TSCF_{Zn}$ sont généralement supérieurs à 1, ce qui est attribuable à la prédominance d'un transport actif (Russel and Barber, 1960; Russel, 1977 ; Coinchelin, 2011; Bartoli *et al*., 2011). Les $TSCF_{Zn}$ moyens varient de 0,35 (CAL1 (-Cd)) à 1,35 (CAL2 (-Cd)), ce qui indiquerait que le transport actif du zinc est bien plus important dans le cas de l'écotype CAL2 que dans celui de l'écotype CAL1 au sein duquel il est probable que le Zn serait partiellement retenu dans les racines, ce que nous vérifierons par l'analyse de leurs compositions. Par contre, la contamination en Cd « nivelle » les valeurs de $TSCF_{Zn}$ (1,05 à 1,35), le cadmium permettant alors d'augmenter de façon significative le transport actif du Zn au sein des plantes CAL1.

Les $TSCF_{Cd}$ moyens sont plus faibles que les $TSCF_{Zn}$ correspondant, ce qui est attribuable à un transport actif et une mobilité dans la plante plus élevé pour le zinc que pour le cadmium. Ces $TSCF_{Cd}$ varient de 0,2 (CAL1 (+Cd)) à 0,7 (CAL2 (+Cd)) ce qui indiquerait que le transport actif est plus important dans le cas de l'écotype CAL2 que dans celui de l'écotype CAL1 au sein duquel il est probable que plus de Cd soit partiellement retenu dans les racines, ce que nous vérifierons par l'analyse de leurs compositions. Tout comme le zinc (sable sans Cd), les valeurs de $RBC_{solution\ Cd}$ et de $TSCF_{Cd}$ différencient bien les deux écotypes étudiés, ce qui indiquerait une prédominance du transport actif plus élevé du Zn (sable sans Cd) ou du Cd (sable contaminé au Cd), ainsi que par moins de barrières racinaires, pour la population CAL2 que pour la population CAL1, attribuable à des différences génétiques notables qu'il conviendrait de caractériser.

Les $TSCF_{Fe}$ sont toujours extrêmement faibles, ce qui caractérise son « exclusion » (forte adsorption sur les surfaces racinaires et forte rétention dans les racines) comme évoqué précédemment, ce que nous vérifierons. Aucune tendance n'est observée pour les TSCF du Ca (0,21 à 0,28) et du Mg (0,16 à 0,22) (figure 13f).

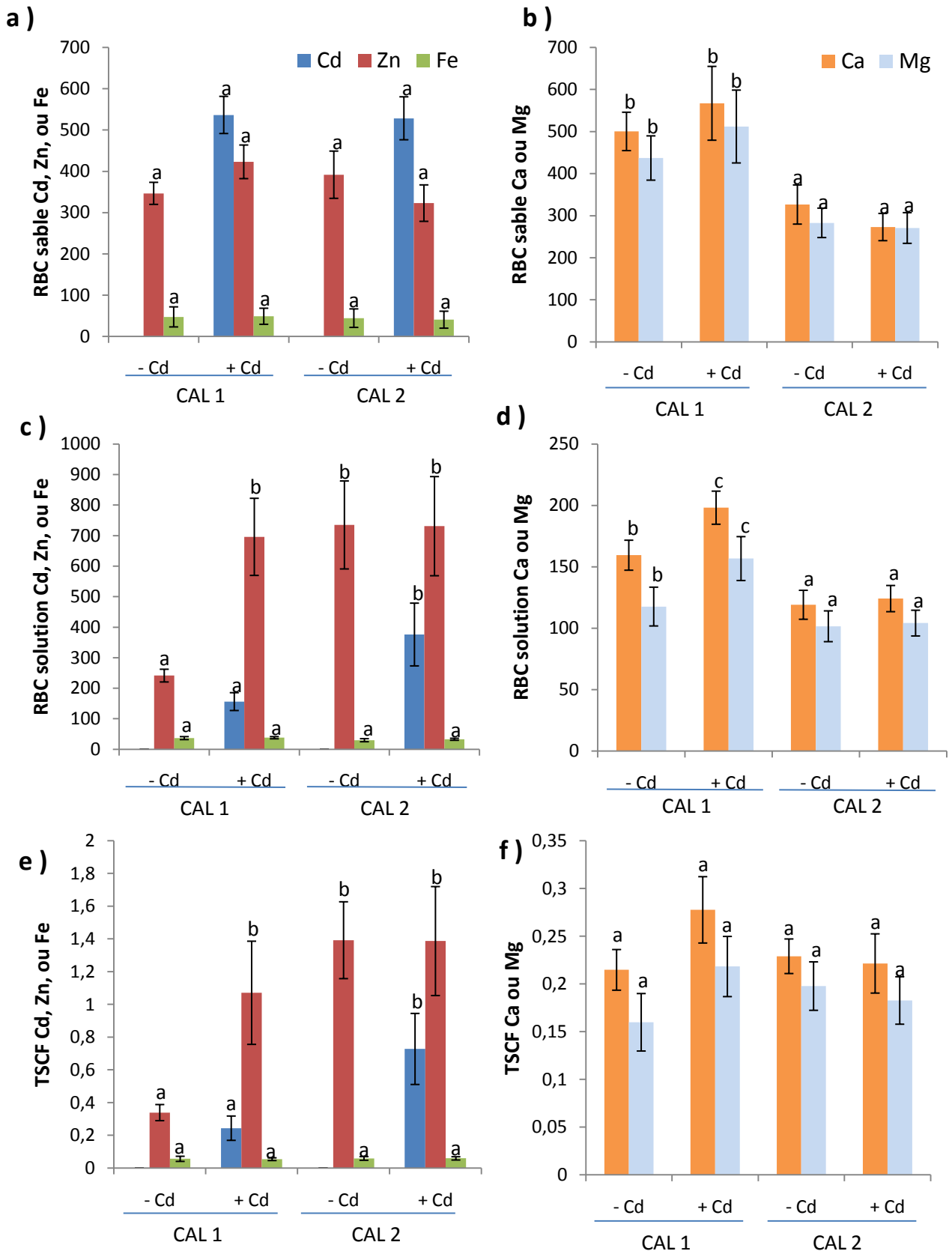


Figure 13 : Facteurs de bioconcentration des métaux Cd, Zn, Fe (a, c, e) et des éléments nutritifs Ca et Mg (b, d, f) dans les feuilles des populations de *N. caerulescens* CAL1 et CAL2 cultivées sur du sable fertilisé avec (+Cd) et sans (-Cd) cadmium.

IV. Conclusions

Les principales conclusions de cette étude sur deux populations de *N. caerulescens* sont les suivantes :

1 Les graines de la population non métallicole et de la population sur serpentine n'ont pas germées, la résolution de ce problème pouvant être envisagée à l'aide d'ajout d'acide gibbérellique.

2 Au niveau de la croissance et des caractéristiques écophysiologiques, la population calaminaire CAL2 de *N. caerulescens* est caractérisée par une biomasse aérienne plus importante que celle de la population CAL1, induisant aussi une transpiration totale plus importante. Nous pouvons observer des tendances pour l'EUE pour la production de biomasse foliaire qui est moins efficace pour CAL1 que pour CAL2. Il en est de même pour l'EUE pour la photosynthèse. L'écotype CAL2 se différencie aussi de l'écotype CAL2 par un nombre de feuilles par gramme de biomasse foliaire plus faible ainsi que, lors du dernier jour de culture, par une transpiration normalisée à la biomasse foliaire plus faible, ces deux résultats pouvant être directement reliés.

3 Les concentrations en Cd dans les feuilles sont identiques pour les populations CAL1 et CAL2, mais les quantités extraites sont supérieures pour les plantes CAL2 du fait de leurs biomasses foliaires plus élevées. Les concentrations foliaires de Zn et de Fe ont tendances à être plus importantes chez CAL2 que chez CAL1. La contamination en Cd a tendance à maximiser les concentrations de ces deux éléments chez CAL1 et CAL2. Il en est de même pour les concentrations foliaires en Ca et Mg. Sans différenciations entre CAL1 et CAL2, deux corrélations positives ont été établies entre, d'une part, les concentrations en cadmium et en zinc dans les feuilles et, d'autre part, les concentrations en calcium et en magnésium alors qu'il n'existe aucune corrélation entre ces métaux et ces éléments nutritifs.

4 Les facteurs de bioconcentration $RBC_{solution}$ et TSCF évoluent dans le même sens. Le zinc est le plus bioconcentré, suivi par le cadmium, puis par le calcium et le magnésium. Le Fe l'est très faiblement, ce qui est attribuable à sa forte rétention dans les racines.

5 Le zinc et le cadmium sont bien plus bioconcentrés dans les feuilles de l'écotype CAL2 que dans celles de l'écotype CAL1, ce qui indiquerait une prédominance du transport actif plus élevée du Zn (sable sans Cd) ou du Cd (sable contaminé en Cd), ainsi que, peut-être, par moins de barrières racinaires, pour la population CAL2 que pour la population CAL1, ce qui serait attribuable à des différences génétiques qu'il conviendrait de caractériser.

En résumé, nos résultats permettent de préférer nettement, dans l'optique d'une phytoremédiation de sols contaminés en ETM, la population calaminaire CAL2 de *N. caerulescens* à la population calaminaire CAL1 pour sa bien plus grande phytoaccumulation de Zn et de Cd dans les feuilles attribuables à (i) sa meilleure croissance, corrélée à une meilleure utilisation de l'eau pour la photosynthèse et à une transpiration finale par poids de biomasse foliaire moins prononcée et (ii) une prédominance du transport actif plus élevée du Zn (sable sans Cd) ou du Cd (sable contaminé en Cd). Ces approches écophysiologiques pourraient être utilisées avec profit sur un nombre assez élevé de populations de *N. caerulescens* afin d'en sélectionner un nombre limité sur ces bases rationnelles dans une optique d'amélioration variétale.

En termes de perspectives, l'analyse programmée des compositions chimiques des racines nous permettra de préciser certaines hypothèses et il serait utile, à moyen terme, de mieux comprendre ces différences écophysiologiques marquées (couplage production de biomasse et intensité du transport actif) à l'aide d'outils génétiques appropriés.

V. Références bibliographiques

MEEDDTL http://www.developpement-durable.gouv.fr/ (consulté le 12 février 2011)

Bartoli F., Coinchelin D., Robin C. and Echevarria G. 2011. Impact of active transport and transpiration on nickel and cadmium accumulation in the leaves of the Ni-hyperaccumulator *Leptoplax emarginata*: a biophysical approach. Plant and Soil, DOI 10.1007/s11104-011-0885-9.

Baker A.J.M., Reeves R.D., Hajar, A.S.M. 1994. Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl (Brassicaceae). New Phytologist, 127, 61-68.

Basic N., Salamin N., Keller C., Galland N., Besnard G. 2006a. Cadmium hyperacccumulation and genetic differenciation of *Thlaspi caerulescens* populations. Biochemical Systematics and Ecology, 34, 667-677.

Basic N., Keller C., Fontanillas P., Vittoz P., Besnard G. and Galland N. 2006b. Cadmium hyperaccumulation and reproductive traits in Natural *Thlaspi caerulescens* populations. Plant Biology, 8, 64-72.

Bernard C., Roosens N., Czernic P., Lebrun M., Verbruggen N. 2004. A novel CPxATPase from the cadmium hyperaccumulator *Thlaspi caearulescens*. FEBS Letters, 569, 140-148.

Besnard G., Basic N., Christine P.A., Savova-Blanchi D., Galland N. 2009. *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae) population genetics in western Switzerland : is the genetic structure affected by the natural variation of soil heavy metal concentrations ? New Phytology, 181, 974-984.

Blossfeld S., Perriguey J., Sterckeman T., Morel J.-L. and Lösch R. 2010. Rhizosphere pH dynamics in trace-metal-contaminated soils, monitored with planar pH optodes. Plant and Soil, 330, 173-184.

Brooks R., Lee J., Reeves R., Jaffre T. 1977. Detection of nickeliferous rocks by analysis of herborium specimens of indicator plants. Journal of Geochemical Exploration, 7, 49-57.

Cadman C., Toorop P., Hilhorst H., Finch-Savage W. 2006. Gene expression profiles of *Arabidopsis* Cvi seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. The Plant Journal, 46, 805–822.

Chaney R.L. 1983. Plant uptake of inorganic waste constituents. In : Land Treat of Hazard Wastes. Parr J.F. et al (Eds) , Noyes Data Corp., Park Ridge, NJ., 50-76

Cluis C. 2004. Junk-geedy greens: phytoremediation as a nw option for soil decontamination. Biotetchnology Journal, 2, 60–67.

Coinchelin D. 2011. Mécanismes et modélisation de l'accumulation foliaire du nickel par l'hyperaccumulateur *Leptoplax emarginata*. Thèse de doctorat de de l'Institut National Polytechnique de Lorraine en Sciences Agronomiques, Nancy, 155p.

Deschamps C., Roosens N., Hotte C. and Meerts P. 2005. Growth and mineral element composition in two ecotypes of *Thlaspi caerulescens* on Cd contaminated soil. Plant and Soil, 273, 327-335.

Dessureault-Rompré J., Luster J., Schulin R., Mary-Lou Tercier-Waeber M.-L. and Nowack B. 2010. Decrease of labile Zn and Cd in the rhizosphere of hyperaccumulating *Thlaspi caerulescens* with time. Environmental Pollution, 158, 1955-1962.

Dubois S., Cheptou P.-O., Petit C., Meerts P., Poncelet M., Vekemans X., Lefèbvre C., Escarré J. 2002. Genetic structure and mating systems of metallicolous and nonmetallicolous populations of *Thlaspi caerulescens*. New Phytologist, 157, 633–641.

Epelde L., Becerril J., Kowalchuk G.A., deng Y., Zhou J., Garbisu C. 2010. Impact of metal pollution and *Thlaspi caerulescens* growth on soil microbial communuties. Applied and Environmental Microbiology, 76, 7843-7853.

Escarré J., Lefèbvre C., Gruber W., Leblanc M., Lepart J., Rivière Y. and Delay B. 2000. Zinc and cadmium hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens* from metalliferous and nonmetalliferous sites in the Mediterranean area: implications for phytoremediation. New Phytologist, 145, 429–437

Frérot H., Petit C., Lefèbvre C., Gruber W., Collin C. and Escarré J. 2002. Zinc and cadmium accumulation in controlled crosses between metallicolous and nonmetallicolous populations of *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae). New Phytologist, 157, 643-648.

Haynes R.J. 1990. Active ion uptake and maintenance of cation-anion balance: A critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. Plant and Soil, 126, 247-264.

Hedley M.J., Nye P.H. and White R.E. 1982. Plant-induced changes in the rizosphere of rape (*Brassica napus* var. Emerald) seedlings. II. Origin of the pH change. New Phytologist, 91, 31-44.

Hopmans J.W. and Bristow K.L. 2002. Current capabilities and future needs or roots water and nutrient unptake modeling. Advances in agronomy, 77, 103-183.

Karray-Bouraoui N., Attia H., Maghzaoui M., Msilini N., Rabhi M., Lachaal M. 2010. Physiological responses of *Arabidopsis thaliana* to the interaction of iron deficiency and nitrogen form. Acta Biologica Hungarica, 61, 204-213.

Küpper H. and Kochian L.V. 2010 Transcriptional regulation of metal transport genes and mineral nutrition during acclimatization to cadmium and zinc in the Cd/Zn hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens* (Ganges population). New Phytologist, 185, 114–129.

Lombi E., Zhao F.J., Dunham S. J., Mcgrath. S. P. 2000. Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense*. New Phytologist, 145, 11–20.

Luo Y.M., Christie P., Baker A.J.M. 2000. Soil solution Zn and pH dynamics in non-rhizosphere soil and in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* grown in a Zn/Cd-contaminated soil. Chemophere, 41, 161-164.

Mari S., Gendre D., Pianelli K., Ouerdane L, Lobinski R., Briat J.F., Lebrun M., Czernic P. 2006. Root-to-shoot long-distance circulation of nicotianamine and nicotianamine-nickel chelates in the hyperaccumalator *Thlaspi caearulescens*. Journal of Experimental Botany, 57, 15, 4111-4122.

McGrath S.P., Shen Z.G., Zhao F.J. 1997. Heavy metal uptake and chemical changes in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi ochroleucum* grown in contaminated soils. Plant and Soil, 188, 143-159.

Meerts P., Duchêne Ph., Gruber W. and Lefèbvre C. 2003. Metal accumulation and competitive ability in metllicolous ans non-metallicolous *Thlaspi caerulescens* fed with different Zn salts. Plant and Soil, 249, 1-8.

Milner M. and Kochian L. 2008. Investigating heavy metal hyperaccumulation using *Thlaspi caearulescens* as a Model System. Annals of Botany, 102, 3-13.

Molitor M., Deschamps C., Gruber W., Meerts P. 2005. *Thlaspi caerulescens* on nonmetalliferous soil in Luxembourg: ecological niche and genetic variation in mineral element composition. New Phytologist, 165, 503-512.

Monsant A.C., Tang C., Baker A.J.M. 2008. The effect of nitrogen form on rhizosphere soil pH and zinc phytoextractiuon by *Thlaspi caerulescens*. Chemosphere, 73, 635-642.

Reeves R.D, Schwartz C., Morel J.L., Edmondson J. 2001. Distribution and metal accumulating behaviour of *Thlaspi caerulescens* and associated metallophytes in France. International Journal of Phytoremediation, 3, 2, 145-172.

Russel R.S., Barber D.A. 1960. The relationship between salt uptake and the absorption of water by intact plants. Ann. Rev. Plant Physiology, 11, 127-140.

Russel R.S. 1977. Plant root systems: their function and interaction with the soil. McGraw-Hill, New York.

Schwartz C. and Sirguey C. 2006. Testing of outstanding individuals of *Thlaspi caerulescens* for cadmium phytoextraction. International Journal of Phytoremediation, 8, 339-357.

Sirguey C. 2004. Dynamique du cadmium disponible du sol sous l'influence de l'hyperaccumulateur *Thlaspi caearulescens*. Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine. Nancy : Université UHP, 157p.

Ueno D., Milner M.J., Yamaji N., Yokosho K., Koyama E., Clemencia Zambrano M., Kaskie M., Ebbs S., Kochian L.V, Ma J.F. 2011. Elevated expression of TcHMA3 plays a key role in the extreme Cd tolerance in a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*. The Plant Journal, 66, 852–862.

Waychunas G.A., Fuller C.C., Davis J.A. 2002. Surface complexation and precipitate geometry for aqueous Zn(II) sorption on ferrihydrite. I: X-ray absorption extended fine structure spectroscopy analysis. Geochimica and Cosmochimica Acta, 66, 1119-1137.

Whiting S.N., Neumann P.M., Baker A.J.M. 2003. Nickel and zinc hyperaccumulation by *Alyssum murale* and *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae) do not enhance survival and whole-plant growth under drought stress. Plant, Cell and Environment, 26, 351-360.

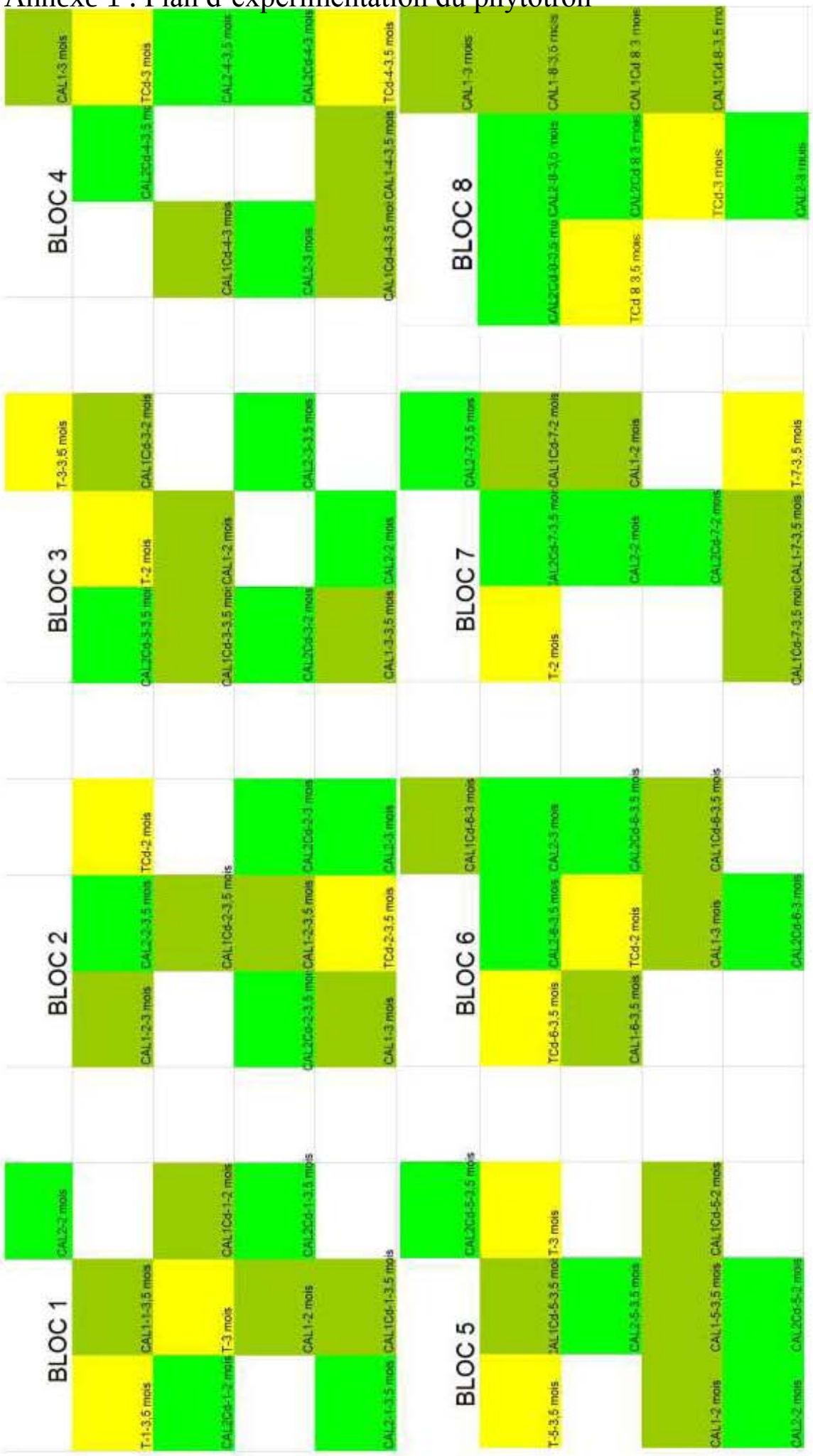
Wojcik M., Vangronsveld J., Tukiendorf A. 2005. Cadmium tolerance in Thlaspi caerulescens. I. Growth parameters, metal accumulation and phytochelatin synthesis in response to cadmium. Environmental and Experimental Botany, 53, 151-161.

Xing J.P., Jiang R.F., Ueno D., Ma J.F., Shat H., McGrath S.P., Zhao F.J. 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.

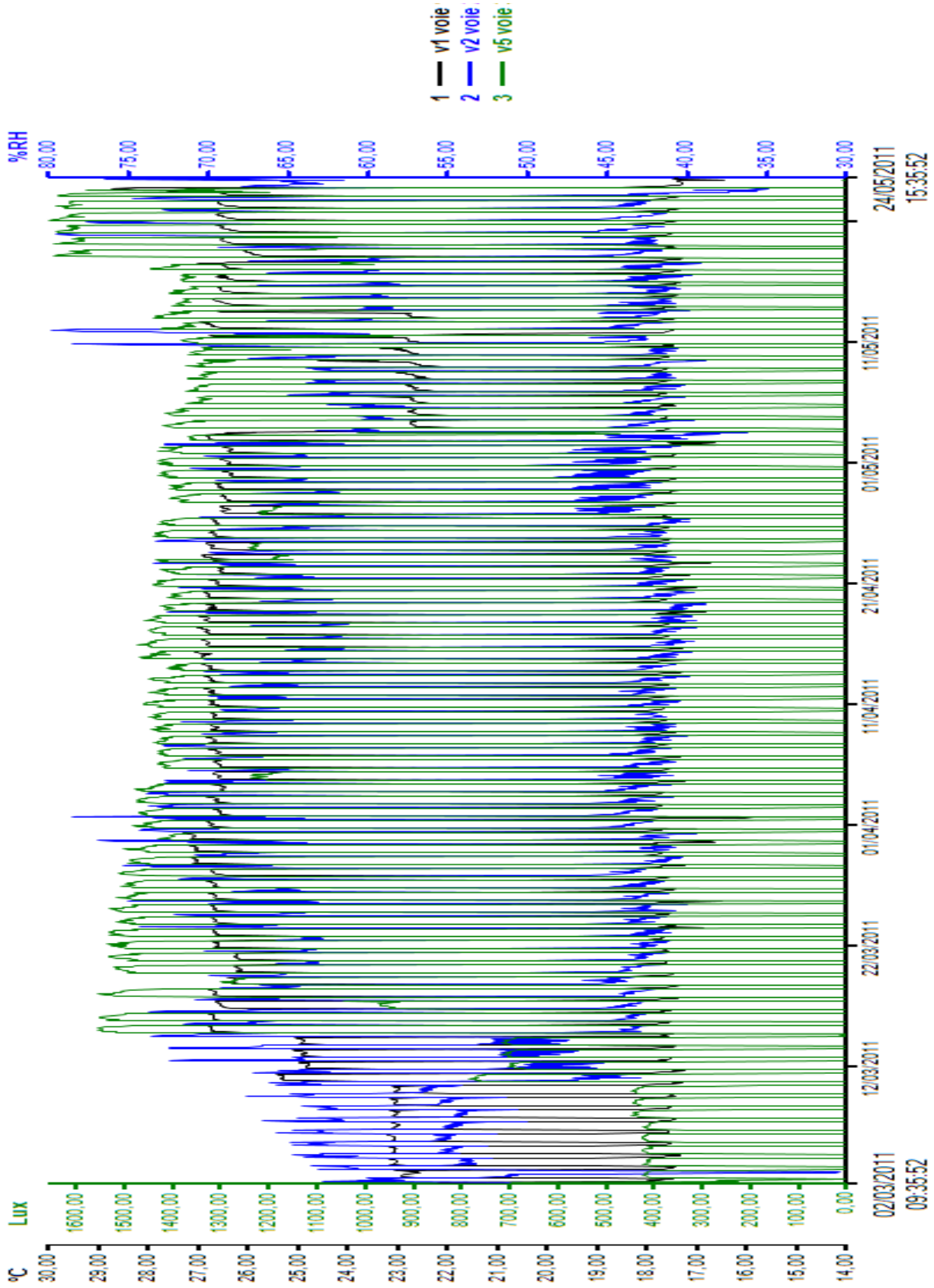
Yanai J., Zhao F-J., McGrath S.P., Kosaki T. 2006. Effect of soil characteristics on Cd uptake by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Environmental Pollution, 139, 167-175.

Zha H.G., Jiang R.F., Zao F.J., Vooijs R., Schat H., Barker J.H.A et McGrath S.P. 2004. Co-segregation analysis of cadmium and zinc accumulation in *Thlaspi caerulescens* interecotypic crosses. New Phytologist, 163, 299-312.

Annexe 1 : Plan d'expérimentation du phytotron



Annexe 2 : Enregistrement de la température (voie 1), de l'humidité (voie2), et de l'intensité lumineuse (voie 3) du phytotron durant la période de l'expérimentation



Annexe 3 : Protocole expérimentale de minéralisation Digiprep

INPL(ENSAIA) /INRA LSE UMR 1120	Mode opératoire Mise en solution de végétaux par attaque HNO_3/H_2O_2 avec le DigiPREP	Réf. : E-LSE-TRA-003 Version 1 Date : 2010-08-24 Page : 1/5

1. Objet

La méthode vise à mettre en solution les éléments dans les échantillons de végétaux en vue de leur dosage, notamment par des méthodes spectrométriques.

2. Domaine d'application

La méthode s'applique aux échantillons de végétaux sèches et finement broyés.

3. Documents de référence

Notice *DigiPREP.*

4. Liste de diffusion

- Assurance qualité (format informatique et papier original)
- lse-evgeny$ sur '193.50.56.50' (L:)/LSE-Assurance-Qualite/Modes opératoires
  (format pdf)
- Salle E113

5. Hygiène et sécurité

La manipulation d'acide nitrique concentré ou dilué et de peroxyde d'hydrogène est dangereuse. Prendre impérativement les précautions qui s'imposent afin de se prémunir de toute atteinte de la peau, des yeux, des voies respiratoires et digestives.

- Porter une blouse de laboratoire, des gants, des protections oculaires (lunette ou masque).
- Travailler sous hotte aspirante en marche.

La méthode ne peut être mise en œuvre la première fois sans l'aide d'une personne expérimentée.

6. Principe de la méthode

Les échantillons sont attaqués par HNO_3 et H_2O_2 à chaud dans un bloc en graphite thermostaté.

7. Matériels

7.1. D/g/PREP MS (LSE CHA 017). Le système de digestion *DigiPREP* MS (SCP Science) permet de travailler avec 48 tubes. C'est un système de digestion avec bloc de graphite recouvert de Teflon à température programmable. Les méthodes sont enregistrées via le contrôleur de température (7.2.)

7.2. DigiPREP TS (LSE DIV 017). Contrôleur à écran tactile pour *DigiPREP.* Le contrôleur à écran tactile convient aux digestions programmées à températures multiples. Le système s'arrête automatiquement après le cycle.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom : Fonction : Visa :	Sirguey Catherine Maître de Conférences		

7.3. Collecteur pour D/g/FILTER : facilite la préparation des échantillons en permettant la filtration de 12 D/g/FILTERs en parallèle après connexion du collecteur à une pompe à vide.

7.4. D/g/PROBE : sonde de température pour *DigiPREP*

7.5. D/g/TUBEs : tubes gradués classe A en polypropylène (ref 010-500-262) avec bouchon vissable en polyéthylène (ref 010-500-060).

7.6. Verres de montre pour D/g/TUBEs (ref 010-500-081).

7.7. Portoirs pour D/g/TUBEs (ref 010-500-021).

7.8. Racks de stockage en polystyrène (ref 010-500-028).

7.9. D/g/FILTERs : corps de filtre en polypropylène avec filtre en papier sans cendres 0,45 um (ref 010-500-070).

7.10. Etuve ventilée (LSE ETU 004 ou LSE ETU 004 ou LSE ETU 010)

7.11. Broyeur en agate (LSE BRO 009 ou LSE BRO 002) 7.12. Balance de précision (LSE BAL 002 ou LSE BAL 009 ou LSE BAL 011) 7.13. Pompe à vide

8. Réactifs

8.1. Eau déionisée ultra pure, d'une résistivité supérieure à 18 Mohms.

8.2. Acide nitrique concentré, c(HNO_3) = 15,8 mol L^{-1}, p ~ 1,42.

8.3. Peroxyde d'hydrogène, de qualité analytique à 30 % (110 vol).

9. Mode opératoire

9.1. Préparation des échantillons

L'échantillon doit être sec et broyé à une granulométrie inférieure à 250 um. Nettoyer les végétaux abondamment à l'eau du robinet afin d'éliminer toutes les particules de terre. Si des résidus terreux subsistent, un passage en bain à ultrasons peut être utilisé. Rincer à l'eau osmosée puis sécher dans une étuve à 72°C pendant 48 heures (7.10). Broyer les organes végétaux dans un mortier en agate (7.11).

9.2. Minéralisation

9.2.1 Pesée

Peser environ 0,5 g (± 1%) d'échantillon (9.1) dans le D/g/TUBE (7.5). Noter la valeur exacte dans le cahier d'enregistrement de la balance.

***Note** : L'électricité statique peut provoquer des difficultés à l'introduction des prises d'essai dans les tubes. L'utilisation d'une main à poudre en inox pour effectuer les pesées et insérer la poudre dans le fond du tube permet de limiter ces problèmes. Les récipients en verre sont préférables à ceux en matière plastique pour le stockage des poudres végétales.*

9.2.2 Ajout des réactifs

Sous une hotte aspirante en marche, ajouter dans l'ordre 8 ml d'acide nitrique concentré (8.2) et 4 ml de peroxyde d'hydrogène (8.3). Disposer les tubes sur un portoir (7.7) en utilisant les ergots de positionnement. Boucher les tubes et laisser les réactifs agir à froid durant une nuit.

9.2.3 Chauffage

Installer les portoirs sur le *DigiPREP* (7.1). Oter les bouchons et poser un verre de montre (7.6) sur chaque tube. Allumer le contrôleur de température (7.2). Tourner les tubes de façon à ce que les ergots de positionnement correspondent avec les encoches et que le fond des tubes soit en contact avec le bloc graphite.

Installer la sonde de température (7.4) dans un tube contenant un **blanc.** L'extrémité de la sonde doit être glissée dans le support pour sonde et ensuite inséré dans l'échantillon de contrôle désiré. Ajuster la hauteur de façon à ce que l'extrémité de la sonde soit à environ 1 mm du fond du D/g/TUBE.

***Note** : L'échantillon de contrôle doit être un échantillon de digestion. La DigiPROBE doit toujours être placée dans la cavité située à l'arrière droit du bloc en graphite lorsqu'elle n'est pas utilisée.*

Sur le contrôleur de température, choisir la méthode «PLANTES» (annexe 1) et appuyer sur « départ ».

Une fois le cycle terminé, retirer les portoirs avec les tubes et les laisser refroidir sur la paillasse.

9.3.Contrôle de la qualité

Dans chaque série de 24 tubes, placer au moins un blanc (réacteur contenant les réactifs sans échantillon) et un échantillon de contrôle interne ou certifié (L:\LSE-Assurance-Qualite\5-Inventaire et liste ACAinventaire échantillons-produits\échantillons de référence).

9.4.Filtration

Connecter le collecteur (7.3) à la pompe à vide (7.13). Avec de l'eau déionisée (8.1), ajuster le volume de chaque échantillon à exactement 25 mL dans le D/g/TUBE.

Connecter un D/g/FILTER sur le D/g/TUBE contenant l'échantillon en veillant à ce que la fermeture soit bien étanche puis, connecter un D/g/TUBE vide à l'autre extrémité. Chaque D/g/FILTER comporte 2 orifices. Veiller à ce que l'orifice supérieur (lorsque le tube vide est en bas) soit obturé par un bouchon rouge. Connecter l'ensemble sur le collecteur en veillant à ce que les robinets du collecteur soient fermés.

Mettre en route la pompe à vide. Ouvrir successivement tous les robinets et ôter les bouchons rouges. Laisser filtrer. Fermer les robinets avant de déconnecter les D/g/FILTERs. ' Jeter les D/g/FILTERs et les D/g/TUBEs usagés de façon appropriée. Fermer les D/g/TUBEs contenant les échantillons à l'aide d'un bouchon et stocker les tubes dans un rack (7.8).

Conserver les tubes à 4°C avant analyse.

9.5.Nettoyage du matériel

9.5.1 Nettoyage des petites souillures de surface

Lorsqu'il devient nécessaire de nettoyer l'instrument, à cause d'éclaboussures accidentelles, il faut éteindre et débrancher l'appareil. Enlevez tout excès de liquide puis nettoyez la surface avec un papier fin.

Attention : la surface peut être chaude. La surface chaude et le liquide vont créer de la vapeur et peuvent causer des brûlures très facilement. Il vaut donc mieux laisser l'appareil refroidir avant tout nettoyage.

9.5.2 Nettoyage des puits de digestion

Si du liquide a coulé dans les puits du système *DigiPREP,* éteindre et débrancher l'appareil. Le laisser refroidir à température ambiante. Aspirer le liquide avec un compte-goutte ou une pipette. Diluer le reste avec de l'eau distillée deux ou trois fois et aspirer autant de solution que possible. Enlever le résidu avec du papier fin et jeter la solution de façon appropriée. Laisser l'appareil sécher avant de le rebrancher.

10. Calculs et interprétation des résultats

Après analyse par ICP ou AAS, calculer la concentration en élément dans la biomasse sèche telle que :

$$C_{plante} = (C_{solution} \times V_F) / M$$

Avec :

Cpiante	la concentration en élément dans la biomasse sèche en mg kg"[1] la
(-"Solution	concentration en élément dans le minéralisat en mg L"[1] le volume
V_F	de minéralisat en mL (soit 25 mL) la masse d'échantillon végétal
M	prélevé en g (soit 0,5 g)

Le rendement de minéralisation est calculé sur les échantillons certifiés ou de contrôle interne tel que :

$$R_{Mine} = \text{Ech-Cont}_{Mesuré} / \text{Ech-Contconsensus} \times 100$$

Avec :

RMine	le rendement de minéralisation en %
Ech-ContMesuré	la concentration en élément mesurée dans l'échantillon de contrôle en mg kg"1 de matière sèche
Ech-Contconsensus	la concentration de consensus en élément de l'échantillon de contrôle en mg kg"1 de matière sèche (disponible sur Evgeny L:\LSE-Assurance-Qualite\5-Inventaire et liste AQ\inventaire échantillons-produits\échantillons de référence\Certificats des échantillons de contrôle)

$$R_{Mine} = \text{Ech-CertMesuré} / \text{Ech-Cert}_{consensus} \times 100$$

Avec :

RMine	le rendement de minéralisation en %
Ech-ContMesuré	la concentration en élément mesurée dans l'échantillon certifié en mg kg"1 de matière sèche
Ech-Contconsensus	la concentration de consensus en élément de l'échantillon de contrôle en mg kg"1 de matière sèche (disponible sur Evgeny L:\LSE-Assurance-Qualite\5-Inventaire et liste AQ\inventaire échantillons-produits\échantillons de référence\Certificats des échantillons de contrôle)

Les résultats sont considérés comme valides si la concentration en élément mesurée dans le blanc de minéralisation est inférieure à la limite de détection et si les rendements de minéralisation calculés sur les échantillons de contrôle entrent dans l'intervalle de confiance ou dans l'intervalle de tolérance donnés par les certificats d'analyse.

Annexe Programme de température muiti paliers pour l'attaque de végétaux par HNO_3/H_2O_2

Etape	Montée		Palier	
	Durée (min)	Température (°C)	Durée (min)	Température (°C)
Solubilisation	45	45	5	45
Pré-digestion	20	65	10	65
Digestion	30	95	60	95

Résumé

L'utilisation de plantes hyperaccumulatrices est un procédé biologique prometteur de dépollution des sols contaminés en éléments traces métalliques. Cette technique n'est cependant pas opérationnelle du fait de la petite taille des plantes hyperaccumulatrices et de la forte diversité d'hyperaccumulation intraspécifique. L'objectif de cette étude est de participer au choix raisonné d'une population du tabouret calaminaire *Noccaea caerulescens* pour sa performance à accumuler de grandes quantités de cadmium et de zinc dans ses feuilles. Pour cela, quatre écotypes ont été sélectionnées. Des test de germination puis des cultures contrôlées dans du sable fertilisé, contaminé ou non en cadmium, ont été effectuées. Des paramètres morphométriques, écophysiologiques et chimiques ont été estimés à différents pas de temps. Les concentrations en métaux et en éléments nutritifs ont été déterminées dans la biomasse foliaire et dans la solution du sable correspondante, ce qui nous a permis de calculer des facteurs de bioconcentration appropriés. Les graines de la population non métallicole et de celle sur sol riche en nickel n'ont pas germées, la résolution de ce problème pouvant être envisagée à l'aide d'ajout d'acide gibbérellique. Dans l'optique d'une phytoremédiation de sols contaminés en ETM, il faut nettement préférer la population métallicole CAL2 de *Noccaea caerulescens* à la population métallicole CAL1 pour sa bien plus grande phytoaccumulation de Zn et de Cd dans les feuilles attribuables à (i) sa meilleure croissance, corrélée à une meilleure utilisation de l'eau pour la photosynthèse et à une transpiration finale par poids de biomasse foliaire moins prononcée et (ii) une prédominance du transport actif plus élevée du Zn (sable sans Cd) ou du Cd (sable contaminé en Cd). Ces approches écophysiologiques pourraient être utilisées avec profit sur un nombre assez élevé de populations de *Noccaea caerulescens* afin d'en sélectionner un nombre limité sur ces bases rationnelles, dans une optique d'amélioration variétale.

Mots clefs : *Noccaea caerulescens*, phytoaccumulation de métaux, écophysiologie, facteurs de bioconcentration.

Abstract

The use of hyperaccumulator plants is a promising biological process of cleaning up contaminated soil in trace metals. This technique is not operational due to the small size of hyperaccumulator plants, the high intraspecific diversity of hyperaccumulation. The objective of this study is to participate in reasoned choice of a *Noccaea caerulescens* ecotype. For this, four populations were selected. The germination test and controlled crop in sand fertilized, contaminated or not cadmium, were performed. Morphometric, ecophysiological and chemical parameters were estimated at different time scales. Concentrations of metals and nutrients were determined in the leaf biomass and the corresponding solution of the sand, which allowed us to calculate relevant bioconcentration factors taking into account both the ecophysiology of metal phytoaccumulation and metal availability. The seeds from the nonmetalliferous soil and that of the nickel-rich soil have sprouted, the resolution of this problem can be seen with the addition of gibberellic acid. From the perspective of phytoremediation of contaminated soil in metals, it is much preferred the CAL2 metalliferous population compared to the CAL1 metalliferous population for its greater Zn and Cd phytoaccumulation in leaves due to (i) its better growth, correlated with better use of water for photosynthesis for the whole culture or at the short time of gas exchanges of the aerial part of the plant, and (ii) a predominance of higher active transport of Zn or Cd. These ecophysiological approaches could be used profitably in a significant number of *Noccaea caerulescens* ecotypes in order to select a limited number of these rational basis with a view to breeding.

Keywords: *Noccaea caerulescens*, métal phytoaccumulation, ecophysiology, BCF.