



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/INRA

THESE

Présentée en vue de l'obtention du titre de

Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine

Spécialité Sciences Agronomiques

par

Vanessa CHARDOT

Réponse de Brassicacées hyperaccumulatrices à la disponibilité du nickel des sols ultramafiques

Date de soutenance : **9 juillet 2007**

Composition du jury :

Catherine KELLER. Professeur, CEREGE, Université Aix-Marseille III.	<i>Rapporteur</i>
Nathalie VERBRUGGEN. Professeur, Université Libre de Bruxelles, Belgique.	<i>Rapporteur</i>
Hubert BRIL. Professeur, Université de Limoge.	<i>Président</i>
Marie-Pierre TURPAULT. Chargée de Recherche, INRA, Nancy.	<i>Examineur</i>
Emmanuelle MONTARGES-PELLETIER. Chargée de Recherche, CNRS-LEM, Nancy.	<i>Membre invité</i>
Jean-Pierre VERGER. Docteur d'Etat, Maître de Conférence retraité, Limoge.	<i>Membre invité</i>
Guillaume ECHEVARRIA. Maître de Conférence HDR, ENSAIA-INPL, Nancy.	<i>Co-directeur</i>
Jean Louis MOREL. Professeur, ENSAIA-INPL, Nancy.	<i>Directeur</i>

REMERCIEMENTS

Ces quatre années de thèse ont été pour moi des années très enrichissantes d'un point de vue professionnelle et personnel. Au cours de celles-ci j'ai croisé la route de nombreuses personnes qui m'ont permis d'avancer. Je souhaite au terme de ce travail les remercier.

Je souhaite en premier lieu remercier le Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie qui m'a offert une aide financière tout au long de mes études supérieures et qui est à l'origine du financement de ma thèse.

Un grand merci à mon directeur de thèse Jean Louis Morel qui m'a accueilli au sein de son Laboratoire dès mon stage DEA, et m'a permis de me pencher sur un projet de recherche qui me tenait vraiment à cœur.

Un grand merci également à mon co-directeur de thèse Guillaume Echevarria, qui a pendant quatre ans partager avec moi ses connaissances et aussi son bureau. *Muito obrigada pela maneira simpatica como me recebeu, pelo teu ajuda e sobretudo pelo teu amizade durante estas quatro anos ;)*

Merci aux membres du jury, Hubert Bril, Catherine Keller, Emmanuelle Montargès-Pelletier, Marie-Pierre Turpault, Nathalie Verbruggen et Jean-Pierre Verger pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier les personnes avec qui j'ai collaboré : Emmanuelle Montargès-Pelletier (je n'oublierai pas l'expérience de nos folles journées et nuits "EXAFS"), Thierry Becquer (merci de m'avoir accueilli dans ta famille lors de nos missions au Brésil), Marie-Pierre Turpault, Geneviève Villemin, Stéphanie Ouvrard, François Bartoli, Jaafar Ganbaja.

Merci à **tous les membres du Laboratoire** qui m'ont accompagné pendant ces quatre années :

Michel Gury pour m'avoir fait connaître et apprécier la science du sol lors de ses cours de maîtrise ; Catherine Sirguy pour son aide à l'ICP et au four ; Denis Vein et Michel Schiavon pour m'avoir guider vers ma soutenance en me donnant de leur temps et de précieux conseils ; Liliane Laurent pour ses solutions miracles à tout, et ses éclats de rire retentissants.

Adeline et ses drôles de p'tites bêtes, Stéph, Bernard et Alain les rois du bricolage et surtout de la fabrication de rhizotron ;) , Jean-Claude le travolta des lames de sols, Olivier et Adrien les as de l'informatique.

Tous les doctorants et stagiaires avec qui j'ai partagé ces années folles : la chite doudou Sandrine, chef des plannings ;) , Abduldul le plus cool des plus cool de l'univers :) , Christophe Calva et Bruno mes compagnons de colonnes lysimétriques et du tour de France ;) Djé le magicien fou, Marie-France, Valérie, Clém, Aïda, et tous les autres...

Enfin, je remercie et je dédie cette thèse à ma famille et mes amis, et tout particulièrement à ma grandi sœur et à mon mikachou, qui m'ont accompagné, motivé et énormément soutenu pendant ces quatre ans.

Table des matières

<i>Introduction générale</i>	1
<i>Chapitre I</i>	6
<i>Localisation, spéciation et disponibilité du nickel lors de son transfert du sol vers la plante hyperaccumulatrice</i>	
1. Le nickel dans les sols	7
1.1. Origine et localisation du nickel dans les sols	7
1.1.1. Origine géochimique	7
1.1.2. Apports naturels et anthropiques.....	9
1.1.3. Localisation du Ni dans les sols	9
1.2. Teneurs du Ni dans les sols	10
1.3. Spéciation du Ni dans les sols	10
1.3.1. Spéciation du Ni en solution	10
1.3.2. Sorption des métaux sur les constituants du sol	11
A. L'adsorption	11
a. Couche diffuse d'ion	11
b. Adsorption non spécifique (physisorption).....	12
c. Adsorption spécifique (Chimisorption)	12
B. Les substitutions isomorphiques	12
C. La précipitation et la co-précipitation.....	13
1.4. Caractérisation des principales phases porteuses de Ni présentes dans les sols ultramafiques	13
1.4.1. Les phyllosilicates.....	13
A. Les smectites	13
a. Généralités.....	13
b. Exemple de la montmorillonite	14
B. Les talcs.....	15
C. Les chlorites	15
D. Les serpentines	16
a. Généralités.....	16
b. Exemple du chrysotile	17
1.4.2. Les oxyhydroxydes	19
A. La goethite.....	19
a. Structure	19
b. Sorption des métaux	19
c. Dissolution.....	20
B. Les phylломanganates	21
1.4.3. Les phases organiques	21
1.5. Mobilité et disponibilité du Ni dans les sols	22
1.5.1. Définition	22
1.5.2. Facteurs contrôlant la mobilité et la disponibilité du Ni dans les sols.....	23
A. Les constituants du sol	23
B. Les conditions physico-chimiques du milieu	24
2. Le Ni dans les plantes hyperaccumulatrices	24
2.1. Généralités	24
2.2. Prélèvement et accumulation du Ni par les plantes hyperaccumulatrices	25
2.2.1. Mobilisation du Ni et absorption par les racines	25
A. Variation du pH.....	25
B. Exsudation de ligands organiques	26
C. Variation des concentrations des espèces ioniques par accumulation ou déplétion	26

D.	Stimulation de l'activité des microorganismes.....	27
2.2.2.	Transfert et spéciation du Ni des racines vers les feuilles.....	27
A.	Le Ni dans les racines.....	27
B.	Le Ni dans la tige.....	29
2.2.3.	Stockage du Ni dans les feuilles.....	31
2.2.4.	Stockage du Ni dans les graines.....	33
2.3.	Avantages écologiques de l'hyperaccumulation.....	34
2.4.	Exploitation des plantes hyperaccumulatrices de Ni.....	35
3.	Conclusion.....	37

Chapitre II..... 39

Matériels et méthodes

1.	Matériels.....	40
1.1.	Plantes.....	40
1.2.	Minéraux tests.....	43
1.3.	Substrat quartzeux.....	44
2.	Préparation des minéraux tests et du substrat quartzeux.....	45
2.1.	Préparation des minéraux tests.....	45
2.1.1.	Synthèse de la goethite.....	45
2.1.2.	Calibrage des échantillons minéraux.....	45
2.1.3.	Purification des phases minérales.....	46
2.1.4.	Séchage.....	46
2.2.	Préparation du substrat quartzeux.....	46
3.	Caractérisation minéralogique et microscopique des échantillons.....	46
3.1.	Diffraction des rayons X (DRX).....	46
3.2.	Microscopie électronique à transmission (MET-EDX).....	47
3.3.	Microscopie électronique à balayage (MEB).....	47
4.	Analyses chimiques.....	48
4.1.	Caractérisation de la disponibilité du Ni par extractions chimiques.....	48
4.1.1.	Extraction du Ni du sol par différents réactifs.....	48
4.1.2.	Ni hydrosoluble « Ni_{H_2O} ».....	49
4.1.3.	Ni extractible au DTPA-TEA « $Ni_{DTPA-TEA}$ ».....	49
4.1.4.	Ni extractible à l'eau régale « Ni_{REG} ».....	49
4.2.	Caractérisation de la disponibilité du Ni par la technique des cinétiques d'échange isotopique « CEI ».....	50
A.	Principe.....	50
B.	Méthode.....	51
C.	Calcul de la valeur E.....	51
D.	Caractérisation de la disponibilité du Ni par la méthode des CEI	52
4.3.	Dosage du pH_{H_2O}	52
4.4.	Minéralisation des végétaux.....	52
4.5.	Dosage du Ni dans les échantillons liquides.....	53
5.	Traitement statistique des données.....	53

Chapitre III..... 54

Contribution des phases minérales nickélifères à la phytodisponibilité du nickel dans les sols ultramafiques

1. Matériels et méthodes..... 56

1.1. Présentation du site étudié 56

1.1.1. Géologie 56

1.1.2. Pédologie..... 57

1.1.3. Végétation 60

1.2. Méthodes..... 60

1.2.1. Distribution et teneur du Ni dans les tissus de *Th. caeruleus* 60

1.2.2. Caractérisation de la disponibilité du Ni dans les sols 60

1.2.3. Extractions à l'oxalate et au réactif Citrate-Dithionite-Bicarbonate..... 61

1.2.4. Etudes minéralogiques et spectroscopiques 61

2. Résultats..... 61

2.1. Concentration en Ni dans les plantes 61

2.2. Disponibilité du Ni dans les sols ultramafiques du site de Bergenbach 63

2.2.1. Compartiments échangeables du Ni 63

2.2.2. Ni hydrosoluble et Ni extractible au DTPA-TEA 64

2.2.3. Relation entre la disponibilité du Ni dans le sol et son prélèvement par *Th. caeruleus* 65

2.2.4. Facteurs physico-chimiques liés à la phytodisponibilité du Ni dans les sols 66

2.3. Eléments liés au Ni dans les sols 68

2.4. Contribution des phases minérales porteuses de Ni à la disponibilité du Ni..... 69

2.4.1. Principales phases minérales 69

2.4.2. Identification des phases minérales porteuses de Ni 70

2.4.3. Distribution du Fe et du Ni dans les sols 70

3. Discussion..... 72

4. Conclusion 73

Chapitre IV 74

Spéciation et disponibilité du nickel dans trois minéraux modèles porteurs de nickel

1. Matériels et méthodes..... 75

1.1. Caractérisations des minéraux porteurs de nickel..... 75

1.1.1. Matériels..... 75

1.1.2. Méthodes 75

A. Cristallochimie, surface spécifique et CEC 75

B. Caractérisation de la disponibilité du Ni 76

1.2. Comportement des minéraux porteurs de nickel en milieu naturel..... 76

1.2.1. Matériels..... 76

1.2.2. Méthodes 76

A. Mise en place de l'expérimentation..... 76

B. Récolte des échantillons 77

C. Analyses chimiques..... 77

1.3. Dissolution des minéraux porteurs de nickel..... 77

1.3.1. Matériels..... 77

1.3.2. Méthodes 77

A. Dispositif d'expérimentation 77

B.	Suivi de l'expérimentation	79
C.	Analyses	79
D.	Calcul du taux de dissolution	79
2.	Résultats.....	80
2.1.	Caractérisation des minéraux porteurs de nickel	80
2.1.1.	Cristallochimie, surface spécifique et CEC.....	80
2.1.2.	Teneur et disponibilité du Ni au sein des phases minérales	82
2.2.	Comportement des minéraux porteurs de nickel en milieu naturel.....	83
2.2.1.	Evolution du pH	83
2.2.2.	Evolution du Ni hydrosoluble	84
2.2.3.	Evolution des teneurs du Ni extractible au <i>DTPA-TEA</i>	84
2.2.4.	Evolution des teneurs du Ni extractible à l'eau régale	85
2.3.	Dissolution des minéraux porteurs de nickel.....	86
3.	Discussion.....	88
3.1.	Spéciation et disponibilité du Ni dans les minéraux	88
3.2.	Altération du Chrysotile et de la Goethite	90
4.	Conclusion.....	91
Chapitre V.....		92
Transferts du Nickel dans le système minéral-terre- plante hyperaccumulatrice		
1. Matériels et méthodes.....		94
1.1. Matériels		94
1.1.1.	Terre de remplissage	94
1.1.2.	Minéraux porteurs de Ni	96
1.1.3.	Espèces végétales	96
1.2. Méthodes.....		97
1.2.1.	Dispositif de culture	97
1.2.2.	Conditions de culture	98
1.2.3.	Récolte des végétaux	99
1.2.4.	Récolte de la terre et des sachets contenant les minéraux	99
1.2.5.	Analyses	100
A.	Minéralisation des échantillons végétaux.....	100
B.	Extractions chimiques	100
1.2.6.	Disponibilité du Ni dans l'ensemble du système et bilan de l'altération des minéraux nickélicifères 101	
A.	Quantité de Ni extractible au <i>DTPA-TEA</i> de la terre.....	101
B.	Concentration moyenne du Ni extractible au <i>DTPA-TEA</i> de la terre.....	101
C.	Quantité de Ni libéré par l'altération des minéraux modèles	102
2. Résultats.....		103
2.1. Dynamique du Ni dans le système minéral-terre- plante		103
2.1.1.	Transfert du Ni vers les plantes	103
A.	Production de biomasse.....	103
B.	Distribution des racines au sein du substrat.....	104
C.	Concentration du Ni dans les plantes	106
D.	Quantités de Ni extraites par les plantes.....	107
2.1.2.	Effets de la culture sur les minéraux porteurs de Ni.....	108
A.	pH.....	108
B.	Ni hydrosoluble	109
C.	Ni extractible au <i>DTPA-TEA</i>	110
D.	Ni extractible à l'eau régale.....	110

E.	Paramètres de cinétiques d'échange isotopique du Ni	112
2.1.3.	Effet de la culture sur la terre de remplissage	114
A.	Effet des plantes sur la disponibilité du Ni dans la terre	114
B.	Caractérisation des transferts de Ni au sein du substrat	116
2.2.	Bilan des transferts de Ni dans le système terre-plante.....	122
2.2.1.	Influence des plantes sur la disponibilité du Ni dans la terre	122
2.2.2.	Influence des plantes sur l'altération des minéraux tests.....	123
A.	Chrysotile	123
B.	Smectite.....	124
C.	Goethite	125
3.	Discussion.....	126
3.1.	Transferts de Ni dans le système minéral-terre	126
3.2.	Influence de la culture de plante sur la fraction de Ni disponible de la terre et sur l'altération des minéraux nickélicifères	127
4.	Conclusion	129

Chapitre VI..... 131

Spéciation du nickel dans les tissus des plantes hyperaccumulatrices

1.	Matériels et méthodes.....	132
1.1.	Matériels	132
1.2.	Méthodes.....	134
1.2.1.	Préparation des échantillons végétaux.....	134
1.2.2.	Solutions modèles	135
1.2.3.	Acquisition des spectres XAS	136
2.	Résultats.....	137
2.1.	XANES.....	137
2.1.1.	Solutions de référence	137
2.1.2.	Echantillons végétaux	138
2.2.	EXAFS	139
2.2.1.	Solutions de référence	139
2.2.2.	Echantillons végétaux	142
3.	Discussion.....	146
4.	Conclusion	147

Chapitre VII

Mobilisation du Ni dans la rhizosphère des hyperaccumulateurs dans les milieux à faible disponibilité du Ni

1.1.	Culture en colonne lysimétrique.....	150
1.1.1.	Matériels.....	150
A.	Phase minérale porteuse de Ni	150
B.	Espèce végétale	150
1.1.2.	Méthodes	150
A.	Mise en place et suivi de la culture	150
B.	Suivi de la culture.....	151
C.	Récolte des échantillons	152
D.	Analyses chimiques.....	152

a.	Minéralisation des végétaux	152
b.	Caractérisation de la disponibilité du Ni	152
c.	Mesure de pH	152
d.	Dosages des éléments	152
E.	Analyses minéralogiques et microscopiques	152
F.	Comptage bactérien.....	153
1.2.	Culture en hydroponie.....	153
1.2.1.	Matériels.....	153
A.	Solution nutritive.....	153
B.	Espèces végétales	153
1.2.2.	Méthodes	154
A.	Mise en place de la culture	154
B.	Suivi de la culture et récolte des échantillons.....	155
C.	Analyses	155
2.1.	Altération du chrysotile dans la rhizosphère de <i>L. emarginata</i>.....	155
2.1.1.	Biomasse	155
2.1.2.	Concentration en Mg, de Ni et de Fe dans les tissus de <i>L. emarginata</i>	156
2.1.3.	Minéralomasse	156
2.1.4.	Bilan d'altération du chrysotile	157
A.	Quantification et transferts du Mg et du Ni.....	157
B.	Evolution de la disponibilité du Ni dans le Chrysotile après la culture.....	158
C.	Cinétique d'altération du Chrysotile	159
D.	Taux de dissolution du Chrysotile.....	160
2.1.5.	Analyses minéralogiques du mélange Chrysotile- <i>Quartz</i>	160
2.1.6.	Analyses microscopiques du mélange Chrysotile- <i>Quartz</i>	161
2.2.	Mécanismes impliqués dans la mobilisation du Ni.....	161
2.2.1.	Activité des bactéries dans la rhizosphère de <i>L. emarginata</i>	161
2.2.2.	Evolution du pH dans la rhizosphère de <i>L. emarginata</i>	162
2.2.3.	Relation entre l'absorption du Ni et la production de malate et de citrate par les hyperaccumulateurs	163
A.	Teneur en Ni.....	163
B.	Teneur en acide citrique et en acide malique	165
C.	Relation entre les teneurs en acides organiques et les teneurs en Ni dans les plantes	167
	Conclusion générale.....	170
	Références bibliographiques.....	178
	Annexes.....	196
	Listes des Figures	211
	Liste des tableaux	215
	Liste des photographies	216
	Table des matières	1

Introduction générale

Les plantes hyperaccumulatrices de métaux ont développé des mécanismes spécifiques de prélèvement de la fraction disponible des métaux du sol, conduisant à leur accumulation dans les parties aériennes. Elles peuvent s'installer et se développer sur des milieux à fortes teneurs en éléments métalliques (sols ultramafiques ou sols pollués), généralement toxiques pour les autres espèces végétales. La culture de telles plantes réduit significativement la quantité de métal disponible du sol (Shallari, 1997 ; Gérard *et al.*, 2000 ; Sirguey *et al.*, 2004 ; Chardot *et al.*, 2005). Aussi, l'utilisation agronomique des plantes hyperaccumulatrices (procédé de phytoextraction) pourrait être une voie de dépollution des sols contaminés en métaux. De plus, la biomasse des plantes récoltées, fortement concentrée en métaux, pourrait présenter un intérêt économique pour l'industrie métallurgique (phytomining) (Nicks et Chambers, 1995 ; Robinson *et al.*, 1997 a et b ; Chaney, 1999). L'extraction du métal du sol varie en fonction des espèces et même entre les populations d'une même espèce (Roosens *et al.*, 2003 ; Schmitt-Sirguey, 2004 ; Cosio *et al.*, 2005). Il a été établi que le potentiel de phytoextraction des hyperaccumulateurs dépend, d'une part, de leur développement végétatif (vitesse de croissance, biomasse), et de leur capacité à accumuler le métal dans leurs tissus (Schwartz *et al.*, 2003 ; Massoura *et al.*, 2004 ; Chardot *et al.*, 2005). Il dépend, d'autre part des conditions environnementales du milieu sur lequel les plantes se développent (sol, climat), et notamment de la disponibilité du métal dans le sol (Schmitt-Sirguey, 2004 ; Chardot *et al.*, 2005 ; Chardot *et al.*, 2007). Pour une valorisation optimale du potentiel des plantes hyperaccumulatrices en tant qu'outils de décontamination, une bonne connaissance de leur fonctionnement et de leur rôle vis-à-vis de la disponibilité du métal est indispensable.

Dans les milieux ultramafiques, caractérisés par des concentrations élevées en nickel, se développent naturellement des espèces hyperaccumulatrices de Ni (Ni dans les parties aériennes > 1000 mg kg⁻¹ de matière sèche). Ces espèces présentent, d'une part, un intérêt écologique pour la décontamination des sites contaminés qui constituent un risque écotoxicologique et, d'autre part, un intérêt économique compte tenu de la valeur du Ni sur le marché actuel (50000 \$ la tonne).

Ce travail a pour objectif de contribuer à la compréhension des mécanismes chimiques et biologiques qui conditionnent l'accumulation du Ni dans les parties aériennes des plantes hyperaccumulatrices, en réponse à la disponibilité du métal du sol. Pour cela nous nous sommes intéressés, (i) à l'origine et à la nature des formes du Ni disponibles pour les plantes hyperaccumulatrices dans les sols ultramafiques, (ii) au comportement des espèces hyperaccumulatrices en réponse à la disponibilité du Ni dans le sol rhizosphérique, (iii) et aux processus physiologiques impliqués dans l'hyperaccumulation du Ni (absorption, transfert et stockage dans la plante).

De cet objectif se dégagent trois questions scientifiques majeures sur lesquelles s'appuiera l'ensemble de nos travaux de recherche :

- (1) Quelle est la contribution des phases minérales nickélifères au transfert du Ni vers les plantes hyperaccumulatrices ?
- (2) Les plantes hyperaccumulatrices de Ni ont-elles une influence sur l'altération de ces phases minérales nickélifères ?
- (3) La spéciation du Ni dans la plante joue-t-elle un rôle sur l'efficacité de l'hyperaccumulation ?

Pour répondre à ces interrogations deux approches complémentaires ont été mises en œuvre : (i) une étude *in situ*, fondée sur l'observation du fonctionnement du système *sol ultramafique - plante hyperaccumulatrice* en milieu naturel, et (ii) une approche expérimentale réalisée en laboratoire, plus centrée sur les mécanismes individuels impliqués dans le processus de phytoextraction.

Le **premier chapitre** est une étude bibliographique consacrée à la dynamique du Ni dans le système sol-plante hyperaccumulatrice. Dans une première partie sont présentées l'origine, la spéciation et la disponibilité du Ni dans les sols. La seconde partie est une synthèse des principaux acquis sur les mécanismes impliqués dans l'hyperaccumulation du Ni (mobilisation, absorption, translocation et séquestration du Ni). Elle aborde également l'avantage évolutif de ce processus pour les plantes, ainsi que le procédé de phytoextraction du Ni.

Dans le **second chapitre**, nous expliquons notre démarche scientifique et présentons les matériels et les méthodes communs à l'ensemble des expérimentations menées dans le cadre de ces travaux de thèse. Dans une première partie sont présentés les minéraux nickélifères et les plantes hyperaccumulatrices testés lors des différentes expérimentations. Dans les parties suivantes sont décrites les méthodes employées pour : (i) la préparation des minéraux nickélifères (synthèse, purification, calibrage), (ii) la caractérisation minéralogique et microscopique des échantillons de sols et de minéraux, (iii) la caractérisation du pH et de la disponibilité du Ni (extractions chimiques, cinétiques d'échanges isotopiques), (iv) la mesure des teneurs en Ni dans les plantes (minéralisations), et enfin (v) l'analyse statistique des résultats.

En réponse à la première question scientifique, le **troisième chapitre** permet d'établir à l'échelle du terrain les relations entre la minéralogie des sols ultramafiques, la disponibilité du Ni dans les sols résultant de ces relations, et l'accumulation du Ni par les plantes hyperaccumulatrices. Cela au travers de l'étude d'une toposéquence de sols situés sur un site ultramafique sur lequel se développe une population native hyperaccumulatrice de Ni, *Th. caerulescens*.

L'objectif du **quatrième chapitre** est d'approfondir les résultats obtenus sur le terrain en tentant d'établir l'importance, d'une part, de la nature des minéraux (structure cristallographique, chimie) et, d'autre part, de la spéciation et de la teneur du Ni au sein du minéral, vis-à-vis de la disponibilité du Ni dans les sols. Pour cela trois phases minérales nickélifères modèles communes des sols ultramafiques, de nature différente (phyllosilicates, oxyhydroxyde), et représentant une gamme de disponibilité du Ni, ont été étudiées.

Dans le **cinquième chapitre**, nous traitons la seconde question scientifique concernant l'influence des hyperaccumulateurs sur l'altération des minéraux nickélifères. Aussi, les objectifs majeurs de ce chapitre sont : (i) de qualifier et quantifier l'impact de la culture de plantes hyperaccumulatrices sur l'altération de trois phases minérales nickélifères modèles, insérées au sein du substrat de culture, et (ii) d'établir les conséquences de cette altération sur le transfert et la disponibilité du Ni au sein du système minéral-substrat-plante. Nous abordons également dans ce chapitre une partie de la troisième question scientifique en testant l'aptitude de trois espèces hyperaccumulatrices à accumuler le Ni en fonction de l'offre en Ni au sein du substrat de culture. Il s'agit d'établir le lien entre, d'une part, le potentiel de phytoextraction des espèces hyperaccumulatrices et, d'autre part, la morphologie du système racinaire, la biomasse végétale, et l'efficacité du transfert du Ni des racines vers les feuilles.

Dans la continuité du chapitre précédent, nous nous focalisons dans le **sixième chapitre** sur l'étude des mécanismes impliqués dans le transfert du Ni des racines vers les feuilles des hyperaccumulateurs. L'objectif est d'établir la relation entre l'efficacité d'extraction du Ni de trois plantes hyperaccumulatrices et la spéciation du Ni dans les organes des plantes hyperaccumulatrices (racines, tiges et feuilles).

Dans le **septième chapitre**, nous étudions l'influence des hyperaccumulateurs sur l'altération des minéraux nickélifères, dans le cas particulier où l'offre en Ni disponible du milieu de culture est faible. Il s'agit dans une première partie de qualifier et de quantifier l'altération des minéraux nickélifères dans la rhizosphère des hyperaccumulateurs lorsque la phase minérale, caractérisée par une teneur du Ni disponible faible, est la seule source de Ni au sein du système. Nous tentons dans une seconde partie de dégager les mécanismes pouvant être impliqués dans la mobilisation du Ni au sein de la rhizosphère (libération de protons par les racines, production de composés organiques complexant le Ni, microorganismes).

Nous concluons ce travail par une synthèse des connaissances acquises sur les facteurs pouvant influencer la phytodisponibilité du Ni dans les sols. Nous montrons (i) que la disponibilité du Ni dans les sols dépend fortement de l'abondance, de l'altérabilité, de la teneur du Ni des minéraux et de la spéciation du Ni au sein des minéraux du sol, et (ii) que l'impact des plantes hyperaccumulatrices sur la disponibilité du Ni dépend d'une part, de la quantité de Ni initialement disponible dans le milieu de culture et, d'autre part, de l'espèce hyperaccumulatrice cultivée. Nous contribuons ainsi à la connaissance d'une partie du cycle biogéochimique du Ni (transfert du sol vers la plante) dans le système *sol ultramafique – plante hyperaccumulatrices*.

Enfin, au vu de cette étude, nous identifions les processus et leurs modalités qui devront être pris en compte dans l'élaboration d'un modèle de cultures visant à simuler l'extraction du Ni d'un sol par les hyperaccumulateurs ; la modélisation étant une étape nécessaire à l'application et à l'optimisation du procédé de phytoextraction à grande échelle.

Chapitre I

**Localisation, spéciation et disponibilité du nickel
lors de son transfert
du sol vers la plante hyperaccumulatrice**

La compréhension des relations entre la disponibilité du Ni dans les sols et son absorption par les hyperaccumulateurs passe par la caractérisation du transfert de l'élément de la phase solide vers la solution du sol, puis des racines jusqu'aux parties aériennes de la plante.

La distribution du Ni entre la phase solide et la solution du sol est un critère essentiel dans l'estimation des risques écotoxicologiques engendrés par la présence du métal dans l'environnement. Cette distribution dépend notamment de l'origine, de la localisation et de la spéciation du Ni dans les sols, de même que des conditions physico-chimiques du milieu.

Du fait de leurs intérêts à la fois environnemental et économique, les plantes hyperaccumulatrices font l'objet de nombreuses études depuis les années 1980. Les mécanismes impliqués dans l'hyperaccumulation sont souvent spécifiques à une espèce donnée. Aussi, la seconde partie bibliographique de ce chapitre se destine à faire un bilan des connaissances acquises sur les plantes hyperaccumulatrices de Ni tant au niveau de leur écophysiologie qu'au niveau de leur utilisation en tant qu'outils de décontamination des sols pollués en Ni.

1. Le nickel dans les sols

1.1. Origine et localisation du nickel dans les sols

1.1.1. Origine géochimique

L'altération chimique des phases minérales porteuses de Ni contenues dans les roches ultramafiques (roches ignées ultrabasiqes) constitue la première source de Ni des sols (Uren *et al.*, 1992). Aussi, les teneurs en Ni dans les sols dépendent fortement des processus pédogénétiques impliqués et de la composition initiale de la roche mère.

Les péridotites (*e.g.* harzburgite, dunite) sont des roches ultramafiques issues du manteau supérieur de la terre (Coleman et Jove, 1992). En fonction du degré de serpentinisation des péridotites (processus d'altération hydrothermal), l'altération de ces roches sous climat tropical peut conduire à la formation de deux types de sols (Figure 1, Coleman et Jove, 1992) : (i) dans le cas de péridotites faiblement serpentinisées, l'altération conduit à la formation de sols latéritiques nickélifères ; (ii) dans le cas de péridotites fortement serpentinisées (serpentinites), l'altération conduit à la formation de sols de serpentine.

Les péridotites sont constituées essentiellement d'olivines, accompagnées de pyroxènes et de spinelles (*e.g.* chromite). Ces roches contiennent généralement d'importantes quantités de Ni (de l'ordre de 2500 mg kg⁻¹). Aussi, dans les zones altérées, les teneurs en Ni sont régulées par la dissolution des olivines et des orthopyroxènes (phases minérales porteuses de Ni), et par la migration du Mg et de la Si dans la phase liquide. En revanche, les serpentines (phyllosilicates plus stables que les olivines et les pyroxènes) relâchent beaucoup moins de Ni et de Fe dans les zones altérées.

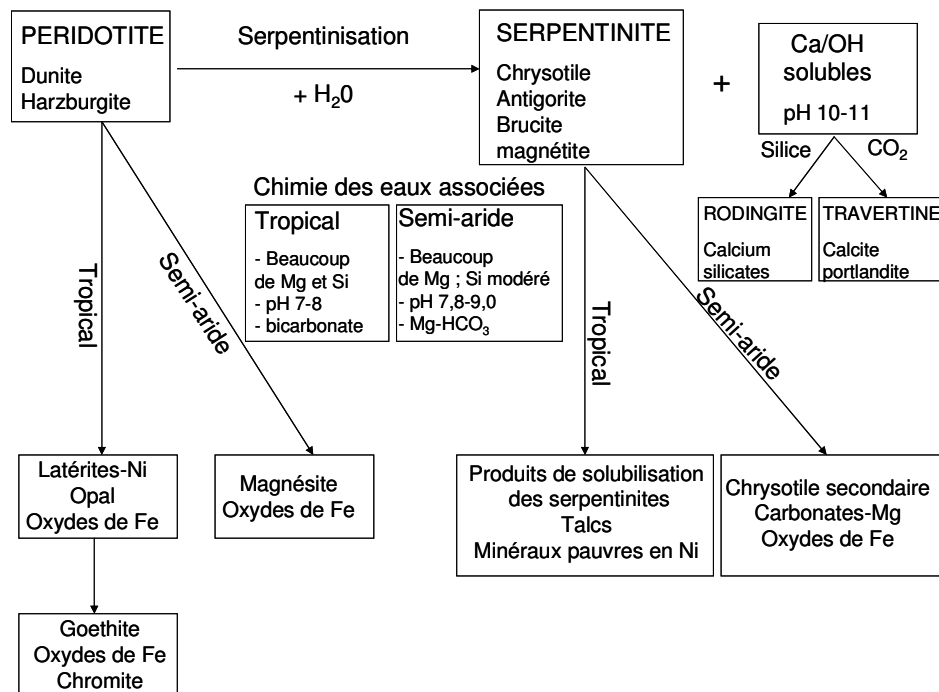


Figure 1. Altération des péridotites et des serpentinites sous climats tropical et semi-aride (Coleman et Jove, 1992).

1.1.2. Apports naturels et anthropiques

Les retombées atmosphériques constituent une source importante de Ni dans les sols. Celles-ci peuvent être la conséquence d'émissions naturelles ou anthropiques. Les rejets naturels mondiaux de Ni, ont été estimés à 8500 tonnes par an. Ceux-ci proviennent essentiellement de poussières éoliennes et d'émissions volcaniques (Bennett, 1981). Les émissions anthropiques sont estimées à 43000 t de Ni par an (Schmidt et Andren, 1980). La combustion du pétrole, le raffinage des minerais de Ni et l'incinération des déchets domestiques, constituent l'essentiel des rejets atmosphériques anthropiques mondiaux (Bennett, 1984).

En plus des émissions atmosphériques, la production du Ni dans les industries métallurgiques (raffinerie, fonderie,...) conduit au rejet d'effluents liquides et à la production de déchets solides contenant de fortes quantités de polluants métalliques. Ces rejets constituent une source de Ni importante pour les sols situés au niveau et à proximité du site d'exploitation.

L'épandage de boues d'épuration et d'engrais en agriculture peut également contribuer, dans une moindre mesure, à l'augmentation de la teneur en Ni des sols (Uren, 1992 ; Juste *et al.*, 1995).

1.1.3. Localisation du Ni dans les sols

Le Ni est essentiellement associé aux constituants solides du sol, minéraux et organiques (Uren, 1992). Les formes minérales porteuses de Ni se trouvent principalement dans les minéraux silicatés et différents oxydes hydratés, qui fournissent des sites octaédriques capables de retenir le Ni²⁺ (Uren, 1992). Dans les sols calcaires, les carbonates de calcium sont les constituants majeurs intervenant dans la sorption de l'élément (Juste *et al.*, 1995). Dans les sols issus de roches ultramafiques, la plupart du Ni est associé aux minéraux secondaires de la fraction fine du sol. Ces minéraux secondaires sont principalement des minéraux silicatés tels que des serpentines, des chlorites (phyllosilicates) et des oxydes de Fe et de Mn (Manceau et Calas, 1985 ; Manceau *et al.*, 2000 ; Becquer *et al.*, 2001 ; Massoura *et al.*, 2006 ; Becquer *et al.*, 2006). La matière organique est un piège efficace pour la rétention des micro-polluants, et montre notamment une forte affinité avec le Ni (Juste *et al.*, 1995 ; Yin *et al.*, 2002). Ainsi, le Ni peut se retrouver en grande partie dans la fraction organique des sols, au niveau des horizons de surface (Juste *et al.*, 1995).

1.2. Teneurs du Ni dans les sols

Les teneurs du Ni mesurées dans les sols varient généralement de quelques mg kg^{-1} à plusieurs milliers de mg kg^{-1} . Ces teneurs dépendent essentiellement de la composition chimique initiale de la roche mère à partir de laquelle s'est formé le sol, et des processus d'altération intervenus tout au long de la formation du sol. Les sols dérivés des roches ultramafiques présentent les teneurs en Ni les plus élevées, généralement supérieures à 1000 mg kg^{-1} (Baker *et al.*, 1992). Elles peuvent atteindre jusqu'à $27\,000 \text{ mg kg}^{-1}$ dans les sols latéritiques du Brésil développés sur pyroxénite (Becquer *et al.*, 2005). Les teneurs en Ni mesurées dans les horizons de surface de sols cultivés français s'échelonnent entre $< 2,7$ et 292 mg kg^{-1} (médiane à $23,5 \text{ mg kg}^{-1}$) (Baize, 2000 ; Echevarria *et al.*, 2000). En France, la concentration maximale autorisée dans les sols destinés à recevoir les boues d'épuration (Arrêté du 8 janvier 1998) est de 50 mg kg^{-1} .

La fraction de Ni hydrosoluble est déterminante dans l'étude des risques écotoxicologiques, car elle correspond à la quantité de Ni mobile, instantanément disponible pour l'ensemble des organismes vivants. Dans les sols non contaminés, le gamme de concentration en Ni dans la solution varie de quelques $\mu\text{g l}^{-1}$ à une centaine de $\mu\text{g l}^{-1}$ (Kataba-Pendias et Pendias, 2001 ; Baralkiewicz et Siepak, 1999 ; Anderson *et al.*, 1973). Dans les sols à forte teneur en Ni (sols pollués ou ultramafiques), les teneurs du Ni en solution sont environ 100 fois supérieures aux concentrations rencontrées dans les sols non contaminés (Uren, 1992). Les teneurs en Ni peuvent alors atteindre plus de $3000 \mu\text{g l}^{-1}$ (Anderson *et al.*, 1973).

1.3. Spéciation du Ni dans les sols

1.3.1. Spéciation du Ni en solution

La présence et la nature des espèces chimiques en solution sont fortement influencées par la phase solide du sol, relativement à sa composition chimique et à sa réactivité vis-à-vis du Ni^{2+} (Uren, 1992). Dans la plupart des solutions aqueuses, la forme la plus stable du Ni est l'ion divalent Ni^{2+} sous forme hydratée $\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ (Baes et Mesmer, 1976). Celle-ci est majoritaire pour des $\text{pH} < 7$, mais cette prédominance tend à diminuer lorsque le pH et l'activité de certains ligands (*e.g.* OH^- , CO_3^{2-}) augmentent (Uren, 1992). Dans les sols acides et/ou réducteurs, et relativement aux teneurs en ions SO_4^{2-} et HPO_4^{2-} de la solution du sol, les formes Ni^{2+} , NiSO_4 et NiHPO_4 sont les espèces chimiques les plus représentées (McGrath, 1995). Pour des $\text{pH} \geq 7$, le Ni est essentiellement présent sous forme d'hydroxyde $\text{Ni}(\text{OH})_2$,

ou de complexes solubles formés avec des ligands organiques ou inorganiques (acides organiques, carbonates, sulfates, chlorures...) (McGrath, 1995 ; Uren, 1992). Les complexes organiques formés avec le Ni sont en général très stables. La stabilité de ces complexes dépend essentiellement de la nature du ligand. Par exemple, les constantes de stabilité K des complexes Ni-L sont telles que ($\log K$) : EDTA (18,7) \gg histidine (8,7) > citrate (5,4) > malate (3,2) (Martell et Smith, 1974 ; Bissani, 2000).

1.3.2. Sorption des métaux sur les constituants du sol

La « sorption » est le terme global employé pour définir les transferts d'ions ou de molécules de la phase liquide vers la phase solide, ce indépendamment de la (ou les) réaction(s) impliquée(s) (McBride, 2000). La sorption du Ni sur la phase solide du sol est notamment affectée par le type de sorbant, le pH, la concentration et la stabilité des complexes Ni-ligands présents dans la solution du sol (Marcussen *et al.*, 2003). L'étude des différentes réactions de sorption est importante dans le sens où ces réactions influencent la mobilité et la biodisponibilité des éléments. Ainsi, en fonction de la position des cations au niveau de la structure cristalline des constituants minéraux, ceux-ci vont être plus ou moins échangeables avec les cations présents dans la solution du sol.

A. L'adsorption

Certains cations contenus dans la solution du sol peuvent se fixer à la surface des constituants solides du sol pour compenser le déficit de charge de ces derniers. Trois états d'adsorption peuvent être distingués (Sposito *et al.*, 1999 ; Sposito, 2000) : la couche diffuse d'ions, l'adsorption non spécifique et l'adsorption spécifique. Ces trois états contribuent à la formation de la double couche électrochimique à la surface des particules chargées (Everett, 1972, Sposito, 2000).

a. Couche diffuse d'ion

L'ion hydraté est séparé de la surface du constituant solide par plusieurs couches d'hydratation. La charge globale du nuage d'ions est de signe opposé à la charge superficielle du constituant. La couche diffuse résulte d'un équilibre entre les forces électrostatiques et les forces d'agitation thermique.

b. Adsorption non spécifique (physisorption)

Dans le cas de l'adsorption non spécifique (complexe de sphère externe), les cations sont solvatés et maintenus principalement par des forces électrostatiques à la surface de la phase solide avec leur sphère de solvation. La rétention des cations est alors relativement faible. De ce fait, les cations adsorbés sont facilement échangeables et migrent donc facilement vers la solution du sol. L'adsorption non spécifique est fortement influencée par la force ionique de la solution (cité par Scheckel, 2000, d'après Sparks, 1995).

c. Adsorption spécifique (Chimisorption)

Dans le cas de l'adsorption spécifique (complexe de sphère interne), les cations ne présentent plus d'enveloppe d'hydratation. Ils sont intimement complexés aux groupements fonctionnels des constituants du sol (-OH, -COOH), généralement par des liaisons covalentes. La rétention des cations à la surface de la particule solide est alors plus forte que dans le cas de l'adsorption non spécifique (Sposito, 2000 ; Stumm, 1997). La formation de complexes de sphère interne est souvent irréversible et conduit à la libération de protons dans le milieu (McBride, 2000).

B. Les substitutions isomorphiques

Lorsqu'un cation a été adsorbé de manière spécifique, il peut diffuser dans la structure cristalline d'un minéral et y remplacer un cation ou combler une lacune cationique. En fonction de la valence et du rayon ionique de l'élément incorporé, celui-ci est susceptible d'occuper différentes positions au sein de la structure cristalline. Par exemple, le Ni^{2+} (rayon ionique de 0,70 Å) peut migrer dans la structure cristalline des minéraux uniquement au niveau des sites octaédriques.

Les substitutions isomorphiques de certains cations par des cations de valence inférieure induisent des déficits de charges positives permanents. Par exemple, dans les sites octaédriques de la structure cristalline des minéraux, Ni^{2+} peut remplacer des ions trivalents tels que Al^{3+} ou Fe^{3+} . Ces déficits confèrent à l'ensemble de la structure cristalline du minéral concerné une charge négative permanente, indépendante du pH du sol. De telles charges peuvent conduire à la formation de complexes de sphère externe.

C. La précipitation et la co-précipitation

Le phénomène de précipitation est la formation d'un mélange solide soit dans la phase liquide, soit à la surface d'une phase solide préexistante (Sposito, 1986).

La précipitation homogène correspond à la formation d'une phase solide en solution. Celle-ci se produit lorsque la concentration des espèces chimiques en solution excède le produit de solubilité de la phase solide.

La précipitation hétérogène, ou précipitation de surface, est une réaction qui se produit à l'interface solide-liquide. Elle se produit lorsque les sites d'adsorption spécifique sont saturés. Ainsi, la précipitation de surface inclut : (i) l'adsorption du cation sur la surface d'un constituant donné, (ii) l'initialisation de la nucléation de surface, (iii) la croissance cristalline en dehors de cette surface (Stumm, 1992).

La co-précipitation est définie comme la précipitation simultanée de plusieurs éléments (Sposito, 1989). Cette réaction se produit lorsqu'une phase minérale précipite et incorpore un élément exogène dans sa structure cristalline, en remplacement d'un atome constitutif du minéral.

1.4. Caractérisation des principales phases porteuses de Ni présentes dans les sols ultramafiques

1.4.1. Les phyllosilicates

Les phyllosilicates, appelés plus communément « argiles vraies », sont constitués de feuillets formant une structure lamellaire (phylloites). Chaque feuillet est formé par l'empilement de couches tétraédriques (T) siliceuses et de couches octaédriques (O) alumineuses, magnésiennes et/ou ferreuses (Bailey, 1980 ; Brown, 1984 ; Olson *et al.*, 2000).

A. Les smectites

a. Généralités

Les smectites sont des phyllosilicates basés sur une structure à trois couches (argiles 2:1 ou TOT). L'organisation des feuillets ne permet pas leur assemblage par des liaisons hydrogènes. Aussi, l'épaisseur des feuillets est variable (argiles gonflantes). Les cations présents dans la solution du sol ont de ce fait facilement accès à l'espace interfoliaire.

Les smectites regroupent plusieurs minéraux de même structure cristallographique. Ceux-ci diffèrent par la présence ou l'absence de substitutions tétraédriques. Par exemple, la montmorillonite est caractérisée par l'absence de substitution tétraédrique, à l'inverse des

beidellites qui en offrent de nombreuses (Cojan et Renard, 1997 ; Duchaufour, 1997). De plus, en fonction du taux d'occupation des sites octaédriques, les smectites peuvent être soit dioctaédriques (deux sites sur trois sont occupés par des cations trivalents, *e.g.* montmorillonites), soit trioctaédriques (l'ensemble des sites est occupé par des cations bivalents, *e.g.* saponite) (Güven, 1988).

b. Exemple de la montmorillonite

La montmorillonite $[(Al, Fe, Mg)_2 Si_4 O_{10} (OH)_2] \cdot nH_2O$ est le minéral du groupe des smectites le plus commun dans les sols (Olson *et al.*, 2000).

Sorption des métaux

Les substitutions octaédriques au sein du réseau cristallin des montmorillonites entraînent un déficit de charges positives (Güven, 1988) et laissent aux feuillets un grand pouvoir d'écartement. La capacité d'échange cationique (CEC) des montmorillonites peut varier entre 80 et 120 $cmol^+kg^{-1}$ (Zbytniewski *et al.*, 2003).

Le Ni localisé au niveau des espaces interfoliaires de la montmorillonite est préférentiellement sous forme hydratée $Ni(H_2O)_6^{2+}$ (Pitteloud *et al.*, 2001). La sorption du Ni sur le minéral est fortement limitée en présence de citrate (Marcusen *et al.*, 2003). Cette diminution serait attribuée à la formation de complexes Ni-citrate, neutres ou anioniques. Lorsque le minéral est saturé en Ni, le métal présent au niveau des espaces interfoliaires peut migrer vers les sites octaédriques vacants (Muller *et al.*, 1997). Toutefois, la diffusion des atomes de Ni au sein de la structure du minéral reste limitée (Dähn *et al.*, 2003). Le processus de sorption dominant correspond à la formation de complexes de surfaces au niveau des sites de bordures de feuillets (Elzinga et Sparks, 1999 ; Dähn *et al.*, 2003).

Dissolution

La dissolution des smectites évolue généralement en deux temps (Metz *et al.*, 2005). Dans un premier temps, la réaction de dissolution n'est pas congruente. Elle est alors caractérisée par un échange rapide des cations situés au niveau de l'espace interfoliaire (*e.g.* Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+}) avec la solution du sol. Dans le cas de smectites à forte teneur en Ni, l'extraction du Mg est environ deux fois inférieure à celle du Ni (Voskresenskaya et Coliazo, 1983). Dans un second temps, la dissolution devient congruente. Le rapport Al/Si devient constant mais diffère de celui obtenu dans la phase initiale. Ce rapport est indépendant de la température et de la composition de la solution.

B. Les talcs

Les talcs sont des phyllosilicates $[\text{Mg}_3 \text{Si}_4 \text{O}_{10} (\text{OH})_2]$ basés sur une structure à trois couches (2:1). Les couches octaédriques sont de type brucitique $[\text{Mg}(\text{OH})_6]$. L'épaisseur des feuillets est fixe (0,926) et ne permet pas l'entrée des ions sous forme hydratée.

Sorption des métaux

Les substitutions au sein du réseau cristallin des talcs sont peu nombreuses. Aussi, la CEC de ces minéraux est relativement faible par rapport à celles des smectites. Au niveau des sites octaédriques, le Mg^{2+} peut être substitué par des cations métalliques tels que le Fe^{2+} (Olson *et al.*, 2000) ou le Ni^{2+} (Da Fonseca *et al.*, 2000). L'adsorption non spécifique du Ni sous forme hydratée en surface des particules est faible. Le Ni adsorbé est plutôt sous forme de complexe de sphère interne. Des précipités d'hydroxyde de Ni $[\text{Ni}(\text{OH})_2]$ peuvent se former à la surface des particules de talc (Scheinost *et al.*, 1999). La cinétique de sorption du Ni sur le talc augmente avec l'élévation de la température (Scheckel et Sparks, 2001).

Dissolution

La dissolution des particules de talc est incongruente. Le Mg ainsi que les cations présents dans la couche brucitique sont solubilisés plus rapidement que le Si des couches octaédriques (Lin et Clemency, 1981).

C. Les chlorites

Les chlorites $(\text{Mg}, \text{Fe}, \text{Al})_3 \text{Mg}_3 [(\text{Si}, \text{Al})_4 \text{O}_{10} (\text{OH})_2] \text{OH}_6$ sont des phyllosilicates basés sur une structure à quatre couches (argiles 2:1:1 ou TOTO) (Bailey, 1988 ; Olson *et al.*, 2000). Leur structure de base est proche de celle des talcs. Toutefois, les chlorites sont caractérisées par la présence d'une couche octaédrique brucitique $[\text{Mg}(\text{OH})_6]$ supplémentaire, située entre les feuillets de type 2:1. L'épaisseur des feuillets est de l'ordre de 14 Å.

Sorption des métaux

La présence de la couche brucitique (chargée positivement), compense le déficit de charges positives induites par les substitutions isomorphiques. Aussi, la CEC des chlorites ($10\text{-}40 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$) est faible en comparaison à celle des argiles 2:1. De plus, les chlorites sont caractérisées par une surface spécifique relativement faible ($100\text{-}175 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) car les molécules d'eau et les cations n'ont pas accès à l'espace interfoliaire. Le groupe des chlorites rassemble plusieurs minéraux qui diffèrent en fonction de la nature du cation majoritairement présent au sein des couches octaédriques. Dans les milieux fortement concentrés en Ni, la substitution du

Mg et du Fe par le Ni peut conduire à la formation de chlorites nickélifères (nimites) (Bailey, 1988).

Dissolution

La dissolution des couches brucitiques dans la structure des chlorites conduit à la mise en solution du Mg, du Fe, et des autres cations présents dans les octaèdres. Cette réaction d'altération conduirait à la transformation progressive des chlorites vers des vermiculites (Lee *et al.*, 2003). De plus, la solubilisation de fortes quantités de Mg pourrait se traduire par une hausse du pH dans le milieu (Wenzel *et al.*, 2003). L'adsorption du Ni sur les vermiculites néoformées dépend du pH et de la force ionique de la solution au contact (Malandrino *et al.*, 2006). L'adsorption du Ni²⁺ est d'autant plus élevée que le pH est élevé et que la force ionique de la solution est faible. La présence de molécules organiques complexant le Ni (*e.g.* DTPA, EDTA, acide citrique, acide oxalique) limite l'adsorption du Ni sur la vermiculite, ce d'autant plus que le complexe ligand-métal est stable. La vermiculite peut ensuite évoluer en smectite trioctaédrique à forte CEC. Cette transformation serait due à l'oxydation du Fe(II) dans les couches octaédriques des vermiculites, qui conduirait à une perte de charge et à l'affaissement des espaces interfoliaires des vermiculites (Lee *et al.*, 2003).

D. Les serpentines

a. Généralités

Les serpentines [Mg₃ Si₂ O₅ (OH)₄] sont des phyllosilicates trioctaédriques, basés sur une structure à deux couches (argile 1:1 ou TO) : des couches tétraédriques siliceuses (tridymites) alternent avec des couches octaédriques magnésiennes (brucites). Les feuillets sont maintenus entre eux par des liaisons hydrogènes entre les groupements hydroxyles des couches octaédriques et les atomes d'oxygène des couches tétraédriques. L'épaisseur des feuillets est de l'ordre de 7 Å. Cet agencement des feuillets ne permet pas l'accès de l'espace interfoliaire aux molécules d'eau et aux cations (Zbytniewski *et al.*, 2003). De plus, les substitutions au sein du réseau cristallin sont très limitées. Ainsi, les serpentines ont une CEC relativement faible par rapport aux argiles 2:1.

Le groupe des serpentines rassemble plusieurs minéraux de même structure cristalline de base. Ceux-ci se distinguent par la morphologie et l'agencement des particules minérales : les minéraux les plus communs sont la lizardite (forme plane), l'antigorite (forme massive, asciculaire ou pseudofibreuse) et le chrysotile (forme fibreuse) (Wicks et O'Hanley, 1988).

b. Exemple du chrysotile

Le chrysotile est le minéral le plus facilement reconnaissable grâce à sa forme fibreuse typique (Wicks and O'Hanley, 1988). Les feuillets sont enroulés en fibrilles élémentaires creuses d'un diamètre externe proche de 250 Å et d'un diamètre interne voisin de 100 Å (Figure 2). Ces fibrilles sont elles-mêmes associées en fagots pour constituer des fibres (Touray, 1980 ; Murr et Soto, 2004). La surface spécifique du chrysotile est relativement faible en comparaison à celle des argiles de type 2:1 (48,5 m² g⁻¹, méthode BET ; Bales et Morgan, 1985 a).

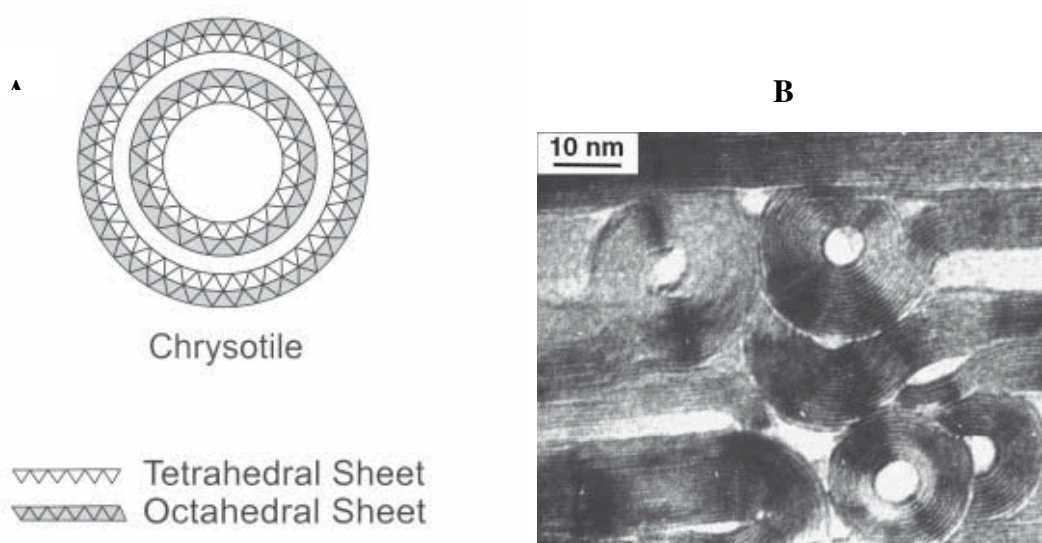


Figure 2. Structure élémentaire du chrysotile, A, Schématisation de la structure du chrysotile ; B, cliché effectué en microscopie électronique à transmission (Clinkenbeard *et al.*, 2002).

Sorption des métaux

D'une manière générale, les substitutions au sein du réseau cristallin des serpentines sont très limitées. De ce fait, le déficit de charges positives induit par les substitutions isomorphiques est faible voire nul. Dans le chrysotile, la substitution de Si⁴⁺ par Al³⁺ ou Fe³⁺ au niveau des couches tétraédriques, est largement minoritaire et peu fréquente. Dans les couches octaédriques, Mg²⁺ peut être remplacé par des cations de même valence tels que Fe²⁺ et Ni²⁺. Toutefois, la substitution de Mg²⁺ par Fe²⁺ est limitée car elle entraîne une déformation de la structure du minéral (Wittaker et Wicks, 1970). Ainsi, les fibres de chrysotile ne contiennent généralement pas plus de 2 % de fer (en masse), ce dernier étant plutôt incorporé dans des minéraux fréquemment associés au chrysotile tels que la magnétite ou l'hématite (Wicks et O'Hanley, 1988 ; Deer *et al.*, 1992). En revanche, l'existence de serpentines nickélifères (garniérites) en milieu naturel, montre que la substitution de Mg²⁺ par Ni²⁺ est possible et illimitée (Manceau et Calas, 1985 ; Wicks et O'Hanley, 1988 ; Deer *et al.*,

1992). , la plupart des serpentines contient peu de Ni (environ 0,25 % en masse).

A la surface des fibres de chrysotile, la présence de groupements fonctionnels de type Mg-OH ou Si-OH permet l'adsorption spécifique de cations ou d'anions (Bales et Morgan, 1985 a). Les fibres de chrysotile non altérées sont caractérisées par la présence d'une couche superficielle d'hydroxyde de magnésium. Lorsque le minéral est mis en suspension dans l'eau (pH < 8,9, point de charge nulle), celui-ci est alors chargé positivement (Bales et Morgan, 1985 b). Dans ce cas, la majorité des groupements fonctionnels de surface serait de type Mg-OH²⁺. La présence des ions NO₃⁻, Cl⁻, HCO₃⁻ et SO₄²⁻ n'influence pas la charge électrique du chrysotile, suggérant que l'adsorption de ces ions est faible. Dans les eaux naturelles, les fibres de chrysotile peuvent rapidement acquérir une charge négative du fait de l'adsorption de matière organique dissoute (MOD) (Bales et Morgan, 1985 b). Ainsi, le chrysotile posséderait un pouvoir adsorbant pour des molécules biologiques variées, comme des phospholipides ou des protéines (Touray, 1980). En absence de MOD, et après environ deux semaines en suspension dans l'eau, la dissolution plus rapide de la couche magnésienne (chargée positivement), par rapport à la couche siliceuse (chargée négativement), peut conduire au passage d'une surface initialement chargée positivement, à une surface chargée négativement (Bales et Morgan, 1985 b). Après quatre semaines en suspension, le système s'équilibre et les charges de surface se stabilisent. Néanmoins, la charge de surface du chrysotile dépend fortement du pH du milieu.

Dissolution

La dissolution des serpentines est caractérisée dans un premier temps par la libération plus rapide de Mg et des autres cations contenus dans les feuilletts octaédriques, par rapport au Si des feuilletts tétraédriques (Lin et Clemency, 1981 ; Voskresenskaya et Coliazo, 1983). La dissolution est alors non stoechiométrique. Par la suite, lorsque le système tend vers l'équilibre, la dissolution du minéral devient stoechiométrique. La concentration en solution du Mg et du Si libérés lors de la dissolution des serpentines peut entraîner la néoformation de smectites dioctaédriques de faibles charges négatives et à forte teneur en Mg (Lee *et al.*, 2003). La solubilité des serpentines est indépendante de la composition chimique du minéral (Voskresenskaya et Coliazo, 1983).

Dans l'eau pure, la libération du Mg induite par l'altération du chrysotile est très faible et s'arrête à température ambiante dès que le produit (Mg²⁺)(OH)² atteint 10⁻¹⁰ (valeur proche du produit de solubilité de l'hydroxyde de Mg) (Touray, 1980). En milieu fortement basique, le chrysotile est chimiquement inerte. En milieux acides et/ou complexants, le Mg est lessivé ;

il ne reste alors qu'une carcasse résiduelle de silice hydratée (Touray, 1980 ; Hume et Rimstidt, 1992). La destruction de la couche brucitique en présence d'acide oxalique conduit à une importante augmentation de la surface spécifique du minéral (Johan *et al.*, 1973). Les échanges entre H^+ et Mg^{2+} peuvent être poursuivis jusqu'à l'extraction quasi-complète du Mg sans que les fibres ne subissent d'autres variations que des aplatissements localisés. Toutefois, dans des conditions peu agressives, le développement d'une couche superficielle de silice hydratée peut très fortement ralentir le lessivage du magnésium.

1.4.2. Les oxyhydroxydes

Les oxyhydroxydes jouent un rôle important quant à la rétention du Ni dans les sols ultramafiques. Par exemple, une étude réalisée sur un sol saprolithique métallifère ouest africain a montré qu'environ 75 % du Ni total étaient associés à des goethites; et que 25 % du Ni étaient associés à des asbolanes (phyllomanganates) (Manceau *et al.*, 2000).

La présence de groupements fonctionnels hydroxyles à la surface des particules, confèrent aux oxyhydroxydes une charge globale positive ou négative en fonction du pH. Le point de charge nulle des oxyhydroxydes varie généralement entre 7 et 9 selon le type d'oxyde.

A. La goethite

a. Structure

Compte tenu de sa stabilité thermodynamique, la goethite est de loin l'oxyhydroxyde de Fe(III) (OHF) le plus commun dans les sols. Elle est constituée d'unités octaédriques $FeO_3(OH)_3$ arrangées en doubles chaînes (Kämpf *et al.*, 2000).

La goethite est majoritairement présente sous forme de petits cristaux aciculaires (*i.e.* en forme d'aiguille), dont la longueur varie de quelques dizaines de nm à plusieurs μm . Dans les sols, la goethite est souvent finement divisée. La surface spécifique des goethites peut varier entre 8 et $200\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$ (Bonneville, 2005).

b. Sorption des métaux

La surface de la goethite peut être chargée positivement ou négativement en fonction du pH du milieu. La valeur de pH pour laquelle le point de charge nulle est atteint est égale à 8,3 en moyenne pour la goethite (Komulski *et al.*, 2003). En dessous de cette valeur, le minéral est chargé positivement.

Les cations métalliques qui ont un rayon ionique comparable à celui de Fe^{3+} (*e.g.* Al, Ni, Cr, Zn) peuvent se substituer au Fe dans la structure de la goethite (Kämpf *et al.*, 2000).

Ainsi, des cations tels que Ni^{2+} , Cr^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} peuvent être incorporés dans la structure des goethites de synthèse en remplacement du fer (II ou III) (Schwertmann, 1984 ; Schwertmann *et al.*, 1989 ; Ebinger et Schulze, 1989 ; Schwertmann et Carlson, 1994 ; Carvalho-E-Silva *et al.*, 2003). La substitution du Fe par le Ni entraîne une distorsion dans la structure du minéral (Carvalho-E-Silva *et al.*, 2003 ; Manceau *et al.*, 2000) qui limiterait l'incorporation du Ni dans la structure des goethites naturelles et synthétiques.

Des travaux effectués sur une goethite de synthèse au contact d'un milieu aqueux en présence de Ni ont montré que la sorption du Ni sur le minéral dépend fortement du pH de la solution au contact (Figure 3 ; Marcussen *et al.*, 2003). En dessous de pH 5, le Ni n'est pas sorbé sur la goethite. La sorption devient maximale aux environs de pH 7. La présence de citrate n'influence pas la sorption du Ni sur la goethite (Figure 3 ; Marcussen *et al.*, 2003).

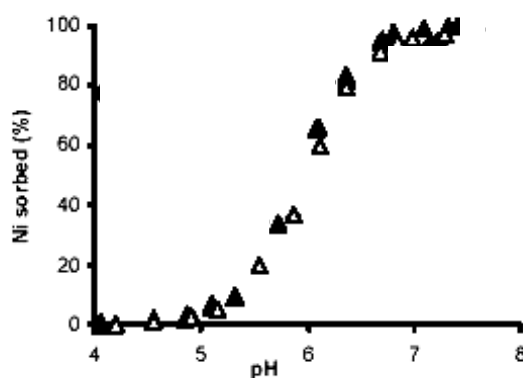


Figure 3. Sorption du Ni sur une goethite de synthèse en fonction du pH, en présence (▲), et en absence de citrate (Δ) (Marcussen *et al.*, 2003).

c. Dissolution

Les substitutions isomorphiques au sein du réseau cristallin de la goethite peuvent influencer le taux de dissolution du minéral (Schwertmann, 1991). Par exemple, lorsque les substitutions entre Fe et Al augmentent, alors le taux de dissolution de la goethite tend à diminuer.

La présence de ligands organiques dans le milieu peut également influencer le taux de dissolution de la goethite. Par exemple, la présence de sidérophores (molécule organique complexant le Fe) dans le milieu favorise la dissolution de la goethite. Ainsi, plus la concentration du ligand en solution est élevée, plus le taux de dissolution du minéral est important (Cheah *et al.*, 2003 ; Reichard *et al.*, 2005). En revanche, la présence d'oxalate seul, aux concentrations habituellement rencontrées dans les sols, n'influence pas la dissolution du minéral. Néanmoins, lorsque les deux ligands (oxalate + sidérophores) sont présents dans le milieu, le taux de dissolution peut être doublé par rapport à celui obtenu en présence de

sidérophores seuls. Dans ce cas, l'oxalate serait adsorbé en surface de la goethite ; il favoriserait alors la dissolution du minéral par des réactions de réduction (Schwertmann, 1991 ; Reichard *et al.*, 2005).

B. Les phylломanganates

Les phylломanganates sont des oxyhydroxydes de manganèse (OHM) composés d'unités octaédriques $Mn(O,OH)_6$, formant une structure en feuillets. Ce sont des composés généralement minoritaires dans les sols.

Le Ni est présent au niveau des sites octaédriques des phylломanganates où il peut par exemple se substituer au lithium dans la lithiophorite (OHM présent dans les sols ultramafiques). Dans les asbolanes de Co et de Ni, le Ni peut former des couches $Ni(OH)_2$ en alternance régulière avec des couches MnO_2 , et éventuellement des couches $CoOOH$ ou $Co(OH)_3$ (Manceau *et al.*, 1987 ; Manceau *et al.*, 1992 ; Manceau *et al.*, 2000).

1.4.3. Les phases organiques

L'effet de la matière organique (MO) sur la mobilité des métaux est difficile à prévoir. Il dépend, d'une part, des conditions physico-chimiques du milieu et de l'élément complexé et, d'autre part, de la nature et de la quantité de MO présente dans le milieu (Kataba-Pendias et Pendias, 2001).

Les substances humiques (SH) possèdent un grand nombre de groupements fonctionnels hydrophiles ($COOH$, OH , $C=O$, NH_2) qui confèrent à l'ensemble de la molécule organique une charge négative (charges variables), dont l'intensité est fortement dépendante du pH du milieu. Ces groupements permettent aux SH de former différents types d'association avec les métaux (Baldock et Nelson, 2000 ; Kataba-Pendias et Pendias, 2001). Ces associations peuvent conduire à la formation de complexes monodentés, de complexes de sphère externe ou de complexes de sphère interne. La sélectivité et la force de liaison des métaux par les SH dépendent en partie de la quantité de métal disponible pour la liaison et de la quantité de métal complexé. Les substances humiques sont généralement divisées en trois groupes, définis principalement en fonction de leur solubilité : les acides fulviques (solubles quel que soit le pH), les acides humiques (insolubles à $pH < 2$), et les humines (insolubles quel que soit le pH) (Kataba-Pendias et Pendias, 2001 ; Zbytniewski *et al.*, 2003).

La CEC des substances humiques solubles est très élevée par rapport à celle des autres constituants du sol. Elle peut varier de 485 à 870 $cmol^+ kg^{-1}$ pour les acides fulviques, et de 900 à 1400 $cmol^+ kg^{-1}$ pour les acides humiques (Zbytniewski *et al.*, 2003). La sorption du

métal sur les acides fulviques (AF) conduit à la formation de complexes organo-métalliques solubles qui augmente la mobilité des métaux. Ce complexe peut devenir insoluble lorsque le rapport AF/métal est < 2 (Sposito, 1982 ; Kataba-Pendias et Pendias, 2001). Bien que les acides humiques (AH) soient solubles au pH des sols, leur présence dans le milieu peut réduire la mobilité du Ni par la formation de complexes AH-métal (Kataba-Pendias et Pendias, 2001 ; Mellis *et al.*, 2004). La sorption du métal sur les humines insolubles conduit également à une immobilisation du Ni.

D'une manière générale, le Ni a une forte affinité avec la MO du sol (Juste *et al.*, 1995; Yin *et al.*, 2002). Dans leurs travaux, Misra et Pande (1974) ont montré que l'apport de MO dans le sol conduit à la solubilisation du Ni au cours des premiers jours de sa décomposition, du fait de la production d'acides organiques complexant le Ni.

1.5. Mobilité et disponibilité du Ni dans les sols

1.5.1. Définition

La **mobilité** d'un élément peut être définie comme son aptitude à être transféré des différentes phases solides du sol vers la solution (Juste *et al.*, 1995). Une fois solubilisé, l'élément peut soit être prélevé par les organismes vivants, soit migrer vers une nappe d'eau ou un autre compartiment du sol (*e.g.* horizons sous-jacents).

La **disponibilité** d'un élément dans les sols représente le potentiel du sol à mettre à la disposition des organismes des formes chimiques de l'élément biologiquement assimilables. Aussi, la **biodisponibilité** des métaux peut être caractérisée par rapport aux risques de leur transfert dans les compartiments des chaînes alimentaires.

La **phytodisponibilité** d'un élément (ou quantité d'élément disponible pour les plantes) peut être définie comme le passage de l'élément du sol à l'intérieur du végétal (Juste *et al.*, 1995 ; Morel, 1997). Elle peut donc être mesurée par le dosage de la quantité de Ni accumulée dans les tissus des plantes au cours de leur développement -estimation biologique-. Aussi, la phytodisponibilité d'un élément est donc variable en fonction des espèces végétales considérées. Pour la plupart des espèces, le Ni instantanément phytodisponible correspond approximativement à la fraction de Ni soluble du sol. Pour les espèces hyperaccumulatrices de Ni, la fraction de Ni phytodisponible est souvent supérieure à la fraction de Ni soluble. Aussi, la quantité de Ni disponible pour les plantes hyperaccumulatrices peut être estimée par le biais d'une extraction chimique du Ni du sol par une molécule organique complexant le Ni

(DTPA-TEA) -estimation chimique-. Dans notre étude, le terme « **phytodisponible** » est utilisé pour définir la fraction du Ni du sol disponible pour les plante, estimée par extraction au DTPA-TEA.

Aussi, la **phytodisponibilité** fait référence, d'une part, à la fraction de Ni immédiatement mis à la disposition de la plante et, d'autre part, à la fraction de Ni susceptible de devenir disponible au cours de la culture, par le biais, par exemple de l'altération de phases porteuses de Ni (*e.g.* échanges d'ions, dissolution).

1.5.2. Facteurs contrôlant la mobilité et la disponibilité du Ni dans les sols

A. Les constituants du sol

Les constituants du sol porteurs de Ni représentent un réservoir potentiel de Ni plus ou moins mobilisable. Les différentes formes minérales et organiques de la phase solide sur lesquelles se fixe le métal peuvent, sous l'effet de certaines réactions d'altération, pourvoir la solution du sol en formes de métal assimilables pour les plantes.

Dans nos travaux, nous parlerons d'**altération** pour désigner toutes modifications chimiques des constituant minéraux porteurs de Ni. L'altération peut ainsi conduire (i) soit à la **mobilisation** du Ni (solubilisation) par désorption du Ni ou dissolution des minéraux porteurs ; soit à une **immobilisation** du Ni par adsorption, précipitation ou co-précipitation du Ni.

La surface spécifique des particules du sol et la CEC entre les particules du sol et la solution, sont deux paramètres importants qui influencent la réactivité des constituants du sol et de ce fait leur altération (Kataba-Pendias, 2004). Généralement, plus la surface spécifique d'un minéral est importante, plus le taux de dissolution de ce minéral est élevé (Voskresenskaya et Coliazo, 1983).

Aussi, la mobilité et la disponibilité du Ni dans les sols sont fortement contrôlées : (i). par la nature des phases minérales porteuses de Ni *e.g.* silicates, oxydes (Massoura *et al.*, 2006) ; et (ii) par la spéciation du Ni au sein de la structure du minéral *e.g.* formes adsorbées ou substituées (Massoura, 2004).

B. Les conditions physico-chimiques du milieu

Le pH du sol est le facteur environnemental le plus important quant au devenir et à la disponibilité des éléments en traces (Leeper, 1978). Il influence non seulement la chimie des éléments métalliques en solution, mais également les interactions avec la phase solide du sol (Mouta *et al.*, 2005). Un pH acide favorise le passage du Ni de la phase solide du sol vers la solution (Anderson et Christensen, 1988 ; Qureshi *et al.*, 2004 ; Mellis *et al.*, 2004).

Le potentiel d'oxydo-réduction (Eh) peut également jouer un rôle important quant à la mise en solution du Ni, notamment dans les sols ultramafiques. Les faibles valeurs de Eh favorisent la solubilisation des hydroxydes de Fe et de Mn (minéraux porteurs de Ni), et contribuent donc à augmenter la concentration en solution du Ni qui était adsorbé ou co-précipité sur ces composants (Korcak et Fanning, 1981 ; Amrhein *et al.*, 1994).

Enfin, la température, l'humidité et la structure (aération) du sol, peuvent également influencer la mobilité du Ni dans le sens où ces paramètres jouent un rôle clé dans la pédogenèse. Ceux-ci vont influencer l'altération des phases minérales, l'humification de la matière organique, ainsi que la nutrition et la distribution des végétaux au niveau des sols.

2. Le Ni dans les plantes hyperaccumulatrices

2.1. Généralités

Certaines espèces de plantes sont capables d'accumuler de fortes quantités de métal dans leurs parties aériennes, souvent supérieures à celles contenues dans le sol, et généralement 100 fois supérieures aux concentrations habituellement mesurées chez les espèces non accumulatrices (Brooks, 1998 a). Le terme d'« **hyperaccumulateur** » a été introduit à la fin des années 1970 pour décrire les plantes qui contiennent des concentrations en Ni supérieures à 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ de matière sèche (MS) (Jaffré *et al.*, 1976 ; Brooks *et al.*, 1977). Cependant, la présence de plantes contenant des quantités élevées de métaux dans leurs tissus avait déjà été constatée dès la fin du 19^{ème} siècle. En 1885, Bauman découvre en Allemagne les espèces *Viola calaminaria* et *Thlaspi calaminaria* qui contiennent dans leurs tissus plus de 1 % MS de zinc. Et c'est en 1948, dans le nord de l'Italie, que Vergano et Minguzzi découvre que l'espèce *Alyssum bertolonii*, décrite par Desvaux en 1814, est capable d'accumuler dans ses tissus de fortes quantités de Ni. En effet, ils ont constaté que cette plante contenait dans ses feuilles 0,79 % MS de Ni alors que le sol sur lequel elle se développait n'en contenait que

0,42 % (Brooks, 1998 a). A ce jour, plus de 320 espèces hyperaccumulatrices de Ni ont été recensées (Reeves, 2003). Les deux tiers de ces espèces se développent sous climat tropical et sont représentés notamment par la famille *Euphorbiaceae* (Brooks, 1998 b ; Reeves, 2003). En Europe, les genres les plus représentés sont *Alyssum* et *Thlaspi*, tous deux appartenant à la famille *Brassicaceae* (Baker et Brooks, 1989 ; Brooks, 1998 b).

2.2. Prélèvement et accumulation du Ni par les plantes hyperaccumulatrices

L'étude de la distribution du Ni dans les différents organes des plantes hyperaccumulatrices montrent que le Ni est plus fortement concentré dans les parties aériennes, et notamment au niveau des feuilles. Le transfert du Ni vers les parties aériennes des hyperaccumulateurs comporte plusieurs étapes (Clemens *et al.*, 2002) :

- la solubilisation et le prélèvement du métal par les racines ;
- le transport du métal de la racine vers le xylème, suivi de son transfert vers les parties aériennes de la plante ;
- l'accumulation et la séquestration du métal dans les parties aériennes des plantes.

2.2.1. Mobilisation du Ni et absorption par les racines

La plante peut induire des changements chimiques au sein de la rhizosphère (*i.e.* volume de sol influencé par l'activité des racines). Ces variations peuvent conduire à une augmentation (Mench *et al.*, 1988 ; Marschner, 1986 ; Lombi *et al.*, 2001 ; Hinsinger, 1998 et 2001 ; Dakora et Philips, 2002) ou à une diminution (Morel *et al.*, 1986) de la disponibilité des métaux. Les principaux facteurs influençant la mise en solution du Ni au sein de la rhizosphère des plantes hyperaccumulatrices sont présentés ci-après.

A. Variation du pH

Peu de travaux ont mis en évidence des variations de pH dans la rhizosphère des hyperaccumulateurs. Toutefois, une culture de l'espèce hyperaccumulatrice de Zn et de Cd *Thlaspi caerulescens* (sur un sol industriel de fonderie de Zn) a permis de mettre en évidence, à l'aide d'un indicateur coloré, des variations de pH le long des axes racinaires (Schwartz, 1997 ; Schwartz *et al.*, 1999). Une acidification de la rhizosphère a été observée au contact des jeunes racines et à proximité des apex racinaires, *i.e.* au niveau des zones de forte absorption d'eau (Hopkins, 2003). En revanche, une augmentation du pH a été observée autour des racines les plus âgées ou inactives. Dans ces mêmes travaux, Schwartz observe que les variations de pH dans la rhizosphère de *Th. caerulescens* sont également fonction de la

nature, de l'intensité et de la localisation des zones fortement polluées en métal. Ainsi, plus la teneur en zinc du sol est élevée, plus l'acidification du sol rhizosphérique est marquée. Cette diminution du pH dans la rhizosphère de l'hyperaccumulateur pourrait jouer un rôle important dans la mobilisation du Zn et dans son transfert vers la plante.

B. Exsudation de ligands organiques

Les exsudats libérés par les racines ont un rôle fondamental dans la nutrition des plantes. Ils peuvent jouer un rôle sur la régulation de l'activité microbienne ou bien agir directement sur les processus rhizosphériques qui conduisent à une augmentation du prélèvement et de l'assimilation des nutriments par les plantes (Dakora et Phillips, 2002).

La mobilisation du Ni dans la rhizosphère de l'hyperaccumulateur de Ni *Thlaspi goesingense* serait liée à l'excrétion de ligands organiques dans la rhizosphère (Wenzel *et al.*, 2003). Cela se traduit par une augmentation des concentrations du Ni et du carbone organique dissous présents en solution dans la rhizosphère de l'hyperaccumulateur, par rapport aux concentrations mesurées hors rhizosphère de l'hyperaccumulateur et à celles mesurées dans la rhizosphère de plantes témoins non accumulatrices. La formation de complexes *Ni-molécules organiques* serait ainsi impliquée dans la mobilisation du Ni et induirait la dissolution de minéraux porteurs de Ni, tels que des orthosilicates du type forstérite (Mg_2SiO_4).

D'autres travaux, menés en milieu de culture hydroponique, n'ont pas permis de mettre en évidence l'exsudation de molécules organiques complexant le Ni chez l'espèce *Th. goesingense* (Salt *et al.*, 2000). L'exsudation d'histidine (acide aminé) et/ou de citrate par les racines, ne semble pas impliquée dans l'accumulation du Ni dans les feuilles de *Th. goesingense*. En revanche, cette étude a montré que l'exsudation de telles substances serait impliquée dans la réduction du prélèvement et de la toxicité du Ni pour l'espèce non accumulatrice *Thlaspi arvense*.

C. Variation des concentrations des espèces ioniques par accumulation ou déplétion

Le prélèvement intense de Ni dans la rhizosphère des hyperaccumulateurs peut provoquer une diminution significative de la fraction de Ni échangeable (Shallari, 1997; Massoura *et al.*, 2004 ; Chardot *et al.*, 2005). Afin de réapprovisionner la solution du sol en métal, les réactions d'équilibre d'absorption/désorption (échanges cationiques) des ions métalliques sur la phase solide seraient alors déplacées de sorte à augmenter la désorption du métal (Hinsinger, 2001).

D. Stimulation de l'activité des microorganismes

L'exsudation de certaines molécules organiques (tels que des sucres, des acides aminés ou encore des acides organiques) dans la rhizosphère stimule l'activité de certaines populations de microorganismes (Hiltner, 1904 ; Marschner, 1986 ; Brimecombe *et al.*, 2001 ; Abou-Shanab *et al.*, 2003 a). Par exemple, la présence de *Th. caerulescens* favorise le développement de bactéries résistantes au Ni au sein de sa rhizosphère (Aboudrar *et al.*, 2007). Les interactions entre les racines et ces microorganismes jouent un rôle décisif en ce qui concerne la disponibilité des éléments en traces dans la rhizosphère. Les microorganismes sont capables d'accélérer l'altération de certains minéraux silicatés en acidifiant le milieu et/ou en améliorant l'exploitation du sol rhizosphérique (Leyval et Berthelin, 1991 ; Calvaruso *et al.*, 2006). L'inoculation de bactéries présentes dans la rhizosphère de l'hyperaccumulateur de Ni *Alyssum murale* (e.g. *Microbacterium arabinogalactanolyticum*, *Microbacterium oxydans*) peut augmenter considérablement le prélèvement de Ni par la plante (Abou-Shanab *et al.*, 2003 b ; Abou-Shanab *et al.*, 2006). Ainsi, la présence de certaines populations de rhizobactéries favoriserait la disponibilité du Ni dans le sol et donc son prélèvement par les espèces hyperaccumulatrices.

2.2.2. Transfert et spéciation du Ni des racines vers les feuilles

A. Le Ni dans les racines

Après solubilisation du Ni au sein de la rhizosphère, celui-ci est dirigé vers la paroi externe pecto-cellulosique des racines par flux convectifs et diffusifs (Morel, 1985 ; Hopkins, 2003). La formation de complexes organo-métalliques peut faciliter le transport du Ni vers la racine. Cependant, au point d'absorption, le Ni serait vraisemblablement dissocié du ligand (Uren, 1992). Ainsi, la forme principale de Ni que la racine serait capable d'absorber serait l'ion Ni^{2+} sous forme hydratée (Mishra et Kar, 1974; L'huillier, 1994). Ce dernier diffuserait alors de manière passive au travers de la membrane cellulaire externe pour se retrouver dans l'apoplasme. Puis, les ions métalliques se déplaceraient transversalement vers le centre de la racine afin de rejoindre les vaisseaux conducteurs du xylème par lesquels ils seront transférés vers les parties aériennes. Aussi, le métal doit passer au travers de la membrane plasmique afin de rejoindre le symplasme, car des barrières physiques (cadres de Caspary) empêchent la diffusion des ions par l'apoplasme au-delà de l'endoderme (Hopkins, 2003). Environ 95 % du Ni dosé dans les racines de l'hyperaccumulateur *Alyssum bertolonii* seraient situés au niveau du symplasme (Boominathan et Doran, 2003). Pour franchir la membrane plasmique, les ions

doivent emprunter des transporteurs ou des canaux. L'inhibition des pompes à proton H⁺-ATPase de la membrane plasmique des cellules racinaires, impliquées dans de nombreux processus de transport, provoque chez *Al. bertolonii* une réduction de la croissance et de la viabilité des racines. Cette inhibition empêche le transfert du Ni au travers du plasmalemma, provoquant une accumulation du Ni dans l'apoplasme (Boominathan et Doran, 2003). Cela entraîne alors une perturbation de la translocation du Ni vers les parties aériennes et donc de la stratégie de survie de la plante. L'existence de transporteurs spécifiques de Zn et de Cd favorisant les transferts de ces éléments dans les cellules racinaires a été mise en évidence chez certaines populations de l'espèce hyperaccumulatrice *Th. caerulescens* (Lasat, *et al.*, 1996 et 2000 ; Lombi *et al.*, 2001 ; Bernard *et al.*, 2004). Ces transporteurs joueraient un rôle important dans le mécanisme d'hyperaccumulation. Néanmoins, l'existence de transporteurs spécifiques impliqués dans les transferts de Ni au sein de la racine n'a pas été démontrée.

Peu d'études ont été menées sur la localisation et la spéciation du Ni dans les racines des hyperaccumulateurs, la majorité des travaux étant portée sur les parties aériennes des plantes. D'une manière générale, les plantes prélèveraient les éléments en trace présents dans le sol, sous forme de cations libres et/ou sous forme complexée (Kataba-Pendias, 2004 ; Kerkeb et Krämer, 2003). Chez l'espèce *Al. bertolonii*, le Ni serait distribué le long des racines y compris au niveau de la coiffe avec une légère diminution de la concentration de l'élément dans la zone du méristème apical *i.e.* juste avant l'apex (Figure 4). Le métal serait principalement complexé par des acides organiques du type acide malique, acide citrique et acide malonique. Seule une faible fraction du Ni contenu dans les racines serait sous la forme de cation libre hydraté. Cependant, ces acides étant initialement en importantes quantités dans les racines des plantes, la présence de Ni dans le milieu de culture ne semble pas influencer l'accumulation de ces acides au niveau des racines par rapport à un milieu dépourvu en Ni (Boominathan et Doran, 2003). Chez l'espèce *Alyssum lesbiacum*, le transport du métal dans le symplasme des racines serait facilité par la complexation du Ni avec de l'histidine (Kerkeb et Krämer, 2003).

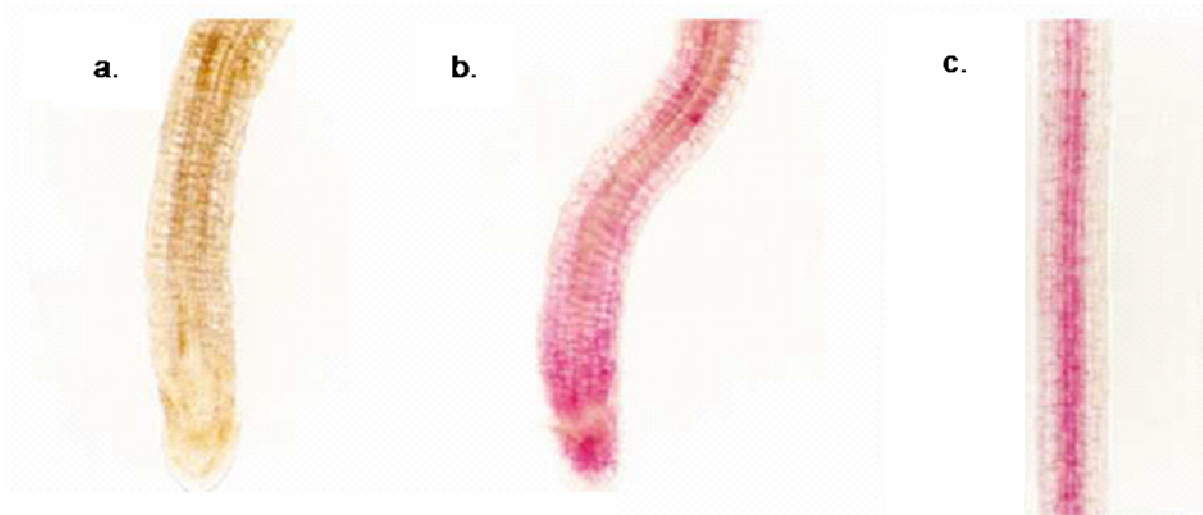


Figure 4. Localisation du Ni dans les racines de l'hyperaccumulateur *Alyssum bertolonii*. a, racine d'*Al. bertolonii* après 21 jours de culture en absence de Ni ; b, c racine d'*Al. bertolonii* après 21 jours de culture en présence de Ni (25 ppm) (Boominathan et Doran, 2003).

B. Le Ni dans la tige

Lorsque les ions atteignent le symplasme des cellules racinaires, leur transfert vers la stèle est facilité par des connexions symplastiques appelées plasmodesmes. Les ions sont alors déchargés dans les vaisseaux du xylème par un transport actif qui permet le passage de l'élément du symplasme vers l'apoplasme (Hopkins, 2003). Les protéines impliquées dans ce transfert membranaire n'ont pas été identifiées à ce jour.

L'histidine (*His*) serait largement impliquée dans l'hyperaccumulation du Ni et du Zn, notamment en favorisant la translocation du métal des racines vers les parties aériennes des plantes (Krämer *et al.*, 1996 ; Kerkeb et Krämer, 2003 ; Salt *et al.*, 1999). Chez les espèces hyperaccumulatrices de Ni *Al. lesbiacum*, *Al. bertolonii* et *Al. murale*, les concentrations du Ni et de l'*His* dosées dans le xylème sont corrélées positivement (Figure 5 ; Krämer *et al.*, 1996).

Chez l'espèce *Al. lesbiacum*, la réduction du taux d'exportation d'*His* entre les cellules des racines et le xylème engendrerait une diminution de l'entrée du Ni dans le xylème (Kerkeb et Krämer, 2003). De plus, des études menées en spectroscopie d'absorption des rayons X (EXAFS) confirmerait que le Ni présent dans le xylème de cette même espèce serait majoritairement sous forme complexée avec de l'*His* (Krämer *et al.*, 1996). Ainsi, ces observations montrent que la complexation du Ni avec l'*His* pourrait favoriser, chez certaines espèces hyperaccumulatrices, notamment du genre *Alyssum*, les transferts de Ni vers les parties aériennes des plantes.

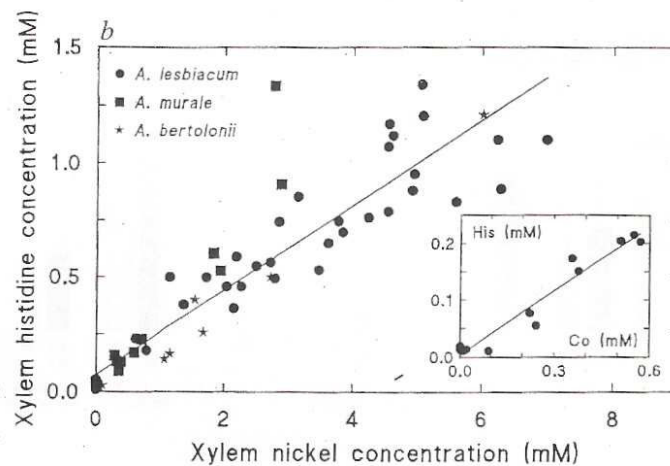


Figure 5. Relation entre la teneur en histidine et la teneur en Ni dans le xylème d'espèces hyperaccumulatrices du genre *Alyssum* (Krämer *et al.*, 1996).

Toutefois, différents travaux ont montré que l'*His* serait également impliquée dans les mécanismes de tolérance chez les espèces non accumulatrices (Krämer *et al.*, 1996 ; Persans *et al.*, 1999 ; Kerkeb et Krämer, 2003 ; Callahan *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'*His* ne semble pas toujours impliquée dans les mécanismes de l'hyperaccumulation. Par exemple, la présence d'*His* dans les tissus de l'hyperaccumulateur de Ni *Th. goesingense* n'interviendrait pas dans le processus d'hyperaccumulation du Ni (Persans *et al.*, 1999). En effet, la concentration en *His* dans le xylème de la plante ne varie pas quel que soit le degré d'exposition de la plante vis-à-vis du métal. Chez l'espèce hyperaccumulatrice de Ni *Stackhousia tryonii* (*Herbaceae*), l'*His* n'est présente dans le xylème qu'en très faibles quantités (Bhatia *et al.*, 2005). L'acide aminé majoritairement présent dans les tissus de *St. tryonii* est la Glutamine. La présence de Ni à de fortes concentrations stimulerait la transformation de la glutamine en acides aminés, favorisant ainsi la production d'acide glutamique, d'acide aspartique et d'alanine.

L'étude d'une section transversale de tige de l'hyperaccumulateur de Ni *Senecio coronatus* (*Asteraceae*) a permis de mettre en évidence la présence de Ni en relativement fortes concentrations dans l'ensemble de l'organe (Mesjasz-Przybylowicz *et al.*, 1997). Le Ni est principalement localisé dans les tissus externes de la tige *i.e.* épiderme et cortex. De fortes concentrations de métal ont également été observées au niveau du phloème. En revanche, des concentrations plus faibles ont été mesurées autour des faisceaux conducteurs et dans la moëlle.

2.2.3. Stockage du Ni dans les feuilles

Les espèces hyperaccumulatrices ont la particularité d'accumuler d'importantes quantités de métal dans leurs parties aériennes, et notamment dans les parties foliaires. Le degré d'accumulation du Ni dans les feuilles serait lié à la taille et à l'âge de la plante, plus qu'à la concentration en Ni (total ou échangeable) du sol (Brooks, 1998 c). Afin d'éliminer les effets toxiques du métal, les plantes hyperaccumulatrices doivent être capables de stocker celui-ci sous forme de complexes non disponibles. Les compartiments les plus indiqués pour séquestrer le métal sont : la paroi cellulaire, le cytosol et la vacuole (Callahan *et al.*, 2006). Les travaux effectués sur la localisation du Ni dans les feuilles de différentes espèces hyperaccumulatrices montrent des résultats similaires quelle que soit l'espèce considérée. Le métal serait concentré majoritairement dans les vacuoles des cellules de l'épiderme inférieur et supérieur des feuilles de la plante (Brooks *et al.*, 1981 ; Krämer *et al.*, 2000 ; Küpper *et al.*, 2001 ; Broadhurst *et al.*, 2004 a et b ; Bidwell *et al.*, 2004 ; McNear *et al.*, 2005 a). Toutefois, chez l'espèce *Se. coronatus*, le Ni serait préférentiellement localisé au niveau des parois cellulaires des cellules de l'épiderme et non au niveau des vacuoles (Mesjasz-Przybylowics *et al.*, 1997). Chez l'espèce *Al. murale*, le Ni est fortement concentré au niveau des vacuoles des cellules épidermiques (Figure 6 ; Broadhurst *et al.*, 2004 a).

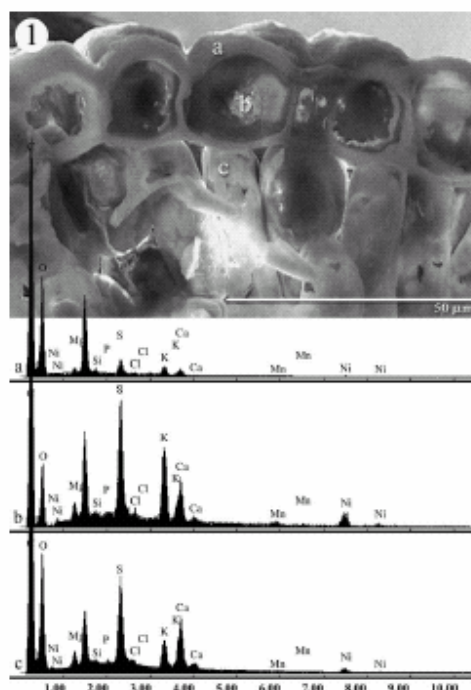


Figure 6. Photographie et spectres MEB-EDX de feuille d'*Alyssum murale*. Les lettres a, b, c montrent la localisation des spectres avec : a, Paroi cellulaire de l'épiderme ; b, Intérieur de cellule épidermique (vacuole); c, Cellule de la première couche du mésophyle palissadique (Broadhurst *et al.*, 2004 a).

Le métal peut également être accumulé de façon importante au niveau de la zone basale des trichomes foliaires de la plante (excroissances épidermiques similaires à des poils) (Figure 7 ; Broadhurst *et al.*, 2004 b). En revanche, la concentration du Ni est moins élevée au niveau des cellules du mésophyle ainsi que dans les cellules de garde sub-stomatales. Et, le métal est très faiblement présent, voire absent, des parois cellulaires des cellules foliaires de la plante. Chez l'espèce *Th. goesingense*, environ 75 % du Ni intracellulaire seraient localisés dans la vacuole (Krämer *et al.*, 2000).

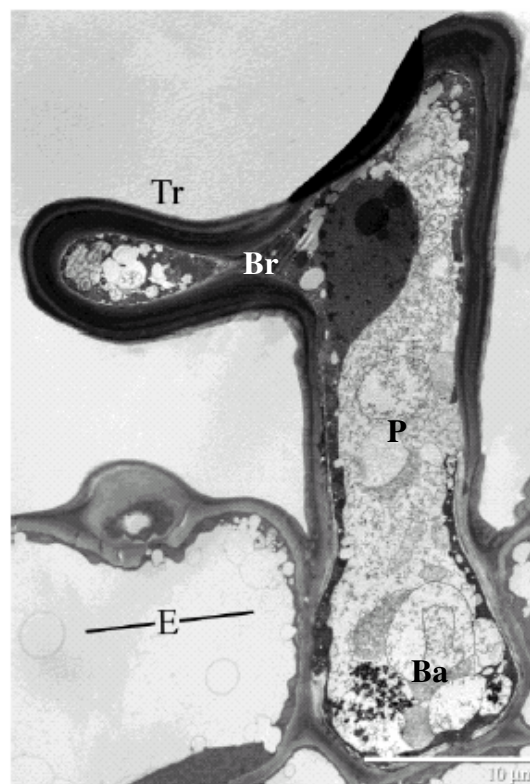


Figure 7. Cliché en MET d'une coupe transversale de feuille d'*Alyssum murale*. E : cellule de l'épiderme ; Tr : trichome constitué d'une seule cellule comprenant la base (Ba), le pédicule (P) et la branche (Br) (Broadhurst *et al.*, 2004 b).

La présence d'*His* dans les tissus de certains hyperaccumulateurs faciliterait le transport du Ni au travers du cytoplasme jusqu'à la vacuole. Au pH du cytoplasme (~7,5), le Ni formerait un complexe stable avec l'*His*. Chez l'espèce *Th. goesingense*, Le passage du Ni du cytoplasme vers la vacuole serait facilité par un transporteur d'ions métalliques (Persans *et al.*, 2001). Une fois dans la vacuole (pH 5,5), le complexe *Ni-His* deviendrait instable. La complexation intravacuolaire du Ni avec des acides organiques serait alors facilitée (Salt *et al.*, 2002). Les acides organiques mis en jeu dans le stockage du Ni chez les hyperaccumulateurs sont essentiellement de type citrate et/ou malate (Lee *et al.*, 1978 ; Brooks *et al.*, 1981 ; Krämer *et al.*, 2000 ; Schaumlöffel *et al.*, 2003). La présence de nicotianamine (dérivé d'acides aminés capable de chélater de nombreux métaux) pourrait également intervenir dans les transferts de Ni au sein des tissus de *Th. caerulescens* (Vacchina *et al.*, 2003 ; Ouerdane *et al.*, 2006).

2.2.4. Stockage du Ni dans les graines

Les teneurs du Ni dosées dans les graines des espèces hyperaccumulatrices de Ni sont généralement supérieures à 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ MS (Psaras et Manetas, 2001 ; Brooks, 1998 c ; Shallari, 1997). La teneur en Ni mesurée dans les graines de l'espèce non accumulatrice *Aurinia saxatilis* (ou *Alyssum saxatile*) est négligeable par rapport aux valeurs mesurées dans les graines des hyperaccumulateurs de Ni *Al. murale* et *Alyssum serpyllifolium* qui contiennent respectivement 9000 et 1390 $\mu\text{g Ni g}^{-1}$ MS (Ghaderian *et al.*, 2000).

Pour l'espèce hyperaccumulatrice *Se. coronatus*, le Ni est préférentiellement localisé dans la couche externe de la graine, notamment au niveau de la partie qui recouvre le radicule et dans le radicule lui-même (Przybylowicz *et al.*, 1995). Les résultats obtenus pour l'espèce *Thlaspi pindicum* (Psaras et Manetas, 2001) sont en concordances avec les résultats précédents : le Ni serait préférentiellement localisé au niveau de l'épiderme des cotylédons et au niveau du micropyle (zone de pénétration du radicule lors de la germination).

2.3. Avantages écologiques de l'hyperaccumulation

L'avantage évolutif du phénomène d'hyperaccumulation fait encore l'objet de spéculations. Six hypothèses ont jusqu'alors été suggérées afin d'expliquer l'importante accumulation des métaux chez les espèces hyperaccumulatrices. Suivant ces différentes hypothèses, l'hyperaccumulation des métaux au niveau des feuilles des plantes serait (Boyd et Martens, 1992 ; Boyd, 1998 ; Martens et Boyd, 2002) :

(1) un simple mécanisme de tolérance aux métaux. La séquestration des métaux dans des compartiments isolés permettrait à la plante de prélever d'importantes quantités de métal.

(2) un mécanisme d'élimination des métaux prélevés par la plante. La localisation stratégique du métal au niveau des tissus externes de la feuille, permettrait l'élimination des métaux soit par lessivage de ceux-ci sous l'action des pluies, soit par le biais des feuilles sénescences.

(3) un mécanisme de résistance aux milieux secs. Le Ni agirait alors sur les fonctions osmotiques des cellules ou sur la conservation de l'eau dans les cellules épidermiques ;

(4) un mécanisme d'enrichissement de la surface du sol en métaux afin de favoriser le développement des hyperaccumulateurs au détriment du développement des espèces végétales voisines non adaptées aux fortes concentrations en métal (phénomène d'allélopathie).

(5) un mécanisme physiologique fortuit mis en place par la plante pour répondre à un autre besoin adaptif.

(6) un mécanisme de défense qui permettrait à la plante de lutter contre les insectes ravageurs, les maladies fongiques ou encore les herbivores.

Face à la difficulté de mettre en place des expérimentations capables de tester ces différentes hypothèses, l'avancée des connaissances concernant l'avantage écologique de l'hyperaccumulation reste limitée. La culture d'espèces hyperaccumulatrices en condition de stress hydrique a permis de montrer que l'accumulation des métaux dans la plante, d'une part, ne permettait pas d'améliorer la croissance des espèces *Al. murale* et *Th. caerulea* et, d'autre part, n'avait pas d'effet significatif sur les fonctions osmotiques (Whiting *et al.*, 2003). L'hyperaccumulation du Ni et du Zn chez ces espèces n'augmenterait donc pas la résistance des plantes aux milieux secs.

Une expérimentation a également été menée afin de tester la validité de l'hypothèse selon laquelle l'hyperaccumulation serait un mécanisme de défense contre les ennemis des plantes (hypothèse 6) (Martens et Boyd, 2002). Les résultats montrent qu'au-delà de 10 jours de culture, les plantes hyperaccumulatrices de Ni ayant accumulé de fortes quantités de métal peuvent être, au même titre que les plantes témoins, affectées par l'attaque d'herbivores et notamment d'insectes. Plusieurs générations d'espèces adaptées d'insectes phytophages sont ainsi capables de mener leur cycle de vie en se nourrissant exclusivement de plantes hyperaccumulatrices (Mesjasz-Przybylowicz et Przybylowicz, 2001). Les herbivores peuvent donc entraîner de graves dommages sur les cultures des hyperaccumulateurs. De plus, l'accumulation du Ni dans les tissus des plantes pourrait même dans certains cas accroître la susceptibilité des espèces hyperaccumulatrices à certains virus (Davis *et al.*, 2001). La considération de tels résultats est importante dans le cadre d'une exploitation éventuelle des espèces hyperaccumulatrices (thème développé dans la partie suivante).

2.4. Exploitation des plantes hyperaccumulatrices de Ni

La distribution géographique des espèces hyperaccumulatrices est quasi-exclusivement limitée à des sites spécifiques, caractérisés par une teneur particulièrement élevée en métaux. Leur présence est donc une bonne indication de la minéralogie du sol sur lequel elles se développent. Par exemple, les hyperaccumulateurs de Ni sont des plantes généralement endémiques de sols issus de l'altération de roches mères ultramafiques à forte teneur en Ni (*e.g.* serpentinite, latérite nickélique). C'est pourquoi ces plantes ont longtemps été utilisées dans le but de découvrir de nouveaux sites d'exploitation minière (Brooks, 1983). Ce n'est qu'à la fin du 20^{ème} siècle, face à la multiplication des sites pollués en métaux (friches industrielles, anciennes exploitations minières), que les préoccupations environnementales ont conduit à s'interroger sur une éventuelle utilisation de ces plantes en tant qu'outils de décontamination des sols (Chaney, 1983 ; Baker et Brooks, 1989 ; Baker *et al.*, 1994 ; Salt *et al.*, 1995).

La phytoextraction est un procédé biologique qui consiste à cultiver des espèces hyperaccumulatrices de métaux sur des zones polluées par ces derniers, afin de les extraire du sol et ainsi de limiter le risque de leur dispersion dans l'environnement. La matière végétale serait ensuite récoltée puis incinérée, ou encore co-incinérée avec d'autres déchets (Keller *et al.*, 2005). Cette méthode est plus lente que les méthodes physico-chimiques généralement utilisées (*i.e.* confinement du sol, lavages acides, tri granulométrique, volatilisation,...), mais elle est également beaucoup plus respectueuse du sol et moins coûteuse.

Nicks et Chambers (1995) ont été les premiers à tester l'applicabilité de cette technique à des fins économiques (phytomining). Au lieu de confiner ou de traiter les résidus concentrés en métal, *i.e.* les cendres ou les minéralisats (hydrométallurgie), ceux-ci seraient directement réutilisés par les industries métallurgiques. L'objectif ne consisterait alors plus seulement à diminuer les risques engendrés par une forte disponibilité du Ni, mais également à extraire un maximum de métal du sol. L'exploitation des espèces hyperaccumulatrices de Ni *Streptanthus polygaloides* (1 % Ni (MS) ; 10 t ha⁻¹), *Alyssum bertolonii* (0,8 % Ni (MS) ; 9 t ha⁻¹) et *Berkheya codii* (0,8 % Ni (MS) ; 21 t ha⁻¹) pourrait conduire avec un apport modéré de fertilisants à la récupération de 100 kg Ni ha⁻¹ (Nicks et Chambers, 1995), 72 kg Ni ha⁻¹ (Robinson *et al.*, 1997 a) et 168 kg Ni ha⁻¹ (Robinson *et al.*, 1997 b), respectivement. Sachant que le prix du Ni est actuellement de 50000 \$US t⁻¹, l'exploitation de *S. polygaloides* rapporterait 5000 \$ ha⁻¹ (valeur brute).

L'optimisation du procédé d'extraction du métal par les plantes est fortement liée à la quantité et à la disponibilité du métal au sein du sol, mais également au potentiel de phytoextraction des espèces végétales utilisées *i.e.* concentration du métal dans les tissus végétaux et production de biomasse (Robinson *et al.*, 1997 a et b ; Raskin *et al.*, 1997 ; McGrath, 1998 ; Anderson *et al.*, 1999 ; Schwartz *et al.*, 2003 ; Chardot *et al.*, 2005 ; Keller, 2006). *B. codii* est une espèce qui présente un bon potentiel quant à la réussite du procédé de phytoremédiation. En effet, celle-ci produit une importante quantité de biomasse et présente de fortes concentrations en Ni dans ses parties aériennes. De plus, elle se propage et se cultive facilement et tolère des conditions climatiques fraîches. Le nombre de récoltes annuelles de l'espèce *B. codii* nécessaire pour réduire la contamination en Ni du sol à la concentration seuil de 75 mg Ni kg⁻¹ (Etats-Unis) a été calculé pour différents niveaux de pollution du sol (Tableau 1 ; Robinson *et al.*, 1997 b). *Leptoplax emarginata* (*Brassicaceae*) présente également un bon potentiel d'extraction du Ni, notamment du fait de sa forte biomasse. *L. emarginata* est capable d'extraire jusqu'à 39 % de la fraction de Ni échangeable du sol au terme d'une culture de 3 mois en vase de végétation (Chardot *et al.*, 2005).

Tableau 1. Nombre de récoltes annuelles de l'espèce *Berkheya codii* nécessaires pour réduire la contamination en Ni des sols au niveau de la concentration seuil des Etats-Unis (i.e. 75 µg g⁻¹).

Teneur en Ni initiale du sol µg g ⁻¹	Teneur après un an de culture µg g ⁻¹	Nombre de récoltes pour décontaminer le sol
10000	9918	138
5000	4925	74
2000	1932	34
1500	1435	26
1000	939	18
750	691	14
500	445	10
250	200	4
100	59	2

Hypothèses: (i) Biomasse de 22 t ha⁻¹ ; (ii) Seulement la moitié du Ni est extractible ; (iii) La teneur en Ni dans la plante est fonction de la teneur en Ni extractible du sol (Robinson *et al.*, 1997 b).

Néanmoins, comme toutes méthodes actives de décontamination des sols, la phytoextraction peut engendrer des risques vis-à-vis des êtres vivants (Angle et Linacre, 2005). Le principal risque dans le cas de la culture d'espèces hyperaccumulatrices de métal est principalement lié à l'exposition des organismes vivants à de fortes concentrations en métal. Aussi, le risque est directement fonction : (i) de la probabilité d'exposition, (ii) du niveau d'exposition, et (iii) de l'effet toxique de l'exposition. Ainsi, chaque étape de la mise en place du procédé de phytoextraction doit faire l'objet d'études préalables, spécifiques à chaque site, afin de considérer la faisabilité du projet en tenant compte des risques et des bénéfices de la méthode.

3. Conclusion

Le potentiel de phytoextraction des plantes hyperaccumulatrices dépend, d'une part, de la disponibilité du Ni dans le sol et, d'autre part, des capacités de chaque espèce hyperaccumulatrice à absorber, transloquer et accumuler le Ni dans ses tissus. Pour optimiser le procédé de phytoextraction et généraliser son utilisation à différents milieux, les mécanismes impliqués dans la mobilisation et les transferts de Ni, du sol vers les organes foliaires des plantes hyperaccumulatrices, doivent être caractérisés.

Les grandes étapes du cycle biogéochimique du Ni dans le système sol - solution - plante hyperaccumulatrice et les interrogations liées à chacune d'elles sont résumées dans la Figure 8. Nos travaux de Recherche sont focalisés sur les transferts du Ni des constituants minéraux du sol vers la solution, puis vers la plante hyperaccumulatrice (points 1 à 4). Le retour du métal au sol par le biais des feuilles sénescentes n'a pas été abordé.

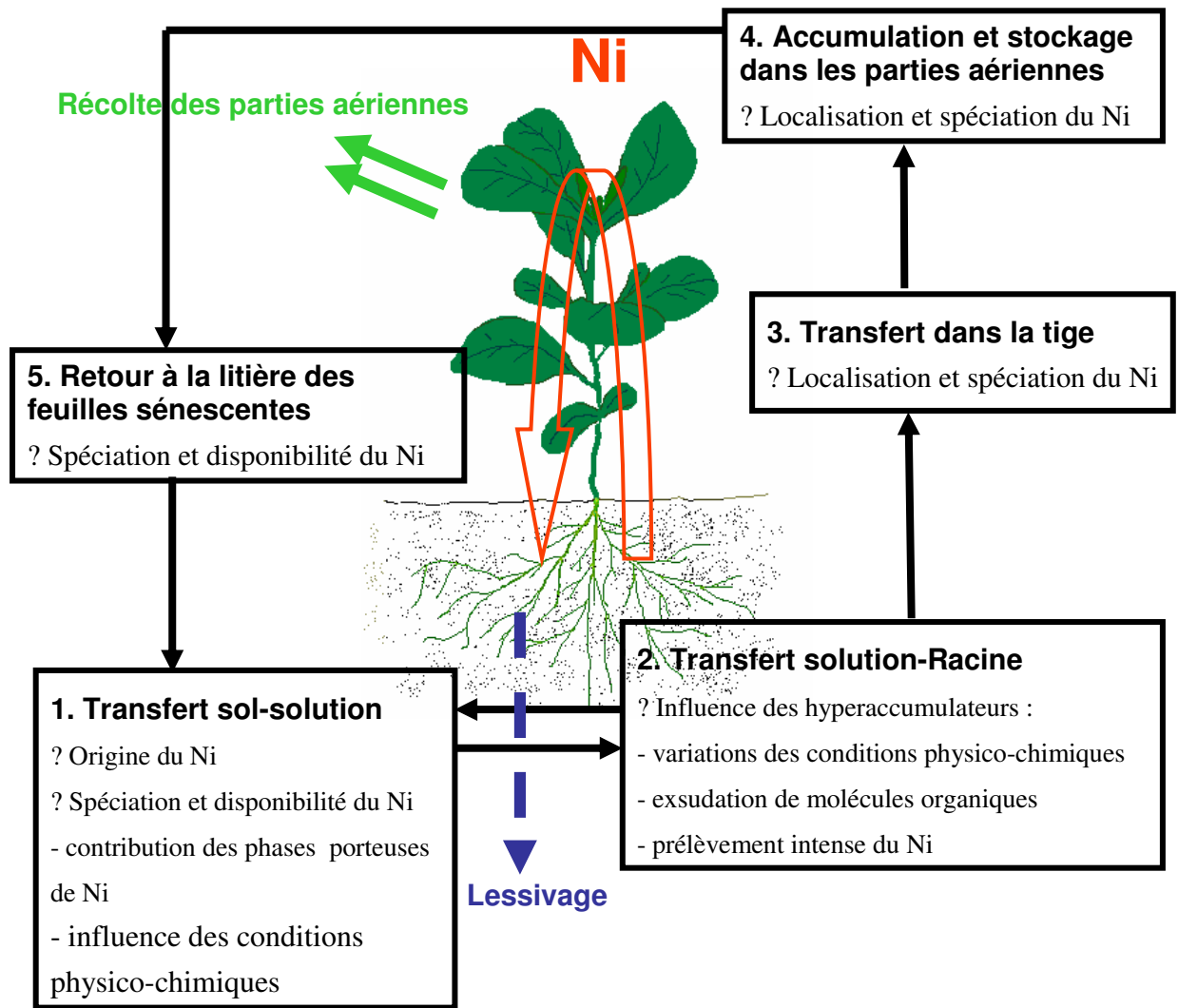


Figure 8. Schéma résumant les principales étapes du cycle biogéochimique du Ni.

Chapitre II

Matériels et méthodes

Dans ce chapitre sont décrits les matériels ainsi que les approches et les outils méthodologiques communs à l'ensemble des expérimentations menées. Les conditions expérimentales relatives à un chapitre donné sont détaillées dans ce dernier.

Le choix des plantes hyperaccumulatrices, des minéraux et des conditions expérimentales s'inscrit dans une démarche scientifique qui vise à comprendre les mécanismes qui influencent la disponibilité du Ni dans les sols à forte teneurs en Ni, et son transfert vers les plantes, dans le contexte du cycle biogéochimique du Ni dans les milieux à fortes teneurs en Ni. Les espèces hyperaccumulatrices étudiées présentent des capacités singulières vis-à-vis de l'extraction du Ni. La comparaison de ces espèces permet d'établir la relation entre l'efficacité de la phytoextraction et les mécanismes d'acquisition et de séquestration du Ni des plantes hyperaccumulatrices. Ces plantes se développent sur des sites ultramafiques d'Europe (sols serpentinisés) dans lesquels sont présentes des phases minérales nickélicifères semblables aux minéraux étudiés. Aussi, ces travaux de recherche sont basés sur l'étude de systèmes minéraux nickélicifères-plantes hyperaccumulatrices représentatifs des milieux ultramafiques.

1. Matériels

1.1. Plantes

Nous avons choisi d'étudier trois hyperaccumulateurs de Ni de la famille *Brassicaceae*, *L. emarginata*, *Al. murale* et *Th. caerulescens*. Précédents travaux ont montré que ces espèces ne présentaient pas le même potentiel vis-à-vis de l'extraction du Ni (Chardot *et al.*, 2005). Une espèce témoin non accumulatrice, *Aurinia saxatilis*, a également été cultivée.

➤ *Leptoplax emarginata* (Boiss.) O.E. Schulz

L. emarginata (Photographie 2A) est une espèce hyperaccumulatrice de Ni pouvant contenir jusqu'à 34 400 mg Ni kg⁻¹(MS) dans ses parties aériennes (Brooks, 1998 b). Les plantes peuvent atteindre une hauteur de 2 m en milieu naturel lors de la floraison. *L. emarginata* présente un potentiel d'extraction du Ni élevé, supérieur à *Th. caerulescens* ou *Al. murale* (Chardot *et al.*, 2005). Aucune étude n'a été effectuée sur la rhizosphère de cette espèce. Les semences utilisées pour les expérimentations proviennent d'individus qui se développent sur un sol de serpentine du Nord de la Grèce (Col de Katara, Monts Pinde, 1670 m, climat méditerranéen) (Reeves *et al.*, 1980).

➤ *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl

Th. caerulescens (Photographie 2B) est une plante connue pour accumuler de fortes quantités de zinc, de cadmium et de nickel. Les semences proviennent de spécimens hyperaccumulateurs de Ni et de Zn et co-accumulateurs de Cd, prélevés sur sol de serpentine au niveau du site ultramafique de Bergenbach (Fellingering-Oderen, Haut-Rhin, altitude 780 m, climat tempéré montagnard). L'analyse des parties aériennes des plantes récoltées sur ce site a montré que l'espèce *Th. caerulescens* est capable d'accumuler jusqu'à 8780 mg kg⁻¹(MS) de Ni et 5940 mg kg⁻¹(MS) de Zn dans ses tissus (Reeves *et al.*, 2001).

➤ *Alyssum murale* Waldst. & Kit.

Al. murale (Photographie 2C) est une espèce hyperaccumulatrice de Ni largement étudiée pour ses capacités à extraire le Ni du sol. Les semences proviennent de spécimens prélevés sur sol de serpentine au niveau du site ultramafique de Pojske (Albanie, altitude 500 m, climat méditerranéen). L'analyse des parties aériennes des plantes récoltées sur ce site a montré que l'espèce *Al. murale* est capable d'accumuler jusqu'à 8480 mg kg⁻¹(MS) de Ni dans ses tissus (Bani *et al.*, 2007 ; Shallari *et al.*, 1998).

➤ *Aurinia saxatilis* (L.) Desv.

Aurinia saxatilis ou *Alyssum saxatile* (Photographie 2D), plus communément appelée la corbeille d'or, est une plante vivace d'ornementation. A l'instar des espèces hyperaccumulatrices étudiées, cette espèce fait partie de la famille *Brassicaceae*. Elle est par conséquent génétiquement proche des hyperaccumulateurs de Ni, notamment par sa résistance au stress hydrique (plantes de milieux rocailloux). En revanche, *Au. saxatilis* n'accumule pas le Ni. Par conséquent, cette espèce a servi de témoin non accumulateur de Ni.



A : *Leptoplax emarginata*



B : *Thlaspi caerulescens*



C : *Alyssum murale*



D : *Aurinia saxatilis*

Photographie 1. Plantes cultivées au cours des différentes expérimentations. A, B, C : espèces hyperaccumulatrices et D : espèce témoin non accumulatrice. L'ensemble des plantes a été photographié après 5 mois de culture en rhizotron (largeur du dispositif = 25 cm).

1.2. Minéraux tests

Trois minéraux nickélicifères communément présents dans les sols ultramafiques ont été utilisés dans les différentes expérimentations : un minéral d'origine primaire (**chrysotile**) et deux minéraux d'origine secondaire (**goethite** et **smectite**). L'étude du comportement de ces minéraux en présence de plantes hyperaccumulatrices représente un intérêt notable pour l'optimisation du procédé de phytoextraction compte tenu du fait qu'ils peuvent être présents à la fois dans les milieux naturels (sols ultramafiques de serpentine ou latéritique) et anthropiques à fortes teneurs en Ni (Shallari *et al.*, 1998 ; Massoura *et al.*, 2006 ; Becquer *et al.*, 2006). Afin de mettre en évidence la contribution de ces phases minérales nickélicifères à la disponibilité du Ni dans le milieu de culture, les trois minéraux devaient représenter une gamme de disponibilité du Ni. Aussi, les échantillons de minéraux ont été choisis en fonction de (i) leur nature minéralogique, (ii) leur degré d'altérabilité et, (iii) leur teneur en Ni.

Les phases minérales utilisées dans les expérimentations et leur origine sont présentées ci-après. La caractérisation des échantillons minéraux (morphologie, chimie, teneur et disponibilité en Ni,...) est détaillée dans le chapitre IV.

- La goethite, notée « **Goethite** », est un oxyhydroxyde de fer de formule chimique $(\text{Fe, Ni})\text{OOH}$. Les échantillons de goethite utilisés dans les différentes expérimentations ont été synthétisés au laboratoire (*cf.* paragraphe 2.2.1). Ceux-ci se présentent sous forme de microcristaux aciculaires purs et homogènes. Le minéral contient en moyenne 1,5 % de Ni (% massique).

- Le chrysotile, noté « **Chrysotile** », est issu d'un minerai nickélicifère constitué de 2 phases minérales : une phase phyllosilicatée prédominante du groupe des serpentines (chrysotile) et un oxyde de fer (magnétite). Les échantillons proviennent de dépôts de stériles d'une ancienne mine souterraine de nickel et d'asbeste en Slovaquie orientale (Dobšiná). Ils ont été prélevés au niveau d'une zone de dépôts végétalisés entre 60 et 80 cm de profondeur (Photographie 1A). Le Ni est uniquement présent au sein du chrysotile $(\text{Mg, Fe, Ni})_3\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$. Ce dernier contient en moyenne 0,2 % de Ni (% massique).

- Le minerai à smectite, noté « **Smectite** », est constitué de plusieurs phases minérales : une phase phyllosicatée prédominante comprenant un mélange de smectites dioctaédriques à forte teneur en Fe (montmorillonites-Fe) et de phyllosilicates trioctaédriques (talcs), ainsi que des phases accessoires telles que des chromites alumineuses, des pyroxènes et des carbonates. Les échantillons proviennent d'une mine de nickel brésilienne actuellement en exploitation (Niquelândia). Ils ont été prélevés dans des latérites nickélifères (Photographie 1B) formées à partir de l'altération d'une roche mère ultramafique (pyroxénite). Le minerai contient en moyenne 2,3 % de Ni (% massique). Le Ni est surtout présent dans les smectites dioctaédriques de formule chimique globale $Mg_{0,5}(Fe, Mg, Al, Ni)_4(Si, Al)_8O_{20}(OH)_4$.

Les analyses en diffraction des rayons X des échantillons de goéthite, de minerai à chrysotile et de minerai à smectite sont présentées en Annexe 1.



Photographie 2. Profils de sols dans lesquels ont été prélevés le minerai à chrysotile (A), et le minerai à smectite (B).

1.3. Substrat quartzeux

Dans l'ensemble des expérimentations, les minéraux ont été utilisés en mélange avec du quartz pur calibré (50-100 μm ou 0,5-1,0 mm). Celui-ci a été utilisé en tant que matrice inerte afin de favoriser la dispersion des particules minérales et ainsi de faciliter le passage de solutions au sein des échantillons.

2. Préparation des minéraux tests et du substrat quartzeux

Pour pouvoir effectuer un bilan de leur altération, les phases minérales porteuses de Ni utilisées dans les expérimentations devaient autant que possible être pures et homogènes en taille et en composition. C'est pourquoi il a été nécessaire soit de synthétiser directement le minéral (**Goethite**), soit de traiter les minerais collectés afin d'obtenir des échantillons homogènes (**Chrysotile** et **Smectite**).

2.1. Préparation des minéraux tests

2.1.1. Synthèse de la goethite

La goethite a été synthétisée selon le protocole décrit par Gasser *et al.* (1996). Cette synthèse consiste à dissoudre 40,4 g de nitrate ferrique ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ - 99 % de pureté) et 1,5 g de nitrate de nickel ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 99 % de pureté) dans 100 ml d'eau déminéralisée, dans un flacon en polyéthylène de 250 ml. La quantité de nitrate de Ni est choisie de telle sorte que la fraction molaire du Ni représente 5 % de celle du Fe dans la solution. Ainsi, à la fin de la préparation la goethite contiendra environ 1 % de Ni (% atomique). L'agitation est réalisée au moyen d'un barreau aimanté jusqu'à dissolution totale des nitrates ferriques et nickélifères. Après agitation, la solution est laissée au repos pendant 12 min. Elle est ensuite transférée dans un flacon en polyéthylène de 2 l, dans lequel sont ajoutés 214,4 ml de KOH 5M. De l'eau ultrapure (18 M Ω) est ajoutée afin d'obtenir une suspension finale d'un volume de 2 l et une concentration en KOH de 0,5 M. Après agitation, la suspension est placée à l'étuve à 62 ± 3 °C pendant 7 jours, avec une agitation journalière de 15 s. Après 7 jours, les matériaux amorphes sont traités pendant 2 h avec H_2SO_4 3M à 50 °C. Ce traitement sert à purifier la goethite substituée (Schwertmann *et al.*, 1989). Les échantillons sont ensuite lavés quatre fois sur un filtre avec de l'eau ultrapure, dialysés (4 bains de 2h, agitation manuelle toute les 30 min), filtrés et séchés à 50 °C pendant la nuit. Après séchage, les échantillons sont doucement broyés dans un mortier en porcelaine.

2.1.2. Calibrage des échantillons minéraux

La synthèse de goethite a permis l'obtention de particules minérales aciculaires homogènes en taille (1 μm de longueur). Un calibrage n'a donc pas été nécessaire pour les échantillons de goethite. En revanche, les échantillons des minerais à smectite et à chrysotile ont nécessité une calibration. Pour cela, les échantillons ont tout d'abord été finement broyés à l'aide d'un broyeur pour sol. Le minerai à smectite a ensuite été tamisé à sec entre 20 et 40

μm . Le minerai à chrysotile a été tamisé entre 20 et 40 μm sous eau déminéralisée ($>15\text{ M}\Omega$) afin de limiter la dispersion de fines particules dans l'air.

2.1.3. Purification des phases minérales

La goethite de synthèse était constituée de particules de nature homogène et pure, et n'a donc eu à subir aucun traitement.

Le chrysotile a pu être isolé du minerai de sorte à obtenir une phase minérale pure. Pour cela, le minerai a été mis en suspension dans de l'eau déminéralisée ultrapure et mis sous agitation lente. La magnétite a été séparée du chrysotile manuellement à l'aide d'un aimant.

En revanche, les smectites dioctaédriques ne pouvaient pas être facilement isolées des autres phases constitutives du minerai. Celui-ci a donc été utilisé sans séparation des différentes phases porteuses dans les expérimentations.

2.1.4. Séchage

Après purification, le chrysotile a été séché à l'étuve à 50 °C. Après séchage, la phase minérale a été broyée doucement dans un mortier en porcelaine.

2.2. Préparation du substrat quartzeux

Le quartz se présentait initialement sous forme de macrocristaux décimétriques. Ceux-ci ont été broyés finement à l'aide d'un broyeur à mâchoires, puis tamisés sous l'eau afin d'obtenir deux fractions granulométriques calibrées (i) entre 50 et 100 μm et (ii) entre 0,5 et 1 mm. Afin d'éliminer toutes les impuretés, les échantillons de quartz calibrés ont été lavés dans une solution d'acide oxalique (1 g l⁻¹), puis rincés avec de l'eau ultrapure. Ensuite, les échantillons ont été lavés dans une solution d'acide chlorhydrique (0,1 N) puis rincés abondamment avec de l'eau ultrapure. Enfin, les fractions fines ($<2\ \mu\text{m}$) ont été éliminées par ultrasons.

3. Caractérisation minéralogique et microscopique des échantillons

3.1. Diffraction des rayons X (DRX)

Les analyses en DRX des échantillons de **Goethite** et de **Chrysotile** ont été effectuées au laboratoire de Biologie des Ecosystèmes Forestiers (BEF, INRA Champenoux, France). Les diffractogrammes X ont été obtenus en utilisant un diffractomètre Siemens de type D 5000 équipé d'une anticathode au cuivre et d'un monochromateur graphite (30 mA et 40 KeV). Les diffractogrammes X ont été enregistrés à température ambiante. Les échantillons ont été

préparés soit sous forme de poudre (**Goethite**), soit sous forme de dépôts orientés à partir d'une suspension aqueuse (**Chrysotile**).

Les analyses en DRX de la **Smectite** ont été effectuées au laboratoire Environnement et Minéralurgie (LEM, CNRS/INPL, Nancy, France). Les diffractogrammes X ont été obtenus en utilisant un diffractomètre Bruker D8, avec une source au cobalt (Co $K\alpha_1$ $\lambda = 1,7902 \text{ \AA}$). Le diffractomètre était équipé d'un goniomètre (θ , 2θ) et d'un détecteur sensible à la position (PSD). Les diffractogrammes X ont été enregistrés (i) à température ambiante sur des échantillons préparés sous forme de poudre, et (ii) à température ambiante ou après saturation à l'éthylène glycol et chauffage à 550°C , sur des échantillons préparés sous forme de dépôts orientés.

3.2. Microscopie électronique à transmission (MET-EDX)

L'observation des phases minérales ainsi que l'ensemble des microanalyses chimiques associées ont été réalisés sur un microscope électronique à transmission Philips CM20 (200 kV), couplé avec un spectromètre de dispersion en énergie des rayons X, EDAX (Faculté des Sciences, Nancy, France).

Préparation des échantillons - Quelques mg d'échantillons, sous forme de poudre fine ($< 200 \mu\text{m}$), ont été suspendus dans de l'éthanol puis dispersés par ultrasons. Une goutte de la suspension a ensuite été déposée sur une grille en cuivre recouverte d'un film de carbone.

3.3. Microscopie électronique à balayage (MEB)

L'observation des échantillons ainsi que l'ensemble des microanalyses chimiques associées ont été réalisées sur un microscope électronique à balayage Hitachi S 2500, couplé à un système de microanalyses chimiques ThermoFisher (Faculté des Sciences, Nancy, France).

Préparation des échantillons - Les échantillons sont fixés sur des lames de verres (minéraux et racines de végétaux) ou sur un support en carbone (feuilles de végétaux). Ils sont ensuite recouverts d'une fine couche de carbone avant d'être observés et/ou analysés.

4. Analyses chimiques

4.1. Caractérisation de la disponibilité du Ni par extractions chimiques

4.1.1. Extraction du Ni du sol par différents réactifs

La disponibilité du Ni a été caractérisée à l'aide de trois extractants chimiques : l'eau, le DTPA-TEA et l'eau régale. Les extractants utilisés ont été choisis de par leur capacité à extraire une plus ou moins grande fraction du Ni présent dans le sol (Figure 9).

- Le Ni extrait à l'eau *i.e.* Ni hydrosoluble est la fraction de Ni instantanément disponible pour les organismes.

- Le Ni extrait au DTPA-TEA correspond à la fraction la plus labile du compartiment du Ni échangeable dans le sol et comprend la fraction de Ni hydrosoluble.

Le Ni extractible à l'eau régale ne peut être qualifié de «total», mais la proportion extraite est nettement supérieure à la fraction de Ni phytodisponible, estimé par extraction au DTPA-TEA. L'extraction à l'eau régale suppose la destruction partielle voire totale de nombreuses phases solides habituellement stables aux conditions physico-chimiques des sols et pouvant contenir du Ni (oxydes cristallisés, silicates).

Le Ni total a été obtenu par extractions à l'acide fluorhydrique, réalisées par le Laboratoire d'analyses de sols de l'INRA d'Arras.

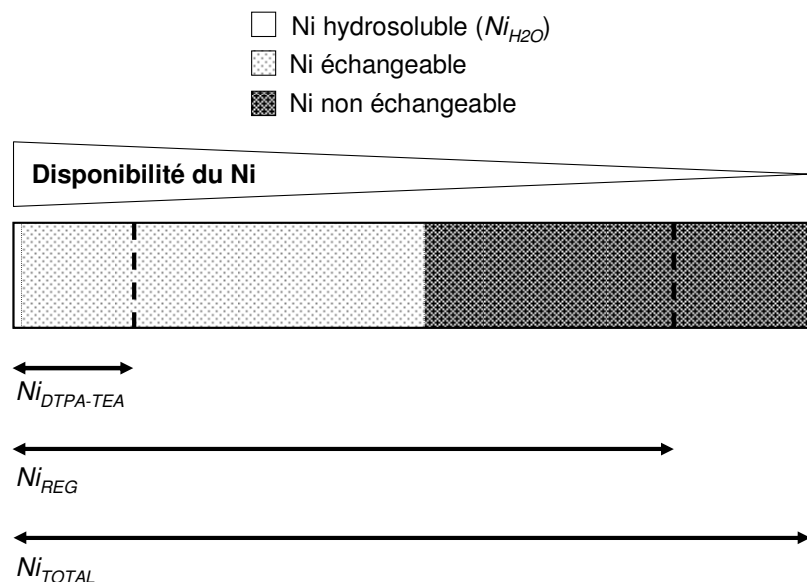


Figure 9 : Extraction du Ni du sol par différents réactifs et disponibilité du Ni.

4.1.2. Ni hydrosoluble « Ni_{H_2O} »

Afin de déterminer la fraction de Ni en solution, des extractions à l'eau ont été réalisées. Pour cela, une prise d'essai de 2,5 g d'échantillon solide a été mise en suspension dans 50 ml d'eau ultrapure. Le mélange solide-solution a été agité pendant 20 h pour atteindre l'équilibre stationnaire, puis laissé au repos pendant plusieurs heures afin que les particules solides se déposent sur le fond. La fraction liquide a ensuite été filtrée sur une membrane en ester de cellulose de porosité 0,22 μm (Rotilabo®-Spritzenfilter).

4.1.3. Ni extractible au DTPA-TEA « $Ni_{DTPA-TEA}$ »

Le Ni extractible au DTPA-TEA correspond à l'estimation chimique de la fraction de Ni de la phase solide, disponible pour les plantes hyperaccumulatrices. Une prise d'essai de 2,5 grammes d'échantillon solide a été mise en suspension dans 50 ml de solution extractante tamponnée à pH $7,3 \pm 0,2$. L'extractant est une solution mixte de triéthanolamine -TEA- (0,1 M), d'acide diéthylènetriamine pentacétique -DTPA- (0,005 M) et de chlorure de calcium (0,01 M) sous forme de sel $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (norme AFNOR X31-427). Le mélange solide-solution a été agité pendant 2 h, puis centrifugé pendant 20 min à 5000 tours.min⁻¹. Après centrifugation, la fraction liquide est filtrée sur une membrane en ester de cellulose de porosité 0,22 μm (Rotilabo®-Spritzenfilter).

4.1.4. Ni extractible à l'eau régale « Ni_{REG} »

Pour l'ensemble des échantillons de terre et de minéraux, la fraction de Ni extraite à l'eau régale correspond environ à 80 % du Ni total (Annexe 2).

Pour doser Ni_{REG} , des prises d'essai de 0,5 gramme d'échantillon solide préalablement broyé finement au mortier en agate ont été placées dans des tubes en verre et soumises à une attaque acide avec : 1 ml d'eau ultrapure, 2 ml d'acide nitrique (98 %) et 6 ml d'acide hydrochlorique (37 %). L'extraction a été réalisée à 180 °C au moyen d'un bloc thermostaté, durant trois heures pour les mélanges « minéral-quartz » et cinq heures pour les échantillons de terre. Après refroidissement complet, les minéralisats ont été filtrés sur du papier filtre sans cendre et ajustés à 25 ml avec de l'eau ultrapure.

4.2. Caractérisation de la disponibilité du Ni par la technique des cinétiques d'échange isotopique « CEI »

A. Principe

La méthode des *CEI* est fondée sur la dilution d'un isotope de l'élément étudié dans l'ensemble des compartiments du sol où se trouve cet élément. Un compartiment (ou « pool ») est la quantité d'une substance donnée dont toutes les parties constitutives possèdent une cinétique identique de transport ou de transformation (Sheppard, 1962 ; Atkins, 1973). Cette méthode permet ainsi d'évaluer la contribution des différents compartiments de Ni disponibles de la phase solide dans le réapprovisionnement en métal de la solution du sol, ce par l'utilisation d'un traceur radioactif.

La méthode des *CEI* a été développée par Fardeau en 1981 afin de déterminer la fraction de phosphore assimilable du sol. Elle a été adaptée pour le Ni du sol par Echevarria (1996). Lorsqu'un isotope radioactif est apporté dans un système sol-solution en état stationnaire, il est distribué de façon proportionnelle entre les différentes fractions contenant l'isotope stable de même nature. Ainsi, la quantité de radioactivité initialement introduite dans le système sol-solution (R) décroît en fonction du temps d'échange isotopique (r_t). Dans la mesure où (i) le système a été mis en état stationnaire et (ii) la quantité de radioisotope apporté au système est négligeable par rapport à la quantité de l'élément stable initialement présent en solution, alors la concentration en Ni stable de la solution reste constante durant toute la période d'échange isotopique (Echevarria, 1996).

La forme générale de la relation représentative du transfert des ions traceurs, de la solution vers la phase solide du sol, pour des durées d'échange isotopique comprises entre 30 secondes et 4 mois est :

$$r_t/R = r_1/R [t+(r_1/R)^{1/n}]^{-n} + r(\infty)/R \quad [1]$$

r_1/R traduit le pouvoir tampon à court terme vis-à-vis des éléments, puisque ce paramètre est dû à l'intensité des flux existant entre les compartiments très faiblement adsorbés à la surface des colloïdes et la solution du sol. n correspond au coefficient de la régression linéaire $\ln(r_t/R) - \ln t$.

Dans l'hypothèse où à l'équilibre, lorsque t tend vers l'infini, le traceur s'est échangé avec l'ensemble de l'élément stable de la phase solide du sol, alors :

$$r(\infty)/R = Ni_s/Ni_T \quad [2]$$

Avec : Ni_s , la concentration de Ni en solution pour un kg d'échantillon solide (en $mg\ kg^{-1}$), et Ni_T la quantité total de Ni dans un kg d'échantillon solide (en $mg\ kg^{-1}$).

B. Méthode

Le radionucléide $^{63}\text{Ni}^{2+}$ se présente initialement en solution sous forme de NiCl_2 dans HCl 0.5 M (NEN), et présente une activité de 185 MBq. L'activité spécifique du radioélément est de $4,63 \cdot 10^{11} \text{ Bq g}^{-1}$, et sa période est de 96 ans. La solution mère a été diluée dans l'eau ultrapure (18 M Ω) de manière à obtenir une solution de concentration $5,7 \text{ kBq ml}^{-1}$. Cette dernière a été conservée à 4 °C entre chaque expérimentation. Une prise d'essai de 2,5 grammes d'échantillon solide (Terre ou mélange minéral-quartz) a été mise en suspension dans 49 ml d'eau ultrapure. Le mélange solide-solution a été agité pendant 20 heures à température ambiante pour atteindre l'équilibre stationnaire. Les cinétiques d'échange isotopique du $^{63}\text{Ni}^{2+}$ ont été déterminées après injection dans le système d'un ml de solution contenant le radionucléide (temps $t=0$). Quatre échantillons de la suspension sont prélevés à l'aide d'une seringue 1, 4, 10 et 40 min après l'injection du radionucléide. Le système reste sous agitation constante tout au long de l'expérimentation. A la fin du temps d'expérimentation, le mélange solide-solution est laissé au repos pendant plusieurs heures afin que les particules solides se déposent sur le fond. L'ensemble des aliquotes de suspension prélevées dans le système est filtré sur une membrane en ester de cellulose de porosité $0,22 \mu\text{m}$ (Rotilabo®-Spritzenfilter). Un ml de chaque solution radioactive récupérée au cours de l'expérimentation est ensuite déposé dans un flacon de comptage contenant dix ml de liquide scintillant (Ready safe, Beckman). La radioactivité des échantillons est comptée à l'aide d'un compteur β^- à scintillation liquide (modèle Tri-Carb TR, PACKARD).

C. Calcul de la valeur E

La valeur $E_{(t)}$ est une estimation physico-chimique qui correspond à la quantité de Ni isotopiquement échangée entre la solution du sol et la phase solide entre l'instant 0 et l'instant t , en condition abiotique. Elle est calculée par la formule de dilution isotopique [3], en faisant l'hypothèse que la radioactivité spécifique du Ni de la solution du sol est égale à la radioactivité spécifique de la totalité du pool de Ni échangeable pendant le temps t (Echevarria, 1996 ; Shallari, 1997, Massoura, 2004):

$$E_{(t)} = Ni_s * (R/r_t) \quad [3]$$

$E_{(0-1 \text{ min})}$ *i.e.* la quantité de Ni isotopiquement échangée entre 0 et 1min correspond au pool des ions libres échangeables. Ce compartiment représente grossièrement la fraction de Ni adsorbé (adsorption non spécifique) à la surface de la phase solide.

D. Caractérisation de la disponibilité du Ni par la méthode des CEI

La méthode des CEI permet de quantifier les trois facteurs qui caractérisent la disponibilité du Ni dans les sols :

- **L'intensité** (en $\mu\text{g l}^{-1}$) : activité de la (les) espèce(s) chimique(s) biologiquement active(s) en solution. Celle-ci peut être approximée par la concentration du Ni en solution Ni_{H_2O} .
- **La quantité** (en mg kg^{-1}) **ou valeur** $E_{(t)}$: compartiment échangeable de Ni susceptible de pourvoir la solution du sol au temps t.
- **La capacité** (en l kg^{-1}) : pouvoir tampon vis-à-vis du Ni en solution *i.e.* capacité de réapprovisionnement en Ni de la solution par le compartiment de Ni le plus labile de la phase solide. Ce compartiment est estimé par la valeur $E_{(0-1\text{min})}$.

$$\text{Capacité} = E_{(0-1\text{ min})} / Ni_{H_2O} \quad [4]$$

La connaissance du facteur capacité est essentielle pour prévoir les transferts sol-plante dans les systèmes où les prélèvements sont susceptibles de modifier significativement la valeur de l'intensité.

4.3. Dosage du pH_{H_2O}

Des mesures de pH_{eau} avant et après culture ont été réalisées suivant la norme AFNOR X31-117. Le pH_{H_2O} a été déterminé par mesures électrométriques (pH-mètre SCHOTT CG842), sur des suspensions d'échantillons solides (terre ou mélange minéral-quartz) réalisées dans de l'eau ultrapure.

4.4. Minéralisation des végétaux

Après récolte, les feuilles, les tiges et les racines des plantes de chaque rhizotron ont été récoltées, lavées à l'eau du robinet, puis rincées avec de l'eau déminéralisée ($>15 \text{ M}\Omega$). Les échantillons de plante ont ensuite été mis à sécher à l'étuve à $70 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant au minimum 48 h. Une fois secs, les différents organes des plantes ont été broyés dans un mortier en agate. Pour les plantes issues de la culture en rhizotron, des prises d'essai de 0,5 g de matière sèche végétale ont été placées dans des tubes en verre et soumises à une attaque acide avec : 2 ml d'acide sulfurique (98 %), 6 ml d'acide nitrique (98 %) et 6 ml de peroxyde d'hydrogène (30 %). La minéralisation a été conduite sous une température de $250 \text{ }^\circ\text{C}$ au moyen d'un bloc thermostaté. Les minéralisats ont été filtrés sur du papier filtre sans cendre et ajustés à 25 ml avec de l'eau ultrapure.

La minéralisation des plantes issues de la culture en colonne lysimétrique (plantes à faible biomasse) a été réalisée dans les mêmes conditions que celle des plantes issues de la culture en rhizotron, mais en absence d'acide sulfurique pour des commodités de dosage.

4.5. Dosage du Ni dans les échantillons liquides

A l'issue de chaque analyse (extractions et minéralisations) les solutions filtrées ont été analysées. Le dosage du Ni a été effectué soit par spectrométrie d'absorption atomique (Spectraa 220, Varian, four à effet Zeeman) pour les concentrations les plus faibles ($< 0,3 \text{ mg kg}^{-1}$), soit par spectrométrie d'émission à plasma induit (ICP-AES, Liberty II, Varian) pour les concentrations en Ni supérieures à $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$.

5. Traitement statistique des données

Dans les tableaux et les figures, les valeurs obtenues pour chaque traitement correspondent à la moyenne arithmétique des répétitions plus ou moins l'écart type. Dans certains cas, les traitements sont affectés d'une lettre, déterminée suite à une analyse de variance (test de Newman-Keuls). Les valeurs suivies de lettres identiques au sein d'un même groupe statistique ne présentent pas de différence significative au seuil de confiance de 5 %. Ces analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel STATBOXPROTM (GRIMMER Logiciels ©). Le traitement de certaines données par analyse factorielle en composantes principales a été effectué à l'aide du même logiciel.

Chapitre III

Contribution des phases minérales nickélifères à la phytodisponibilité du nickel dans les sols ultramafiques

La disponibilité du Ni dans les sols dépend, d'une part, de la spéciation du Ni au sein des constituants du sol et, d'autre part, des conditions physico-chimiques du milieu qui conditionnent les processus d'échange sol-solution (pH, CEC, Eh,...). Dans les sols ultramafiques, la disponibilité du Ni peut être très élevée (Becquer *et al.*, 2006). Le Ni est principalement associé à des phyllosilicates magnésiens primaires (serpentine, chlorite) et secondaires (smectite, vermiculite), ou à des oxyhydroxydes de Fe et de Mn (Massoura *et al.*, 2006 ; Becquer *et al.*, 2006). Ces minéraux représentent un réservoir potentiel de Ni plus ou moins mobilisable. Aussi, la nature des phases minérales porteuses et la spéciation du Ni au sein de la structure des minéraux (*e.g.* formes adsorbées ou substituées) jouent un rôle important quant à la disponibilité du Ni dans les sols. Les sols ultramafiques serpentinisés sont généralement des sols sableux et peu profonds, ce qui en fait des sols secs. Ils sont caractérisés par une forte teneur en Mg (18-24 %) et en Fe (6-9 %) et une faible teneur en Ca (1-4 %) et en Al (1-2 %). Les macronutriments K, P, S sont généralement à l'état de traces. En revanche, ces sols contiennent fréquemment des quantités anormalement élevées de métaux, tels que du Ni, du Cr et du Co (Brooks, 1987).

Les plantes de milieux ultramafiques doivent développer des mécanismes de résistance aux stress hydrique et métallique. Les plantes hyperaccumulatrices de Ni sont un exemple de l'adaptation des végétaux aux milieux à forte disponibilité en Ni (teneurs généralement toxiques pour de nombreuses espèces). Ces espèces se développent naturellement sur les sols ultramafiques, et leur distribution géographique est généralement limitée à ces zones. Aussi, la distribution de ces espèces semble fortement liée à la teneur en Ni phytodisponible.

Nos objectifs au travers de ce chapitre sont :

- de mesurer la contribution des minéraux porteurs de Ni (nature, abondance et teneur en Ni) à la disponibilité du Ni dans les sols ultramafiques.
- d'établir les relations entre, d'une part, la disponibilité du Ni dans les sols et, d'autre part, la distribution des espèces végétales et leur teneur en Ni.

Pour répondre à ces objectifs, nous avons effectué une étude complète d'un site ultramafique (pédologie, minéralogie, botanique) sur lequel se développe une population native de *Th. caerulea*, et caractérisé par une forte variabilité de la disponibilité du Ni.

1. Matériels et méthodes

1.1. Présentation du site étudié

La zone étudiée est située au Nord-Est de la France dans le département du Haut-Rhin en Alsace (France) (site de Bergenbach, N47°91'- E06°96', Oderen-Fellingring). Le site correspond à une zone ultramafique caractérisée par la présence d'une carrière de serpentinite anciennement exploitée (Photographie 1).



Photographie 3. Front de taille de la carrière de serpentinite du site ultramafique de Bergenbach.

1.1.1. Géologie

Le site est situé dans les Vosges méridionales (Vosges Hercyniennes), au niveau de la klippe du Talhorn. La klippe du Talhorn est constituée d'un conglomérat de blocs anguleux de tailles variables, constitués entre autres de péridotites serpentinisées. Ce terrain d'origine profonde provient d'une ancienne croûte océanique. Il est constitué d'ophiolites (*i.e.* roches magmatiques) dont un fragment aurait été charrié par-dessus les roches de la série d'Oderen. D'autres fragments analogues, sur le versant opposé de la vallée de la Thur, constituent une « ligne de klippes » au contact des séries du Markstein (Viséen) et d'Oderen (Viséen inférieur) (Hohl, 1994).

La roche mère constitutive de la zone étudiée est une péridotite (Harzburgite) fortement serpentinisée. Toutefois, la présence sporadique de gneiss et de matériaux d'origine glaciaire a également été observée (Chardot *et al.*, 2007).

1.1.2. Pédologie

Une toposéquence de sols a été étudiée depuis le sommet de l’affleurement (840 m) jusqu’à la base du site ultramafique (764 m) (Figure 10 ; Chardot *et al.*, 2007). Cette toposéquence est représentative de la diversité des sols présents sur le site.

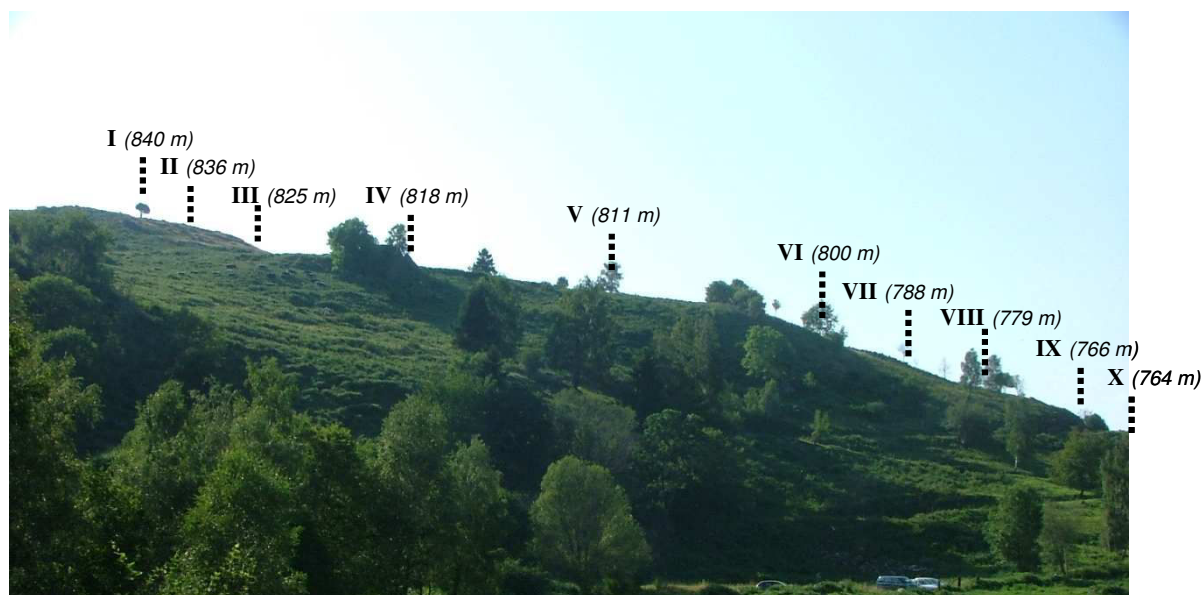


Figure 10. Site ultramafique de Bergenbach (vue de profil). Localisation et altitude des sites d’observation et de prélèvement (sols I à X) (Chardot *et al.*, 2007).

Des échantillons de terre ont été prélevés dans les différents horizons des pédons situés au niveau de chaque site. Ceux-ci ont ensuite été séchés sous serre à l’air ambiant, puis tamisés à 2 mm. Les analyses physico-chimiques des échantillons de terre ont été réalisées au Laboratoire d’Analyses des Sols de l’INRA d’Arras suivant des méthodes normalisées (Tableau 2).

Les observations de terrain et les analyses chimiques effectuées sur les échantillons de sols nous ont permis de mettre en évidence quatre types de sol le long de cette toposéquence ultramafique. En surface, les pédons présentent généralement une litière de type Mull caractérisée par une forte teneur en carbone organique, excepté pour le pédon situé au niveau du site V qui possède un humus de type Moder.

Le rapport Mg/Ca (cations échangeables) et le taux de saturation en bases échangeables mesuré dans l'horizon de surface des sols sont les principaux indicateurs de différenciation des pédons de la toposéquence (Tableau 2).

(1) Les sols situés au niveau des sites I, III, IV, VIII et IX (notés respectivement sols I, III, IV, VIII et IX) ont été classifiés dans les **cambisols hypermagnésiques hypereutriques** (classification WRBSR-FAO). Ils sont caractérisés par un rapport Mg/Ca supérieur à 3, et un taux de saturation supérieur à 95 %.

(2) Les sols situés au niveau des sites VI et VII (notés respectivement sols VI et VII) ont été classifiés dans les **cambisols magnésiques eutriques**. Ils sont caractérisés par un rapport Mg/Ca supérieur à 1, et un taux de saturation d'environ 80 %.

(3) Le sol situé au niveau du site X (noté sol X) a été classifié en tant que **cambisol eutrique**.

(4) Pour finir, le sol situé au niveau du site V (noté sol V), le plus altéré de tous, a été classifié en tant que **cambisol dystrique**.

Afin de mettre en évidence la contribution des phases minérales à la biodisponibilité du Ni dans les sols, nous avons comparé la minéralogie des sols VI et IX de la toposéquence du site de Bergenbach, opposés en terme de teneur en Ni (Tableau 2) et de disponibilité du Ni (partie résultats).

Le **sol IX** (cambisol hypermagnésique hypereutrique) est caractérisé par un pH légèrement acide en surface (6,0), une CEC importante ($23,7 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$) et quasiment saturée, et des teneurs totales en Ni, Cr, Co et Fe élevées (682 mg kg^{-1} , 2350 mg kg^{-1} , 173 mg kg^{-1} , 86 g kg^{-1} , dans l'horizon A respectivement) (Tableau 2). La fraction granulométrique de ce sol est majoritairement limoneuse (52 %).

Comparativement au sol IX, le **sol VI** (cambisol magnésique eutrique) est caractérisé par un pH plus acide en surface (4,8), une CEC relativement faible ($5,3 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$) et plus fortement désaturée (Tableau 2). Les teneurs totales en Ni, Cr et Fe dans le sol VI représentent moins de la moitié des teneurs mesurées dans le sol IX. La fraction granulométrique du sol VI est majoritairement sableuse (42 %).

Les teneurs en Mg total sont similaires dans les deux sols (environ 50 g kg^{-1}). Toutefois, les teneurs en Mg échangeable sont nettement plus élevées dans le sol IX ($16,2 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$) que dans le sol VI ($2,7 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$). Pour chaque sol, la quantité de Mg échangeable correspond à plus de 50 % de la CEC.

Chapitre III. Contribution des phases minérales nickélifères à la phytodisponibilité du Ni

Tableau 2. Caractéristiques physico-chimiques des sols situés le long de la toposéquence du site ultramafique de Bergenbach.

Sites de prélèvement	Horizons	zones de prélèvement	pH		Granulométrie			Carbone organique	C/N	CEC	Cations échangeables (Cobaltihexamine)							Taux de saturation	Eléments majeurs totaux				Eléments en trace totaux		
			H ₂ O	KCl 1M	Argile	Limons	Sables				Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	Al ³⁺	Fe ³⁺	Mn ²⁺		Ca	Mg	Fe	K	Co	Cr	Ni
		cm			g kg ⁻¹						cmol ⁺ kg ⁻¹							%	g kg ⁻¹				mg kg ⁻¹		
I	A ₁	0-15	5,3	4,8	329	507	164	87,8	11,5	13,8	3,4	9,0	0,46	0,04	0,76	0,008	0,375	96	24,5	83	61	5,4	116	2230	505
II	A ₁	0-15	5,7	5,1	ND																	114	3280	444	
III	A ₁	0-15	5,8	5,3	343	446	211	67,3	10,9	19,5	3,0	15,3	0,23	0,06	<0,02	<0,001	0,224	97	7,4	70	103	10,2	202	4810	842
IV	A ₁	0-20	5,6	4,7	209	426	365	33,8	11,4	8,0	1,2	6,3	0,10	0,04	0,11	0,005	0,093	97	8,4	51	55	22,1	104	2240	372
	B	20-40	6,0	5,3	187	450	363	14,4	12,3	7,1	0,8	6,1	0,03	0,02	<0,02	<0,001	0,065	98	8,2	51	59	23,9	112	2950	385
	BC	40-60	6,3	5,4	159	411	430	7,7	12,5	6,9	0,7	6,0	0,02	0,02	<0,02	<0,001	0,036	98	10,4	56	60	22,9	116	3160	474
V	A ₀	0-5	4,8	4,1	197	387	416	73,6	14,0	6,1	1,2	1,1	0,29	0,08	3,48	0,053	0,052	46	8,7	22	32	23,2	18	296	146
	A ₁ (A ₂)	10-15	4,8	4,4	140	383	477	37,2	16,8	2,3	0,1	0,1	0,08	0,08	1,50	0,011	0,027	18	9,8	26	33	26,2	21	283	164
	B	25-35	5,0	4,7	115	461	424	40,6	19,7	1,8	0,2	0,1	0,07	0,09	0,86	0,012	0,013	28	10,6	25	36	21,7	20	244	176
VI	A ₁	0-15	4,8	4,2	221	361	418	59,5	14,0	5,3	1,2	2,7	0,17	0,05	1,59	0,037	0,057	79	12,0	45	31	7,7	24	677	269
	B	20-35	4,9	4,2	175	341	484	35,8	16,3	3,6	0,4	1,4	0,07	0,03	1,49	0,025	0,018	54	12,7	50	34	7,4	29	806	311
	BC	40-55	5,2	4,4	130	331	539	16,2	19,0	2,4	0,2	0,8	0,06	0,03	0,88	0,019	0,009	49	11,3	63	38	6,0	43	722	502
VII	A ₁	0-15	4,7	4,2	212	336	452	70,5	13,6	9,0	3,2	3,9	0,25	0,03	1,41	0,023	0,078	83	8,6	32	31	10,5	29	611	279
	B	15-30	5,2	4,4	151	339	510	33,3	16,0	3,5	0,5	1,3	0,09	0,01	1,25	0,014	0,014	55	9,0	36	32	11,8	31	518	322
	BC	35-55	5,1	4,5	103	329	568	16,4	16,9	2,1	0,2	0,6	0,03	<0,01	0,79	0,001	0,006	42	7,9	33	38	14,7	38	414	388
VIII	A ₁	0-15	5,4	4,8	214	367	419	43,5	14,5	7,0	1,3	5,0	0,10	0,03	0,29	0,082	0,034	94	10,0	40	39	15,0	43	1010	312
	B	15-30	5,5	4,8	192	390	418	21,6	15,1	5,5	0,8	3,7	0,08	0,02	0,25	0,006	0,022	83	10,2	45	42	15,7	54	844	354
	C	35-45	6,1	5,5	151	374	475	10,8	16,0	13,1	0,9	11,3	0,04	0,05	<0,02	<0,001	0,019	94	4,1	130	81	5,5	165	2400	1550
IX	A ₁	0-20	6,0	5,6	161	517	322	79,5	12,2	23,7	5,9	16,2	0,24	0,08	<0,02	<0,001	0,159	95	23,4	52	86	11,7	173	2350	682
	B	40-60	6,8	6,2	220	394	384	20,4	13,7	22,9	4,4	17,1	0,09	0,04	<0,02	0,006	0,039	95	5,2	142	101	3,6	147	2380	2270
	C	40-60	7,5	ND	137	254	609	10,4	14,9	ND							25,0	159	92	ND	ND	2490	2507		
X	A ₁	0-15	5,1	4,5	182	502	502	66,0	12,9	6,8	2,5	2,3	0,53	0,06	1,11	0,021	0,077	81	6,0	17	27	28,2	17	273	125
	B	20-30	5,1	4,4	174	473	473	42,3	15,1	3,8	0,6	0,8	0,20	0,04	1,85	0,023	0,019	45	5,9	18	29	28,7	18	308	132

1.1.3. Végétation

Le site ultramafique de Bergenbach est une zone de pâturage permanent. Plus de 30 espèces végétales y ont été identifiées (Annexe 3, Norini 2003 ; Massoura, 2004), dont l'espèce hyperaccumulatrice de Ni *Th. caerulescens*.

1.2. Méthodes

1.2.1. Distribution et teneur du Ni dans les tissus de *Th. caerulescens*

La distribution de l'espèce *Th. caerulescens* le long de la toposéquence était telle que le nombre d'individus observés au niveau des différents sites était :

- (i) **élevé** sur les sites I, III et X ;
- (ii) **faible** sur les sites IX et VII ;
- (iii) **très faible** sur les sites VI et VIII.

Les échantillons végétaux de *Th. caerulescens* ont été collectés en avril 2006 le long de la toposéquence au niveau des différents sites d'échantillonnage des sols (excepté sur les sites IV et V, sur lesquels l'hyperaccumulateur était absent, et sur le site II -échantillons non prélevés-). Les individus collectés sur un même site ont été rassemblés et homogénéisés avant d'être minéralisés. Les parties aériennes et les racines des végétaux ont été analysées séparément. Le dosage du Ni dans les échantillons minéralisés a été effectué par ICP-AES (Chapitre II).

1.2.2. Caractérisation de la disponibilité du Ni dans les sols

Différentes analyses ont été réalisées sur les échantillons de terre provenant des horizons de surface A₁ des sols de la toposéquence (*i.e.* dans la zone de sol où les racines des végétaux sont présentes) :

- les teneurs en Ni hydrosoluble et phytodisponible ont été mesurées après **extractions du Ni à l'eau et au DTPA-TEA** (Chapitre II) ;
- les **CEI** (Chapitre II) ont permis d'estimer la distribution du Ni entre les différents compartiments de Ni plus ou moins échangeables des sols.

1.2.3. Extractions à l'oxalate et au réactif Citrate-Dithionite-Bicarbonate

Des extractions à l'oxalate (méthode TAMM) et au réactif Citrate-Dithionite-Bicarbonate, CBD (méthode Mehra Jackson) ont été effectuées sur les échantillons de sol afin d'extraire les éléments contenus dans les oxydes (Annexe 4). Celles-ci ont permis de caractériser les différentes formes du fer dans les sols et d'estimer la distribution du Ni dans les différentes phases minérales silicatées et oxydées. Les extractions ainsi que le dosage du Ni et du Fe ont été effectués au Laboratoire d'Analyses de Sols de l'INRA d'Arras selon des méthodes normalisées.

1.2.4. Etudes minéralogiques et spectroscopiques

Des analyses en **DRX** (chapitre II) ont été réalisées sur les échantillons de terre prélevés dans les horizons de surface des sols VI et IX de la toposéquence afin d'identifier les phases minérales présentes. Des analyses plus fines ont été effectuées en **MET-EDX** (Chapitre II) sur ces mêmes échantillons afin d'identifier les phases minérales porteuses de Ni.

2. Résultats

2.1. Concentration en Ni dans les plantes

La majorité des espèces végétales qui se développent naturellement sur l'ensemble du site ultramafique de Bergenbach ne contiennent que de faibles quantités de métal dans leurs tissus ($\leq 40 \text{ mg kg}^{-1}$) (Figure 11, Norini 2003 ; Massoura, 2004). *Th. caerulescens* est l'unique espèce hyperaccumulatrice de Ni ayant été identifiée sur le site (Tableau 3). Mis à part *Th. caerulescens*, *T. pratense* est l'espèce qui contient la quantité de Ni la plus élevée dans ses tissus (environ 160 mg kg^{-1}).

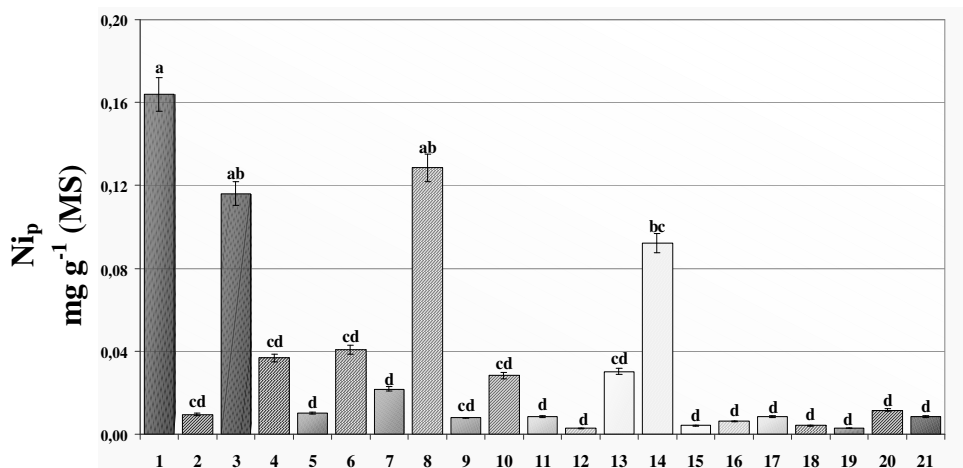


Figure 11. Concentration en Ni dans les tissus des plantes collectées sur le site ultramafique de Bergenbach (Norini, 2003 ; Massoura, 2004) - (MS=matière sèche). (1 : *T. pratense*, 2 : *P. erecta*, 3 : *E. cyparissias*, 4 : *S. vulgaris*, 5 : *R. acetosa*, 6 : *R. alectorolophus*, 7 : *S. pratensis*, 8 : *P. aquilium*, 9 : *P. setiferum*, 10 : *L. vulgare*, 11 : *C. sagittale*, 12 : *P. amarella*, 13 : *V. sepium*, 14 : *M. athamanticum*, 15 : *H. nummularium*, 16 : *T. scorodonia*, 17 : *Galium* sp, 18 : *R.s bulbosus*, 19 : *L. corniculatus*, 20 : *L.s vernus*, 21 : *B. media*).

Les teneurs en Ni dans les parties aériennes de *Th. caerulea* peuvent varier d'un facteur 10 en fonction des sites de prélèvement (Tableau 3). Elles atteignent jusqu'à 3050 mg kg⁻¹(MS) sur le site IX. Sur l'ensemble des sites, les teneurs en Ni dans les parties aériennes sont plus de deux fois supérieures par rapport à celles mesurées dans les racines.

Tableau 3. Concentration en Ni (Ni_p) dans les tissus de *Th. caerulea* qui se sont développés sur sols ultramafiques du site de Bergenbach - (MS=matière sèche).

Sites de prélèvement	Racines	Parties aériennes	PA/R
Ni_p (mg kg ⁻¹ MS)			
I	-	832,72	-
III	675,58	2287,90	3,39
VI	-	467,40	-
VII	-	395,65	-
VIII	84,49	216,22	2,56
IX	627,76	3056,78	4,87
X	131,57	530,70	4,03

2.2. Disponibilité du Ni dans les sols ultramafiques du site de Bergenbach

2.2.1. Compartiments échangeables du Ni

Dans les horizons de surface, la fraction de Ni instantanément échangeable (E_{0-1min}) représente moins de 5 % du Ni total du sol (Ni_T), excepté pour le sol III (7 %). La fraction de Ni échangeable entre 0 et 1 an ($E_{(0-1an)}$) (représentée par l'ensemble des compartiments échangeables entre 0 et 1 min) mesurée dans les horizons de surface de l'ensemble des sols représente plus de 40 % de Ni_T (Figure 12). Dans les sols III et IX (cambisols hypermagnésiques hypereutriques), $E_{(0-1an)}$ représente respectivement 78 % et 80 % de la totalité du Ni présent dans le sol.

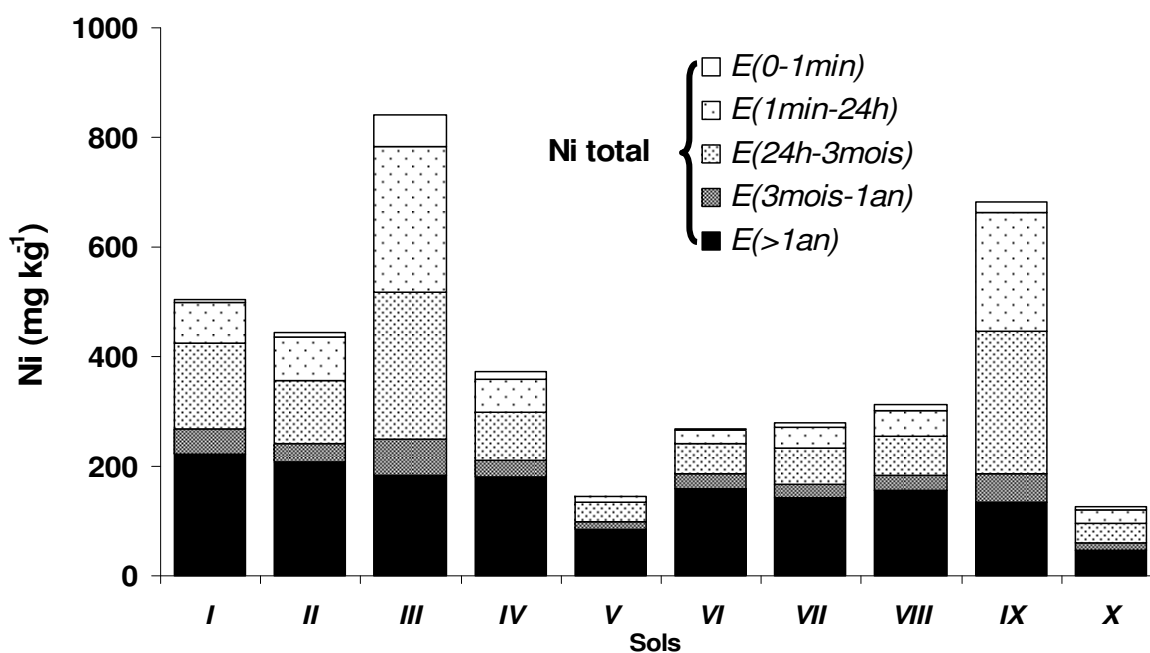


Figure 12. Caractérisation des compartiments échangeables du Ni dans les horizons de surface des sols de la toposéquence du site ultramafique de Bergenbach.

2.2.2. Ni hydrosoluble et Ni extractible au DTPA-TEA

Les concentrations du Ni hydrosoluble (C_{Ni}) les plus élevées ont été mesurées pour les sols III (201 $\mu\text{g l}^{-1}$) et IX (122 $\mu\text{g l}^{-1}$) (Figure 13). Les sols III et IX sont également caractérisés par une forte phytodisponibilité du Ni par rapport aux autres sols de la toposéquence. Les teneurs du Ni extrait au DTPA-TEA ($Ni_{DTPA-TEA}$) représentent plus de 10 % du Ni total des sols.

$Ni_{DTPA-TEA}$ est fortement corrélé à la fraction de Ni échangeable entre 0 et 24h ($E_{(0-24h)}$) ($R^2=0,95$ par régression linéaire, non présenté). Les teneurs du Ni hydrosoluble mesurées dans les différents sols de la toposéquence sont proportionnelles aux valeurs de $Ni_{DTPA-TEA}$ ($R^2=0,83$ par régression linéaire, non présenté), ainsi qu'à celles de $E_{(0-24h)}$ ($R^2=0,94$ par régression linéaire, non présenté).

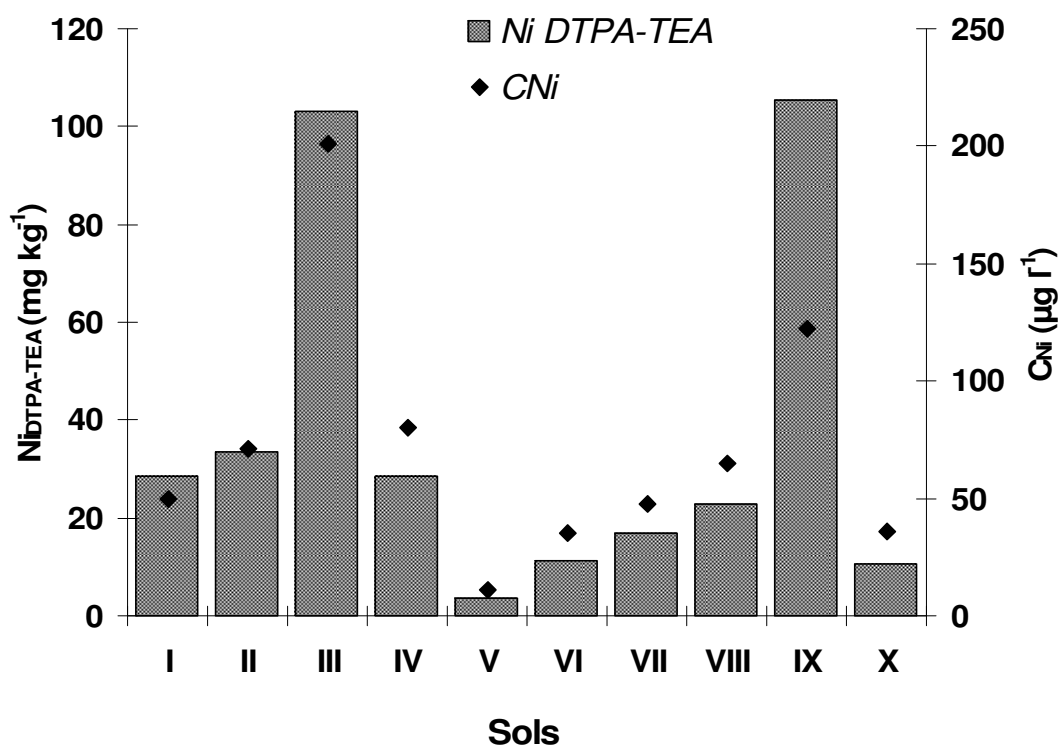


Figure 13. Teneur du Ni en solution (C_{Ni}) et du Ni extrait au DTPA-TEA ($Ni_{DTPA-TEA}$) mesurées dans les horizons de surface des sols de la toposéquence du site ultramafique de Bergenbach.

2.2.3. Relation entre la disponibilité du Ni dans le sol et son prélèvement par *Th. caerulescens*

Les teneurs en Ni dans les parties aériennes de *Th. caerulescens* sont hautement corrélées aux teneurs du Ni extrait au DTPA-TEA, *i.e.* à l'estimation chimique du Ni phytodisponible, mesurées dans les sols de la toposéquence ($R^2=0,93$, Figure 14). Lorsque $Ni_{DTPA-TEA}$ est inférieur à 40 mg kg⁻¹, *Th. caerulescens* accumule moins de 1000 mg kg⁻¹ (MS) de Ni dans ses parties aériennes. En revanche, lorsque $Ni_{DTPA-TEA}$ est supérieur à 100 mg kg⁻¹, la plante accumule plus de 2000 mg kg⁻¹(MS) de Ni dans ses tissus.

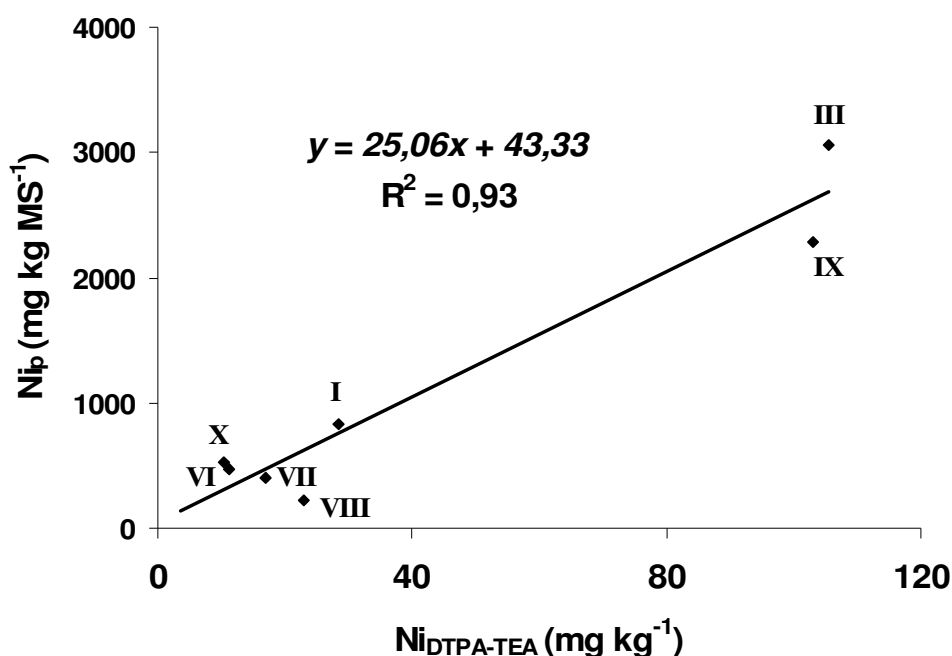


Figure 14. Relation entre les teneurs du Ni extrait au DTPA-TEA ($Ni_{DTPA-TEA}$) et les teneurs en Ni dans les parties aériennes de *Th. caerulescens* (Ni_p) - (MS=matière sèche).

2.2.4. Facteurs physico-chimiques liés à la phytodisponibilité du Ni dans les sols

Une analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée afin d'analyser les corrélations entre les principaux facteurs physico-chimiques et la disponibilité du Ni des horizons de surface des sols (Figure 15). F1 (axe horizontal) est le facteur principal expliquant plus de 62 % de l'ensemble des paramètres. Dans les horizons de surface des sols de la toposéquence, le Ni extractible au DTPA-TEA ($Ni_{DTPA-TEA}$) est fortement lié à la CEC, au pH, ainsi qu'à la fraction limoneuse des sols. En revanche, $Ni_{DTPA-TEA}$ semble indépendant des teneurs en carbone organique et en argile des sols, et inversement corrélé à la fraction sableuse.

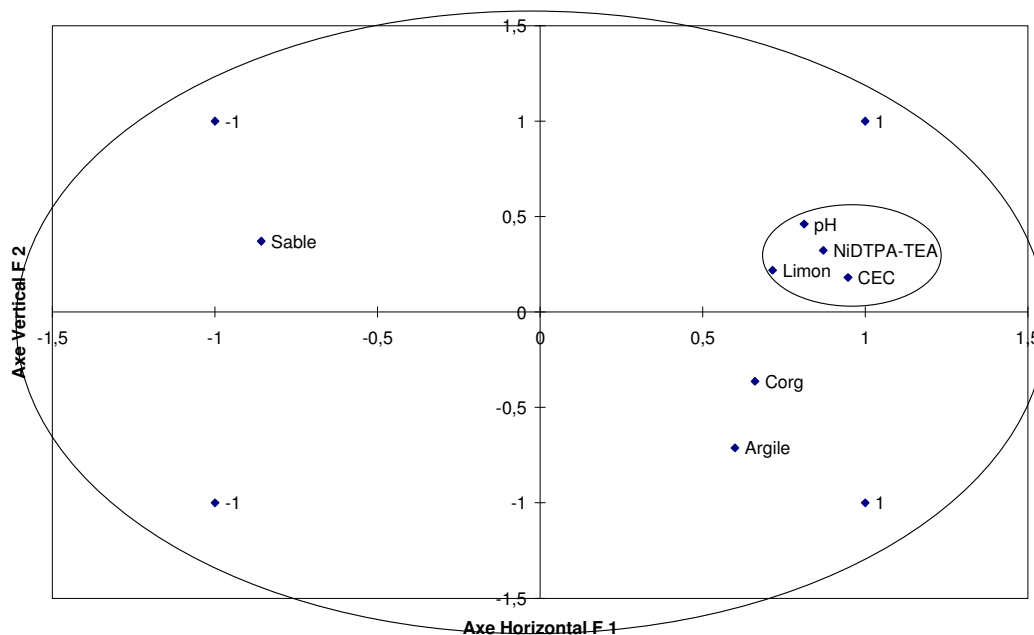


Figure 15. Analyse en composantes principales sur les principales propriétés chimiques et la phytodisponibilité du Ni dans les horizons de surface des sols du site ultramafique de Bergenbach.

Le pH normalisé des horizons de surface de l'ensemble des sols varie entre 4,7 (sol VII) et 6,0 (sol IX) (Tableau 2). Le pH est plus élevé dans les sols à forte disponibilité du Ni *i.e.* les sols III et IX. La relation entre le pH et les teneurs du Ni extrait au DTPA-TEA peut s'exprimer sous forme exponentielle (Figure 16), telle que :

$$Ni_{DTPA-TEA} = 7,05.10^{-4} e^{1,96pH} \quad [5]$$

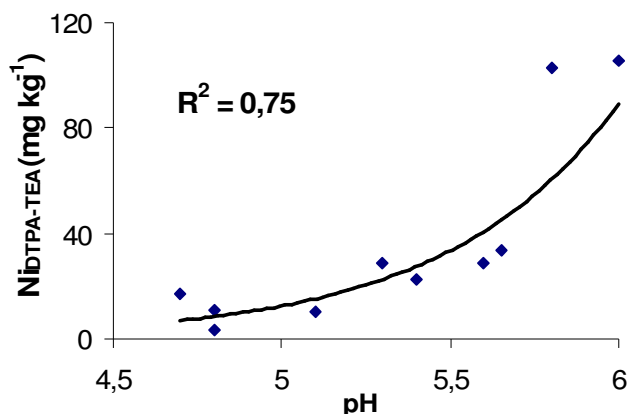


Figure 16. Relation entre le pH du sol et les teneurs du Ni extrait au DTPA-TEA.

La CEC des horizons de surface des sols est hautement corrélée aux teneurs du Ni extrait au DTPA-TEA (Figure 17). La relation entre la CEC et le Ni extrait au DTPA-TEA peut s'exprimer selon une fonction puissance d'équation :

$$Ni_{DTPA-TEA} = 0,97 CEC^{1,46} \quad [6]$$

Les sols III et IX, caractérisés par une disponibilité en Ni élevée, sont ceux qui présentent les CEC les plus élevées.

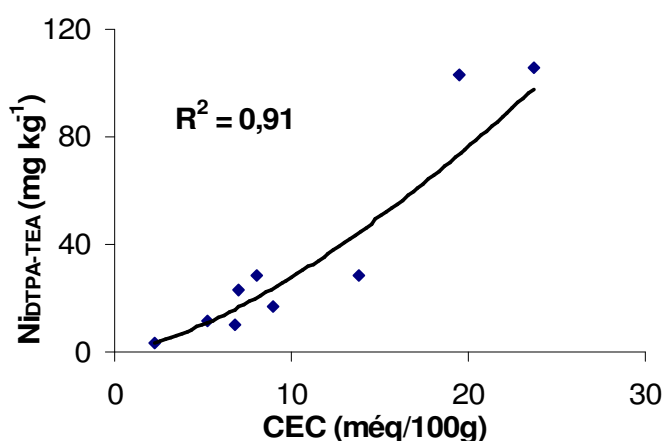


Figure 17. Relation entre la CEC et la teneur du Ni extrait au DTPA-TEA.

2.3. Éléments liés au Ni dans les sols

Une ACP a été effectuée sur les éléments totaux et disponibles mesurés dans les horizons de surface des sols de la toposéquence (Figure 18). F1 (axe horizontal) est le facteur principal expliquant plus de 68 % de l'ensemble des paramètres. Le Ni est corrélé linéairement au cobalt (Co) ($R^2=0,94$), au chrome (Cr) ($R^2=0,88$), au Fe ($R^2=0,96$) et au Mg ($R^2=0,62$) (Annexe 5). En revanche, le Ni n'est pas significativement corrélé aux teneurs du Ca et, est inversement corrélé aux teneurs du K. Les formes disponibles de Ni ($Ni_{DTPA-TEA}$), de Fe (Fe_{Tamm}) et de Mg ($Mg_{éch}$) sont fortement liées aux teneurs totales des éléments.

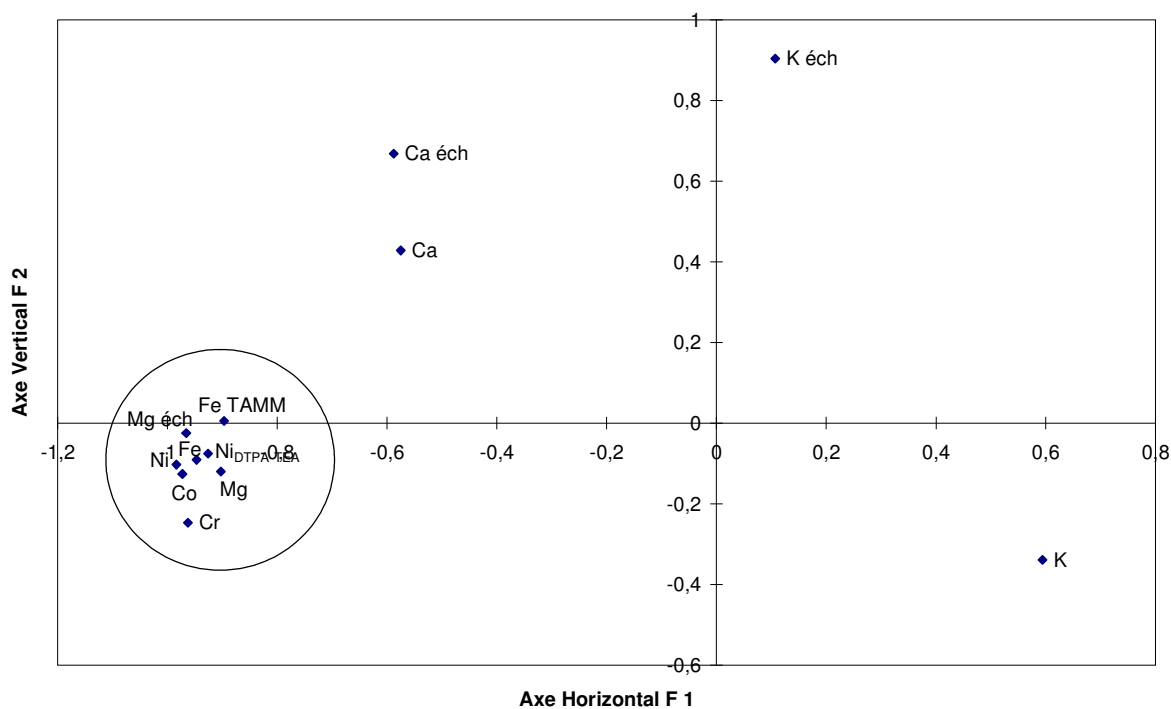


Figure 18. Analyse factorielle en composantes principales réalisée sur les teneurs des éléments totaux et disponibles mesurées dans les horizons de surface des sols du site ultramafique de Bergenbach.

2.4. Contribution des phases minérales porteuses de Ni à la disponibilité du Ni

2.4.1. Principales phases minérales

La plupart des minéraux présents dans les horizons de surface des sols VI et IX sont communs aux deux sols (Tableau 4). En revanche, l'abondance de ces phases minérales varie fortement en fonction du sol considéré : l'horizon de surface du sol VI contient majoritairement du quartz et des feldspaths ; alors que celui du sol IX contient majoritairement des minéraux argileux (chlorite, serpentine, talc). Les phases minoritaires représentent environ 5 % de la totalité des phases contenues dans les échantillons.

Les minéraux argileux présents dans le sol IX sont des minéraux primaires hérités de la roche mère serpentinisée (*i.e.* harzburgite serpentinisée). En revanche, le quartz, la kaolinite et les feldspaths sont des minéraux qui ne sont pas spécifiques des serpentinites. Ceux-ci proviendraient de l'altération des dépôts quaternaires (issus de l'altération des gneiss sus-jacents) présents en zones éparses au niveau du site.

Tableau 4. Identification et abondance des phases minérales présentes dans les sols VI et IX.

	Sol VI	Sol IX
<i>Chlorite</i>	+	+++
<i>Serpentine</i>	(+)	++
<i>Talc</i>	+	+
<i>Amphibole</i>	+	
<i>Kaolinite</i>	(+)	(+)
<i>Quartz</i>	+++	(+)
<i>Feldspath</i>	++	
<i>Goethite</i>	(+)	

Phase minérale : +++ majoritaire, ++ abondante, + commune, (+) en traces.

2.4.2. Identification des phases minérales porteuses de Ni

Dans l'horizon de surface du sol VI, le Ni est fortement concentré au niveau des goethites (Tableau 5). En revanche, les phyllosilicates (chlorites, talcs) contiennent peu de Ni.

Dans l'horizon de surface du sol IX, le Ni est principalement associé aux phyllosilicates, et notamment aux chlorites (0,5 %).

Les minéraux non spécifiques des serpentinites, majoritaires dans l'horizon de surface du sol VI, ne sont pas porteurs de Ni.

Tableau 5. Identification des phases porteuses de Ni (MET-EDX) présentes dans les sols VI et IX et teneur en Ni dans les minéraux (en pourcentage atomique, %).

	<i>Phases minérales porteuses de Ni</i>	<i>Phases minérales non porteuses de Ni</i>
Sol VI	Goethite (4,3 %) [8]	Quartz [1]
	Chlorite (0,04 %) [3]	Feldspath [1]
	Talc (0,01 %) [8]	Kaolinite [1]
Sol IX	Chlorite (0,5 %) [7]	Quartz [5]
	Serpentine (0,2 %) [7]	Kaolinite [5]
	Talc (0,2 %) [7]	

[n]: nombre d'analyses effectuées par microsonde EDX.

2.4.3. Distribution du Fe et du Ni dans les sols

Dans les sols de la toposéquence du site de Bergenbach, le Ni est hautement corrélé au Fe ($R^2=0,96$; annexe 5). De ce fait, il apparaît important de connaître sous quelles formes le fer est présent dans les sols. La fraction de fer libre dans les horizons de surface des sols VI et IX représente plus de la moitié du fer total (soit 56 % et 58 % respectivement) (Figure 19).

Dans les deux sols, le fer libre est majoritairement sous forme d'oxydes et/ou d'oxyhydroxydes cristallisés. La fraction de fer sous forme ionique, complexée ou amorphe dans les horizons de surface des sols VI et IX représente respectivement 25 % et 20% du Fe total. D'après les analyses chimiques effectuées sur les échantillons de sol (Tableau 2), la fraction de Fe échangeable est très faible ; elle représente moins de 1 % de la CEC.

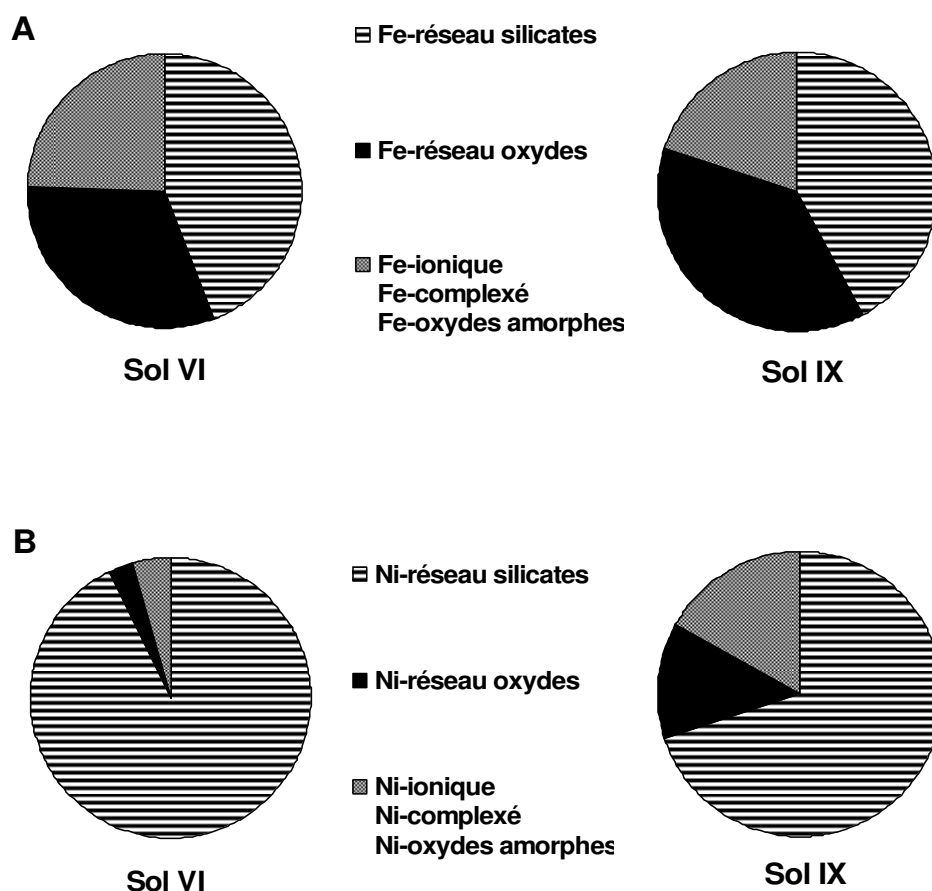


Figure 19. Distribution du Fe (A) et du Ni (B) au sein des différentes phases minérales présentes dans les horizons de surface des sols VI et IX.

Dans les horizons de surface des deux sols, le Ni est majoritairement piégé dans le réseau cristallin des silicates, et se présente donc sous forme non phytodisponible (Figure 19). Une petite partie du Ni total du sol serait située dans le réseau cristallin d'oxyhydroxydes et/ou d'oxydes de Fe (2,8 % pour le sol VI et 13,1 % pour le sol IX). Les teneurs du Ni extrait à l'oxalate (12,3 mg kg⁻¹ pour le sol VI, et 114,7 mg kg⁻¹ pour le sol IX) concordent avec celles obtenues pour les extractions du Ni au DTPA-TEA (10,9 mg kg⁻¹ pour le sol VI, et 92,2 mg kg⁻¹ pour le sol IX; Figure 13). Ainsi, la fraction de Ni présent sous forme ionique ou complexée, ou encore associé aux oxydes amorphes correspondrait approximativement à la fraction de Ni phytodisponible. Cette fraction est nettement plus importante dans l'horizon de surface du sol IX (16,8 % du Ni total) que dans celui du sol VI (4,6 % du Ni total).

3. Discussion

L'étude minéralogique et chimique des horizons de surface des sols serpentinisés du site ultramafique de Bergenbach nous a permis de montrer que (i) la nature, (ii) l'abondance des minéraux nickélifères et (iii) la spéciation du Ni au sein des minéraux, étaient trois facteurs fondamentaux contrôlant la disponibilité du Ni dans le milieu.

Le Ni est préférentiellement localisé dans le réseau cristallin des minéraux ; principalement dans le réseau de phyllosilicates primaires (Chlorite, serpentine, talc), et dans une moindre mesure dans le réseau d'oxyhydroxydes de Fe secondaires. Les phyllosilicates, et en particulier les chlorites, sont les phases minérales porteuses de Ni majoritaires dans les sols. La présence massive de ces minéraux dans les cambisols hypermagnésiques hypereutriques du site de Bergenbach (par rapport au cambisol magnésique eutrique) serait à l'origine des fortes teneurs du Ni total.

Les fortes teneurs du Mg échangeable, du Fe libre et du Ni phytodisponible dans de tels sols s'expliqueraient par la dissolution des phases silicatées facilement altérables (Wenzel *et al.*, 2003). Par exemple, la dissolution des couches brucitiques dans la structure des chlorites peut induire la solubilisation de fortes quantités de Mg, de Fe et de Ni (Duchaufour, 1995). Cette réaction d'altération pourrait alors conduire à la transformation progressive des chlorites vers des vermiculites (Lee *et al.*, 2003). Dans notre étude, la présence de vermiculite dans les horizons de surface des sols VI et IX n'a pas été mise en évidence. La libération de Mg en solution conséquente à la dissolution des phyllosilicates expliquerait également les pH plus élevés mesurés dans les cambisols hypermagnésiques hypereutriques et pourrait ainsi expliquer la corrélation positive entre le pH et la quantité de Ni disponible.

Dans l'ensemble des sols ultramafiques du site de Bergenbach, les teneurs en Fe total sont en étroite relation avec les teneurs en Ni total. Toutefois, le Fe et le Ni ne sont pas répartis de la même manière au sein des phases minérales: le Fe se présente préférentiellement sous forme de Fe libre, alors que le Ni est préférentiellement localisé dans le réseau cristallin des silicates. Néanmoins, 30 % du Ni sont associés aux formes du Fe libre dans l'horizon de surface du cambisol hypermagnésique hypereutrique (sol IX).

L'altération de minéraux primaires silicatés ferromagnésiens à fortes teneurs en Ni (hérités de la roche mère) conduit à la libération d'importantes quantités de Mg, de Fe et de Ni en solution. Une partie du Mg et du Ni pourrait alors migrer dans les horizons plus profonds (enrichissement en Mg et en Ni dans les horizons B et C ; Tableau 2). Le Ni n'ayant pas migré co-précipiterait avec le Fe et conduirait à la néoformation de phases minérales

oxydées nickélifères (Ni > 4 %).

Le prélèvement et l'accumulation du Ni par l'espèce hyperaccumulatrice *Th. caerulescens* est relative à la teneur en Ni disponible des sols, plus qu'à la teneur du Ni en solution (contrairement aux espèces non accumulatrices). Ainsi, plus la quantité de Ni extractible au DTPA-TEA est élevée dans les sols, plus la plante hyperaccumulatrice va concentrer le Ni dans ses parties aériennes. L'estimation chimique de la teneur en Ni phytodisponible correspond globalement à la fraction de Ni présente sous formes ioniques, complexées ou dans des précipités amorphes. Les hyperaccumulateurs auraient par conséquent accès au Ni initialement immobilisé dans les précipités amorphes. Cette fraction ne représente qu'une faible partie du Ni total des sols ultramafiques (< 20 %).

La distribution et l'abondance des individus de *Th. caerulescens* sur le site ultramafique de Bergenbach ne semblent pas dépendre de la teneur en Ni total ou phytodisponible du sol. En revanche, nous avons pu observer que l'hyperaccumulateur abondait au niveau d'une zone où la végétation avait récemment été brûlée. Aussi, l'hyperaccumulateur *Th. caerulescens* pourrait se développer préférentiellement sur des sols où il est peu en concurrence avec les autres espèces végétales.

4. Conclusion

La teneur totale et la phytodisponibilité du Ni dans les sols sont directement liées à la nature et à l'abondance des phases minérales porteuses de Ni. Dans les sols ultramafiques serpentinisés du site de Bergenbach, les phases minérales porteuses de Ni sont essentiellement des phyllosilicates (Chlorite, serpentine, talc). Leur abondance dépend directement de la composition de la roche mère (harzburgite serpentinisée). L'altération de ces minéraux argileux conduit à la mobilisation de Ni et de Fe, et à la néoformation d'oxydes de Fe plus ou moins bien cristallisés dans lesquels le Ni peut être incorporé. L'accumulation du Ni dans les parties aériennes des hyperaccumulateurs dépend directement de la spéciation du Ni dans les sols. Les formes de Ni phytodisponible correspondent aux formes ioniques, complexées et aux précipités amorphes. En revanche, le Ni présent dans le réseau cristallin des minéraux n'est pas directement disponible.

Une analyse des phases minérales nickélifères en spectroscopie d'absorption des rayons X (EXAFS) serait toutefois nécessaire afin de caractériser de manière précise (i) la spéciation du Ni dans les minéraux, et (ii) la contribution des différentes formes de Ni relative à la disponibilité du métal dans les sols.

Chapitre IV

Spéciation et disponibilité du nickel dans trois minéraux modèles porteurs de nickel

Nous avons vu dans le chapitre précédent que la disponibilité du Ni dans les sols était fortement contrôlée par (i) la nature, (ii) l'abondance des minéraux nickélifères et (iii) la spéciation du Ni au sein des minéraux.

L'objectif de ce chapitre est de caractériser de manière précise la contribution de plusieurs phases minérales communes des sols ultramafiques à la disponibilité du Ni ; cela en fonction de leur propriétés structurales et chimiques. Trois minéraux modèles de nature différente (phyllosilicates, oxyhydroxydes) ont ainsi été étudiés et caractérisés. L'altération des minéraux a été testée, d'une part, au travers d'une expérimentation réalisée en conditions naturelles, afin d'observer le comportement des phases minérales nickélifères au sein des sols ultramafiques et, d'autre part, au travers d'une expérimentation en système contrôlé (dispositif de colonnes lysimétriques) qui nous a permis de quantifier le taux d'altération des minéraux.

1. Matériels et méthodes

1.1. Caractérisations des minéraux porteurs de nickel

1.1.1. Matériels

Trois minéraux modèles porteurs de Ni ont été étudiés : le **Chrysotile**, la **Smectite**, et la **Goethite**. L'origine et la préparation des minéraux modèles ont été présentées dans le chapitre II. Il s'agit de minéraux communs des sols ultramafiques, souvent porteurs de Ni (Massoura *et al.*, 2006 ; Becquer *et al.*, 2006).

1.1.2. Méthodes

A. Cristallographie, surface spécifique et CEC

Des analyses minéralogiques (DRX) et microscopiques (MET) ont été réalisées sur les trois phases minérales nickélifères. Les formules chimiques de la **Goethite** et de la **Montmorillonite** ont été déterminées à partir de microanalyses EDX (nombre de mesures ≥ 5). La formule chimique du **Chrysotile** a été calculée à partir d'analyses chimiques obtenues par microsonde ionique.

Les mesures de surface spécifique (méthode BET, *i.e.* adsorption de molécule gazeuse d'azote) et de CEC des phases minérales ont été effectuées au LEM (Nancy).

B. Caractérisation de la disponibilité du Ni

Différentes extractions chimiques ont été réalisées sur les mélanges *Minéral-Quartz* utilisés au cours des expérimentations (détails dans Chapitre II):

- Extractions du Ni à l'**eau** (Ni hydrosoluble);
- Extractions du Ni au **DTPA-TEA** (estimation du Ni phytodisponible) ;
- Extractions du Ni à l'**eau régale** ($Ni_{REG} = 80\%$ du Ni total)

1.2. Comportement des minéraux porteurs de nickel en milieu naturel

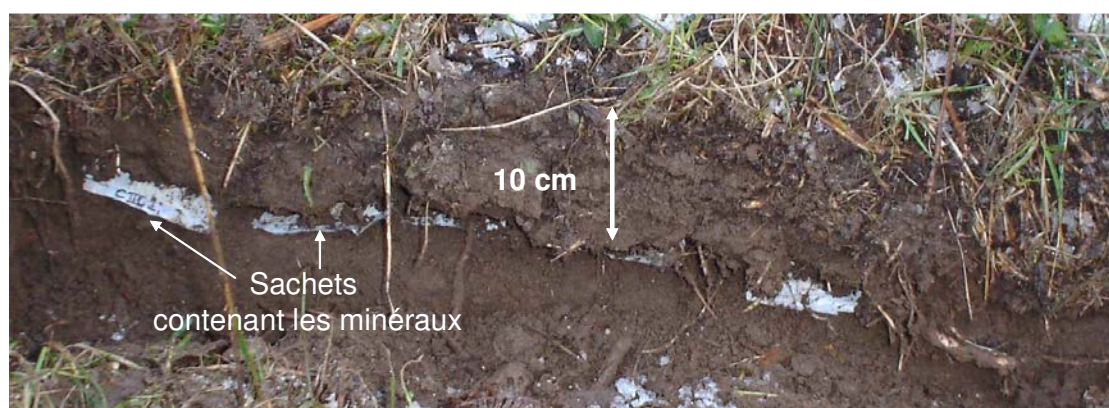
1.2.1. Matériels

Un mélange homogène minéral-Quartz (rapport 1-3) composé de : (i) 5 g de minéral nickélifère (**Chrysotile** ou **Goethite**) ; et (ii) de 15 g de quartz pur calibré à 50-100 μm (Chapitre II) a été introduit dans un sachet en nylon (dimensions : 10x8 cm ; taille des mailles : 1 μm).

1.2.2. Méthodes

A. Mise en place de l'expérimentation

Les sachets contenant les minéraux ont été insérés dans les horizons de surface de trois sols ultramafiques du site de Bergenbach (décembre 2004), à environ 10 cm de profondeur (Photographie 4). Dans chaque sol, Cinq répétitions ont été mises en place pour les deux minéraux.



Photographie 4. Mise en place des sachets contenant le **Chrysotile** ou la **Goethite** dans l'horizon de surface d'un cambisol magnésique eutrique du site ultramafique de Bergenbach (chapitre III).

B. Récolte des échantillons

Les sachets contenant les minéraux porteurs de Ni ont été retirés du sol 15 mois après leur incorporation (*i.e.* en mars 2006). Le contenu des sachets (mélange *Minéral-Quartz*) a été séché à l'air libre, puis décompacté à l'aide d'un pilon dans un mortier en porcelaine.

C. Analyses chimiques

Différentes analyses chimiques ont été réalisées sur le contenu des sachets (*i.e.* sur le mélange *Minéral-Quartz*) afin de caractériser l'évolution de la disponibilité du Ni au sein des minéraux après 15 mois *in-situ* (Chapitre II) :

- Mesures de pH
- Extractions du Ni à l'**eau** (Ni hydrosoluble);
- Extractions du Ni au **DTPA-TEA** (estimation du Ni phytodisponible) ;
- Extractions du Ni à l'**eau régale** ($Ni_{REG} \approx 80\%$ du Ni total)

1.3. Dissolution des minéraux porteurs de nickel

1.3.1. Matériels

Pour effectuer un bilan d'altération des minéraux il était nécessaire de travailler sur des phases minérales pures et homogènes. Aussi, deux minéraux nickélifères ont été testés, la **Goethite** et le **Chrysotile** (Chapitre II).

1.3.2. Méthodes

A. Dispositif d'expérimentation

L'expérimentation a été menée à l'aide d'un dispositif de colonnes lysimétriques relié à une pompe péristaltique (Figure 20). Les colonnes lysimétriques sont des tubes en polyéthylène d'environ 8 cm de hauteur et 3 cm de diamètre. Chaque colonne a été remplie avec (du bas vers le haut): (i) une couche filtrante de *Quartz* (0,5-1mm), (2) un mélange homogène *Minéral+Quartz* (50-100 μm), et (iii) une couche de *Quartz* (0,5-1mm). Chaque colonne contenait au total 3 g de la phase minérale nickélifère (**Chrysotile** ou **Goethite**). Une solution de composition proche de celle d'un sol de serpentine a été apportée tout au long de l'expérimentation par le biais d'une pompe péristaltique reliée à chaque colonne par un tube en silicone (débit d'environ $1\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$). La composition chimique exacte et le pH des solutions correspondant à chaque traitement étudié sont donnés dans le Tableau 6.

La présence de citrate dans les sols acides favoriserait la mise en solution de cations di- et trivalents tels que le Fe, le Mg, le Ca ou l'Al (Jones et Darrah, 1994). Aussi, l'influence de l'acide citrique sur l'altération des minéraux a été testée en ajoutant ou non de l'acide citrique (20 mg l^{-1}) à la solution de base (Tableau 6).

La solution de percolation a été filtrée par une toile en nylon placée à la base de la colonne (maille de $1 \mu\text{m}$), et récupérée dans un flacon inerté en polyéthylène.

Trois répétitions de chaque traitement ont été mises en place.

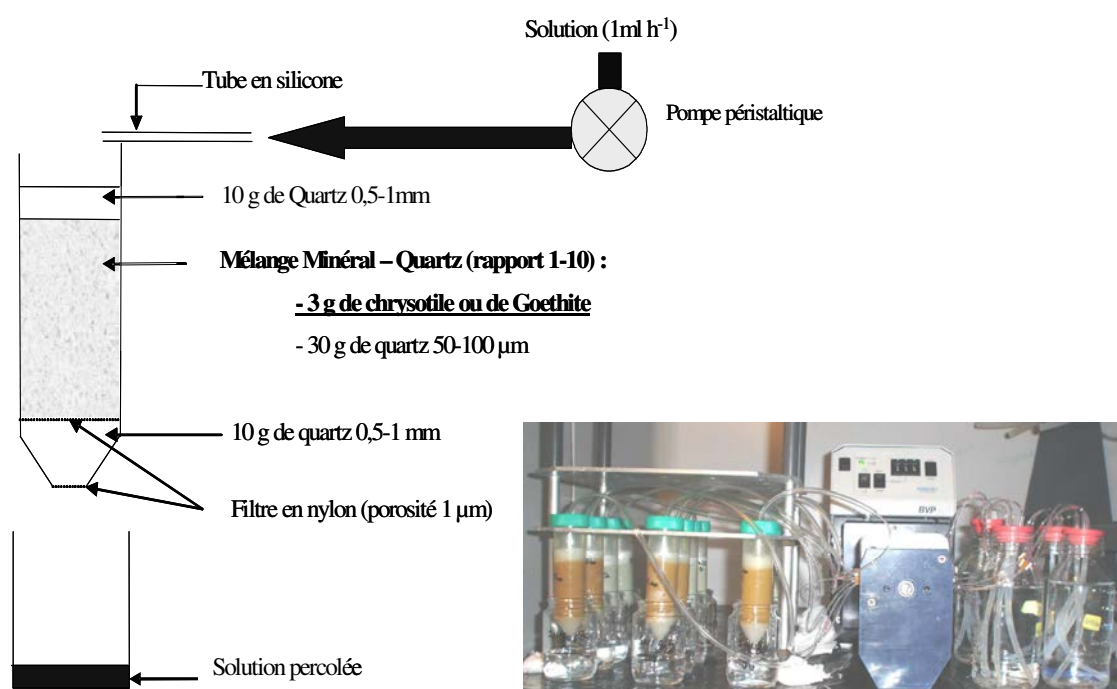


Figure 20. A gauche : schéma d'une colonne lysimétrique ; à droite : photographie du dispositif.

Tableau 6. Composition chimique et pH des solutions apportées au système *Minéral-Quartz*.

			Chrysotile		Goethite		
			Solution	Solution + acide citrique	Solution	Solution + acide citrique	Forme
			A	B	C	D	
Macroéléments							
	mg l ⁻¹	mol l ⁻¹					
Mg	10	4,11.10 ⁻⁴			X	X	MgCl ₂
N	5	3,57.10 ⁻⁴	X	X	X	X	NH ₄ NO ₃
Ca	2,5	6,23.10 ⁻⁵	X	X	X	X	CaSO ₄ . 2H ₂ O
S	2	6,25.10 ⁻⁵	X	X	X	X	
P	1,2	3,87.10 ⁻⁵	X	X	X	X	
K	1,5	3,84.10 ⁻⁵	X	X	X	X	KH ₂ PO ₄
Microéléments							
	µg l ⁻¹	mol l ⁻¹					
Zn	1,0	1,53.10 ⁻⁸	X	X	X	X	ZnSO ₄ .7H ₂ O
Mn	1,0	1,82.10 ⁻⁸	X	X	X	X	MnSO ₄ .H ₂ O
Acide organique							
	mg l ⁻¹	mol l ⁻¹					
Acide citrique	20	1,04.10 ⁻⁴		X		X	C ₆ H ₈ O ₇ . H ₂ O
pH	Unités pH		5,3	3,9	5,6	3,9	

B. Suivi de l'expérimentation

L'expérimentation a été conduite pendant 30 jours dans une chambre de végétation, sous une température de 20 °C et dans l'obscurité permanente. Pour suivre la cinétique de dissolution des minéraux, la solution percolée au travers de chaque colonne a été récoltée 2, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 18, 23, 27 et 30 jours après la mise en place de l'expérimentation.

C. Analyses

Des mesures du pH ainsi que le dosage du Ni, du Fe et du Mg (ICP-AES, SpectrAA 220, chapitre II) ont été effectués sur chaque échantillon récolté (percolat).

D. Calcul du taux de dissolution

Le taux de dissolution du **Chrysotile** a été calculé d'après la formule suivante (Brantley, 2005) :

$$r = \frac{Q * (C_s - C_e)}{V_{Mg} * Sspé * M} \quad [7]$$

Avec : r , le taux de dissolution du minéral (mol m⁻² s⁻¹) ; Q , le débit moyen de la pompe apportant la solution nutritive (l s⁻¹) ; C_s , la concentration du Mg sorti du système (percolat et/ou plante) (mol l⁻¹) ; C_e , la concentration du Mg apporté au système (solution nutritive) (mol l⁻¹) ; v_{Mg} , le coefficient stoechiométrique pour le Mg ; $Sspé$, la surface spécifique du minéral (m² g⁻¹) ; et M la masse totale de minéral dans le système (g).

Le débit exact Q a été calculé pour chaque colonne en fonction du volume total percolé au cours des 30 jours d'expérimentation.

2. Résultats

2.1. Caractérisation des minéraux porteurs de nickel

2.1.1. Cristallochimie, surface spécifique et CEC

La morphologie des particules minérales est un facteur important dans le sens où elle conditionne la surface de contact entre le minéral et la solution du sol.

Le chrysotile se présente sous forme de fibrilles élémentaires creuses mesurant de 3 à 6 μm de longueur (Figure 21 A). La phase minérale majoritaire du minerai à smectite correspond à une Montmorillonite dioctaédrique reconnaissable par son aspect floconneux (Figure 21 B). La goethite de synthèse se présente sous forme de petits cristaux aciculaires mesurant environ 1 μm de longueur (Figure 21 C).

La surface spécifique de la **Smectite** (argile 2:1) est nettement plus élevée par rapport à celles de la **Goethite** et du **Chrysotile** (ces derniers présentant des valeurs du même ordre de grandeur) (Tableau 7). Les échantillons de **Smectite** présentent une microporosité importante par rapport aux deux autres minéraux qui sont constitués essentiellement de mésopores (> 99 %). Toutefois, l'utilisation de la méthode BET induirait une sous-évaluation de la surface spécifique de la **Smectite**, et plus spécifiquement de la surface microporale ; car seule une partie des molécules gazeuses peuvent pénétrer dans les espaces interfoliaires (Santamarina *et al.*, 2002).

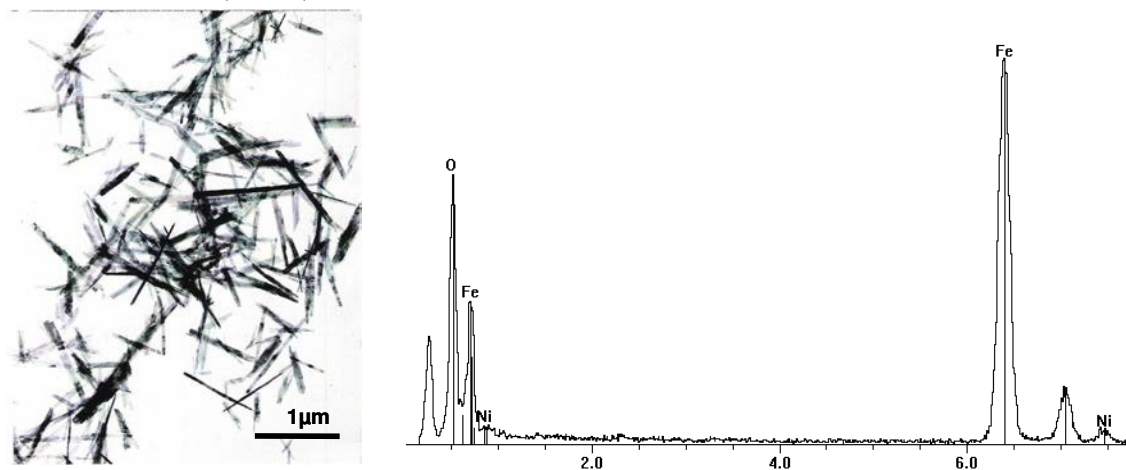
La CEC de la **Smectite** est située dans la gamme des valeurs de CEC données dans la littérature pour les Montmorillonites (*i.e.* entre 80 et 120 $\text{cmol}^+\text{kg}^{-1}$; Zbytniewski *et al.*, 2003).

Tableau 7. Surface spécifique et CEC des minéraux nickélicifères modèles.

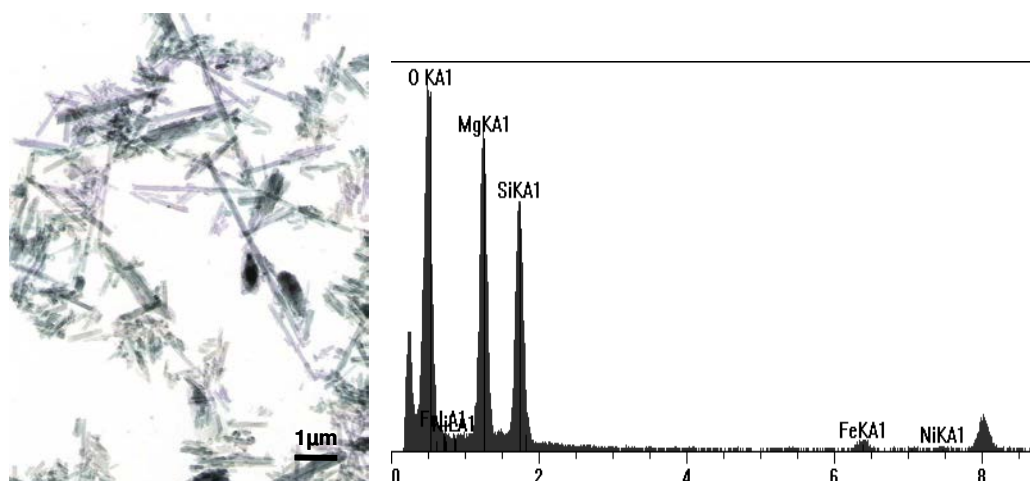
	Chrysotile	Smectite	Goethite
Surface spécifique (BET) ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	34	144	48
Surface microporale ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) Pores < 2nm (Everett, 1972)	0,5	87,8	0,5
Volume mésoporal (%) 2nm < pores < 50 nm (Everett, 1972)	99,77	64,03	99,88
CEC ($\text{cmol}^+ \text{kg}^{-1}$)	n.d.	93,5	n.d.

n.d. : non déterminée.

A. Goethite ($\text{Fe}_{0,98}\text{Ni}_{0,02}$) OOH



B. Chrysotile ($\text{Mg}_{2,755}\text{Fe}_{0,083}\text{Al}_{0,064}\text{Ni}_{0,008}\text{Cr}_{0,005}\text{Ca}_{0,003}$) $\text{Si}_{2,066}\text{O}_{5,000}(\text{OH})_{3,475}$



C. Smectite

Montmorillonite ($\text{Si}_{7,6}\text{Al}_{0,4}$)($\text{Fe}_{2,6}\text{Al}_{0,73}\text{Mg}_{0,5}\text{Ni}_{0,17}$) $\text{O}_{20}(\text{OH})_4\text{Mg}_{0,54}$

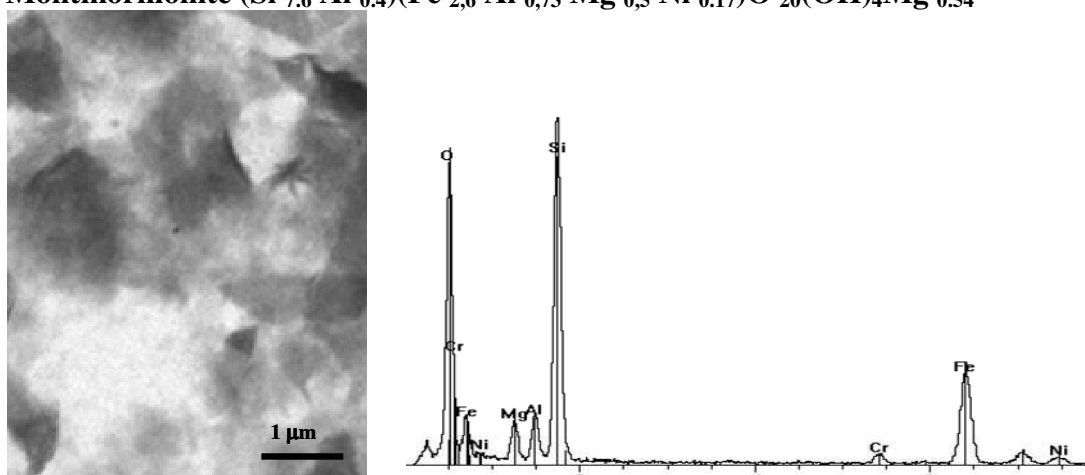


Figure 21. Clichés MET et spectres EDX des trois phases minérales porteuses de Ni : (A) **Goethite**; (B) **Chrysotile** et (C) **Smectite**.

2.1.2. Teneur et disponibilité du Ni au sein des phases minérales

La teneur du Ni mesurée au sein du **Chrysotile** (0,2 %) est nettement plus faible par rapport aux teneurs mesurées dans la **Smectite** et la **Goethite** (> 1%) (Tableau 8). Dans le **Chrysotile** le Ni est peu disponible. En effet, la teneur du Ni hydrosoluble C_{Ni} est quasiment nulle (4 $\mu\text{g l}^{-1}$) et le Ni extrait au DTPA-TEA ne représente que 0,2 % du Ni total. La **Smectite** et la **Goethite** présentent des teneurs de Ni total comparables (1,2 % et 1,5 %, respectivement). Toutefois, la distribution du Ni au sein des différents compartiments de Ni plus ou moins échangeables est très différente en fonction du minéral considéré. La concentration du Ni hydrosoluble est sept fois plus importante pour la **Goethite** (12,7 mg Ni l^{-1}) par rapport à celle mesurée pour la **Smectite** (1,8 mg Ni l^{-1}). A l'inverse des deux autres minéraux, la quantité de Ni hydrosoluble de la **Goethite** rapportée à un kg de **Goethite** (soit 255 mg Ni kg^{-1}) est nettement supérieure à la quantité de Ni extraite au DTPA-TEA pour le même minéral (187 mg Ni kg^{-1}).

Tableau 8. Teneurs du Ni hydrosoluble, du Ni extractible au DTPA-TEA et à l'eau régale, et du Ni total.

	C_{Ni} mg l^{-1}	$Ni_{DTPA-TEA}$	Ni_{REG} mg kg^{-1}	Ni_T
Chrysotile	0,004	3,4	1771	2260
Smectite	1,824	445,1	10821	12450
Goethite	12,736	187,0	12265	15290

La répartition du Ni au sein des différents compartiments de Ni plus ou moins échangeable varie en fonction du minéral considéré (Figure 22). La majorité du Ni au sein du **Chrysotile** se trouve sous forme peu échangeable *i.e.* dans les compartiments $E_{(24h-5mois)}$ et $E_{(5mois-1an)}$. Le Ni de la **Goethite** est présent essentiellement dans 2 compartiments, opposés en terme de disponibilité du Ni : la majeure partie du Ni (98 %) est considérée comme non échangeable ($E_{(>1an)}$), alors qu'une petite fraction du Ni (1,8 %) est instantanément échangeable ($E_{(0-1min)}$). A la différence des deux autres minéraux, une grande proportion du Ni total (13 %) de la **Smectite** est sous forme instantanément échangeable. Et, la fraction de Ni échangeable de la **Smectite** (représentée par l'ensemble des compartiments échangeables entre 0 et 1 an) représente plus de 60 % du Ni total.

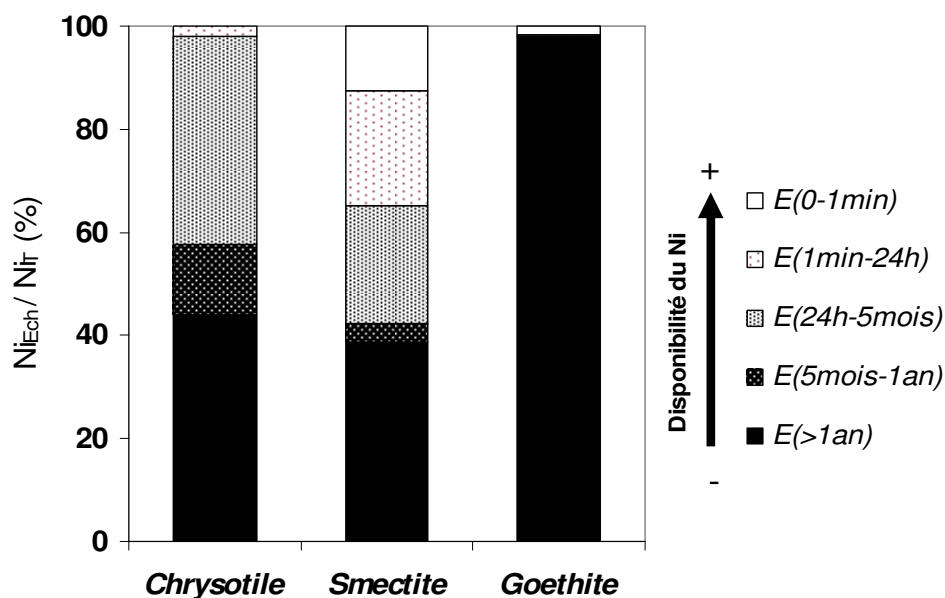


Figure 22. Répartition du Ni dans les compartiments du Ni plus ou moins échangeable (méthode des CEI).

2.2. Comportement des minéraux porteurs de nickel en milieu naturel

2.2.1. Evolution du pH

Le pH des phases minérales après 15 mois d'expérimentation tend vers le pH des horizons de surface des sols ultramafiques du site de Bergenbach (détails des sols dans le Chapitre III, tableau 2) (Figure 23). Le pH de la **Goethite** a augmenté en moyenne de 1,3 unités pH par rapport au pH initial du minéral (3,2). A l'inverse, le pH du **Chrysotile** a diminué en moyenne de 1,8 unités pH par rapport au pH initial (7,6). Les sols jouent alors le rôle de tampon.

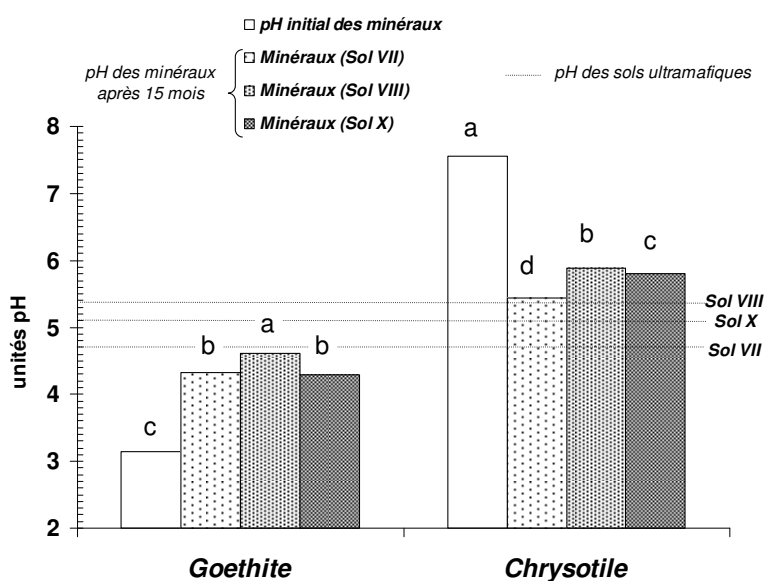


Figure 23. Evolution du pH des minéraux modèles après 15 mois dans les horizons de surface de sols ultramafiques.

2.2.2. Evolution du Ni hydrosoluble

Après 15 mois d'expérimentation, les teneurs du Ni hydrosoluble au sein du **Chrysotile** sont 50 fois plus élevées par rapport à la teneur initiale (Figure 24). La nature du sol ultramafique dans lequel ont été insérés les sachets n'a pas eu d'influence significative sur l'augmentation en Ni hydrosoluble du **Chrysotile**. A l'inverse, les teneurs en Ni hydrosoluble au sein de la **Goethite** après 15 mois d'expérimentation ne représentent plus que quelques pourcents de la teneur initiale (*i.e.* 4% pour le sol VII, 1 % pour le sol VIII, et 2 % pour le sol X). Les teneurs du Ni hydrosoluble des minéraux ayant été insérés dans l'horizon de surface du sol VIII sont significativement plus faibles que celle du sol VII. Les teneurs du Ni mesuré dans les horizons de surface des sols (sol VIII > sol VII >> sol X) ne permettent pas d'expliquer cette différence. Le pH plus élevé du sol VIII pourrait favoriser l'adsorption du Ni^{2+} à la surface du minéral.

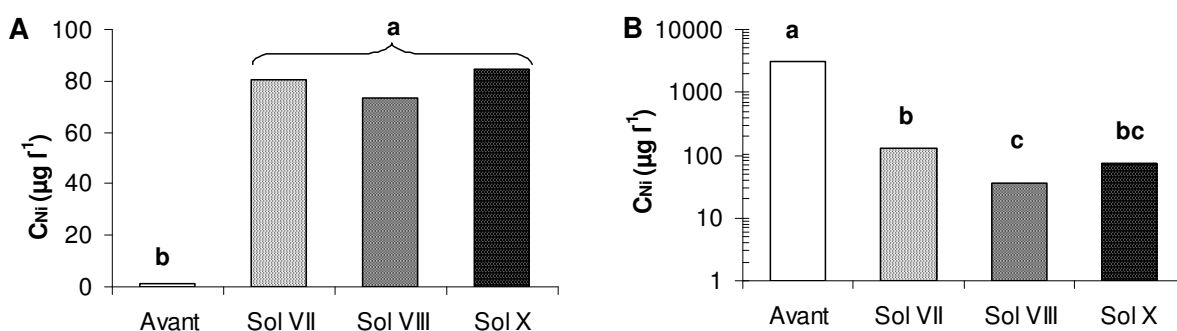


Figure 24. Teneurs du Ni hydrosoluble des minéraux modèles, (A) **Chrysotile** et (B) **Goethite**, avant expérimentation et après 15 mois dans les horizons de surface de sols ultramafiques.

2.2.3. Evolution des teneurs du Ni extractible au DTPA-TEA

Les teneurs du Ni extractible au DTPA-TEA au sein du **Chrysotile** ont triplé après 15 mois d'expérimentation (Figure 25). Cette augmentation est indépendante des teneurs en Ni des horizons de surface des sols ultramafiques ; dans la mesure où (i) la teneur en Ni disponible en Ni dans le sol X est nettement plus faible que celles des sols VII et VIII, et (ii) que le paramètre $Ni_{DTPA-TEA}$ mesuré après 15 mois d'expérimentation est tel que : sol VII < sol VIII et X.

Les teneurs du Ni extractible au DTPA-TEA au sein de la **Goethite** après 15 mois d'expérimentation représentent environ 10 % de la teneur initiale du minéral. La nature du sol ultramafique dans lequel ont été insérés les sachets n'a pas eu d'influence significative sur la diminution de $Ni_{DTPA-TEA}$ au sein de la **Goethite**.

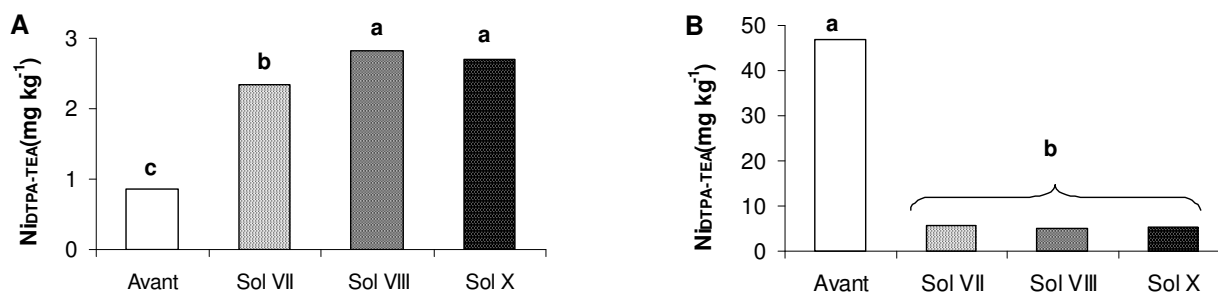


Figure 25. Teneurs du Ni extractible au DTPA-TEA des minéraux modèles, (A) **Chrysotile** et (B) **Goethite**, avant expérimentation et après 15 mois dans les horizons de surface de sols ultramafiques.

2.2.4. Evolution des teneurs du Ni extractible à l'eau régale

Les teneurs du Ni extractible à l'eau régale du **Chrysotile** sont significativement plus élevées dans les sols VIII et X après 15 mois d'expérimentation (Figure 26). En revanche, Ni_{REG} du **Chrysotile** inséré dans le sol VII n'est pas significativement différent de Ni_{REG} du **Chrysotile** avant expérimentation. Les pH plus élevés des minéraux insérés dans les sols VIII et X, ainsi que la présence de Ni en solution dans les sols (de l'ordre de 50 $\mu\text{g l}^{-1}$), ont pu favoriser la sorption du métal sur le minéral. En ce qui concerne la **Goethite**, seuls les minéraux insérés dans le sol VII présentent une diminution significative de Ni_{REG} (- 11 %).

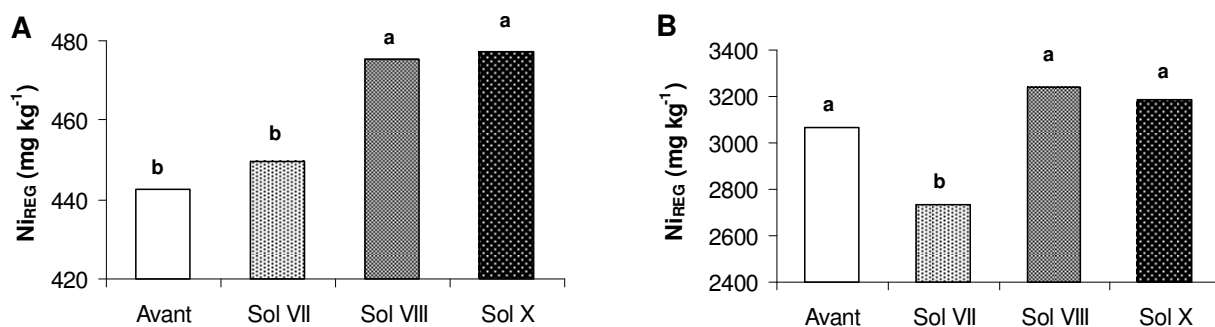


Figure 26. Teneurs du Ni extractible à l'eau régale des minéraux modèles, (A) **Chrysotile** et (B) **Goethite**, avant expérimentation et après 15 mois dans les horizons de surface de sols ultramafiques.

2.3. Dissolution des minéraux porteurs de nickel

La cinétique de dissolution du **Chrysotile**, définie par l'évolution des quantités de Ni et de Mg libérées par le **Chrysotile** au cours du temps, suit une loi puissance (Figure 27), excepté pour les quantités de Ni libérées du **Chrysotile** en présence d'acide citrique. Compte tenu de la difficulté de mesure du Ni percolé, due aux très faibles concentrations du Ni dans les percolats et de la variabilité entre les répétitions, la différence entre les courbes cinétiques de percolation du Ni en présence et en absence d'acide citrique n'est pas significative, même à partir du vingtième jour d'expérimentation. En revanche, les quantités de Mg percolées sont significativement plus élevées en présence d'acide citrique.

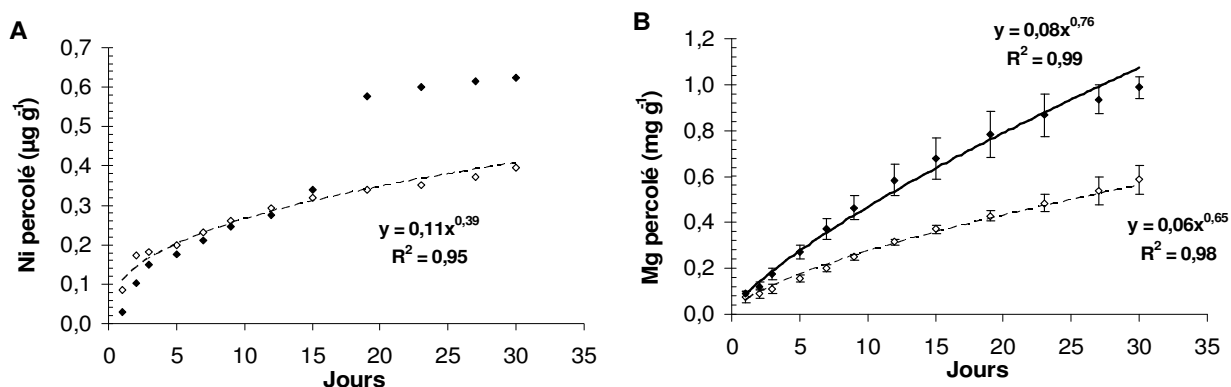


Figure 27. Quantités cumulées de Ni (A) et de Mg (B) libéré par l'altération de 1g de **Chrysotile** au cours de l'expérimentation (\diamond solution \blacklozenge solution + acide citrique 20 mg l^{-1}).

L'évolution des quantités de Ni et de Fe libérées par la **Goethite** au cours du temps suit une loi logarithmique (Figure 28). La quantité de Ni percolée dès le premier jour d'expérimentation représente 70 % de la quantité totale de Ni libérée au terme de l'expérimentation. Après environ cinq jours, les quantités de Ni percolées tendent à se stabiliser. Les courbes cinétiques de percolation du Ni en présence et en absence d'acide citrique évoluent de manière similaire au cours de l'expérimentation. Néanmoins, les quantités de Ni percolées au cours du temps tendent à être plus élevées en présence d'acide citrique.

A l'inverse du Ni, les quantités de Fe percolées au cours de l'expérimentation par l'altération de la **Goethite** sont nettement moins élevées en présence d'acide citrique. Toutefois, compte tenu de la grande variabilité entre les répétitions, les écart-types des quantités moyennes de Fe percolées en présence et en absence d'acide citrique se chevauchent.

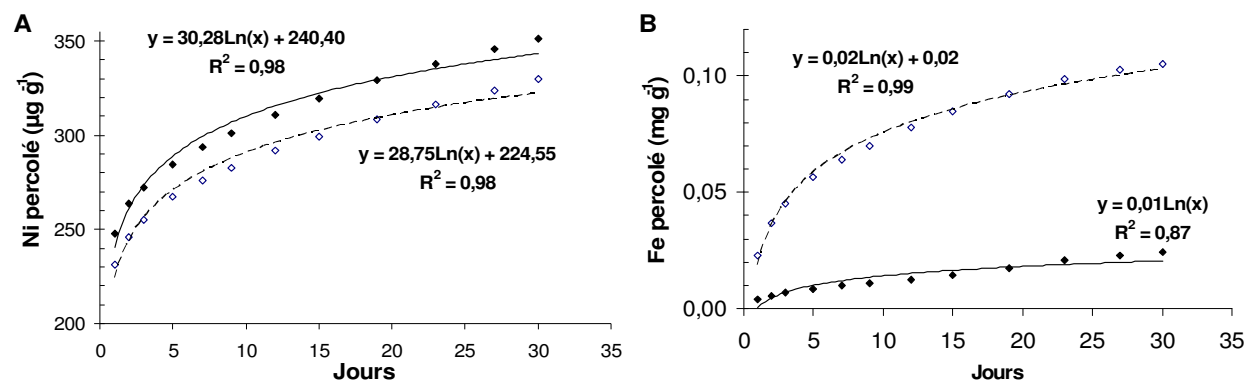


Figure 28. Quantités cumulées de Ni (A) et de Fe (B) libérés par l'altération de 1g de **Goethite** au cours de l'expérimentation (◇ solution ♦ solution + acide citrique 20 mg l⁻¹).

Les taux de dissolution des minéraux ont été calculés à partir des éléments pour lesquels les écarts-types entre les répétitions étaient les moins importants *i.e.* le Mg pour le **Chrysotile** et le Ni pour la **Goethite** (Tableau 9). Le taux de dissolution du **Chrysotile** est supérieur à celui de la **Goethite**. La présence d'acide citrique a significativement augmenté le taux de dissolution du **Chrysotile**. En revanche, l'acide citrique n'a pas eu d'effet significatif sur le taux de dissolution de la **Goethite**.

Tableau 9. Taux de dissolution du **Chrysotile** et de la **Goethite** calculés respectivement à partir des quantités totales de Mg et de Ni percolées après 30 jours d'expérimentation.

	Chrysotile		Goethite	
	[Mg]		[Ni]	
	mol m ⁻² s ⁻¹			
<i>Solution</i>	4,33. 10 ⁻¹⁴	<i>b</i>	1,03. 10 ⁻¹⁵	
<i>Solution + acide citrique 20 mg l⁻¹</i>	6,05. 10 ⁻¹⁴	<i>a</i>	1,10. 10 ⁻¹⁵	<i>n.s.</i>

3. Discussion

3.1. Spéciation et disponibilité du Ni dans les minéraux

La disponibilité du Ni au sein des phases dépend des mécanismes de fixation impliqués dans la sorption du métal. Par exemple, le Ni adsorbé à la surface des minéraux est plus disponible que celui inclus dans le réseau cristallin des minéraux. La répartition du Ni au sein des différents compartiments de Ni échangeable n'est pas la même en fonction de la structure des phases minérales et de la réactivité de surface qui en découle. La fraction de Ni échangeable des minéraux durant l'expérimentation (compartiment $E_{(0-1an)}$) est telle que : **Goethite** << **Chrysotile** << **Smectite**. Néanmoins, compte tenu des teneurs du Ni dans les minéraux, la quantité de Ni phytodisponible est telle que : **Chrysotile** << **Goethite** < **Smectite**.

Le chrysotile est constitué de fibrilles élémentaires. L'agencement des feuillets ne permet pas l'accès de l'espace interfoliaire aux molécules d'eau et aux cations. Néanmoins, les zones de rupture des particules offrent un accès aux molécules d'eau et aux ions au niveau de la zone interne des fibrilles (diamètre 100 Å). La CEC de ce type de minéral est faible. Elle est induite essentiellement par des charges variables provenant de groupements fonctionnels de surface situés en bordure des fibres de chrysotile (Bales et Morgan, 1985 a). L'adsorption non spécifique du Ni à la surface du chrysotile (formation de complexe de sphère externe) est limitée du fait de l'absence de charges permanentes. En revanche, la présence des groupements fonctionnels peut induire l'adsorption spécifique du Ni (formation de complexe de sphère interne). Ainsi, le Ni adsorbé sur les fibres de chrysotile est essentiellement sous forme peu échangeable. Cela explique l'absence de compartiment de Ni instantanément échangeable ($E_{(0-1 min)}$) au sein des échantillons de **Chrysotile**. Par ailleurs, dans le réseau cristallin du chrysotile, Mg^{2+} peut être remplacé par Ni^{2+} au niveau des couches octaédriques (Manceau et Calas, 1985 ; Wicks et O'Hanley, 1988 ; Deer *et al.*, 1992). La fraction de Ni localisée dans la structure du chrysotile est considérée comme non échangeable. Cette fraction représente environ 40 % de la quantité totale du Ni présent dans les échantillons de chrysotile.

La smectite est un phyllosilicate dioctaédrique de type 2:1. L'organisation des feuillets permet l'accès de l'espace interfoliaire aux molécules d'eau et aux cations. Cela se traduit par une surface spécifique et une CEC élevées relativement au **Chrysotile**. La CEC est induite par la présence simultanée de charges permanentes et de charges variables à la surface de la structure minérale. La présence de charges permanentes, due aux nombreuses substitutions isomorphiques au sein du réseau cristallin, peut conduire à l'adsorption non spécifique du Ni

sous forme hydratée à la surface de la **Smectite** et notamment au niveau des espaces interfoliaires (Pitteloud *et al.*, 2001 ; Dähn *et al.*, 2003). Le Ni est alors facilement échangeable avec les cations présents en solution. Cela se traduit par une fraction élevée de Ni instantanément échangeable de la **Smectite**, soit 13 % de la quantité totale de Ni. La présence des groupements fonctionnels induit l'adsorption spécifique du Ni. Dans ce cas, le Ni serait moins facilement échangeable. Lorsque le minéral est saturé en Ni, la formation de précipités hétérogènes en bordure de feuillets est possible (Elzinga et Sparks, 1999 ; Dähn *et al.*, 2002). Le Ni ainsi sorbé sur les particules de **Smectite** est énergiquement retenu, et donc peu échangeable. Une partie du Ni peut également migrer vers les sites octaédriques vacants (Muller *et al.*, 1997 ; Dähn *et al.*, 2002) et se retrouver immobilisé dans le réseau cristallin du minéral. Le Ni non échangeable durant l'expérimentation représente environ 40 % de la quantité totale du Ni présent dans les échantillons de **Smectite**.

Dans le cas de la goethite de synthèse, le Ni est principalement incorporé et immobilisé dans le réseau cristallin du minéral (octaèdres) en substitution au Fe^{2+} (Manceau *et al.*, 2000 ; Carvalho-E-Silva *et al.*, 2003). Le pH_{H_2O} de la goethite est de 3,5. Or, en milieu acide ($pH < 5$), la goethite est chargée positivement du fait de la présence de groupement hydroxyles à la surface des particules (Marcussen *et al.*, 2003). Dans ce cas, Ni^{2+} ne peut pas être adsorbé à la surface de la goethite. La fraction de Ni échangeable (environ 2 %) est donc essentiellement sous forme hydrosoluble et donc instantanément disponible. En revanche, au-delà de pH 5, l'augmentation du pH du milieu favorise la sorption du métal. La présence de molécules complexant le Ni n'influencerait pas la sorption du Ni sur la goethite (Marcussen *et al.*, 2003). Néanmoins, nous avons observé dans nos travaux que la quantité de Ni extraite au DTPA-TEA était plus faible que la quantité de Ni hydrosoluble. Dans ce cas, l'utilisation de la solution de DTPA-TEA, tamponnée à pH 7,3, a pu favoriser la sorption du Ni sur les particules de goethite, ou encore une partie des molécules de DTPA-TEA (de charge globale négative) a pu être sorbé sur la goethite le rendant inefficace vis-à-vis de la complexation du Ni.

Une analyse des phases minérales nickélicifères en spectroscopie d'absorption des rayons X (EXAFS) serait toutefois nécessaire afin de caractériser de manière précise (i) la spéciation du Ni dans les minéraux et (ii) la contribution des différentes formes de Ni relative à la disponibilité du métal dans les sols.

3.2. Altération du Chrysotile et de la Goethite

Après 15 mois dans les horizons de surface des sols ultramafiques, les teneurs du Ni hydrosoluble des minéraux se sont rapprochées de celles des solutions des sols. La teneur du Ni hydrosoluble du **Chrysotile** a augmenté de manière très importante après l'expérimentation et même au-delà de celles des sols dans lesquels il a été introduit. L'augmentation du Ni phytodisponible et du Ni total au sein du chrysotile suggère qu'une fraction du Ni présent dans la solution des sols se serait sorbée sur le minéral (adsorption, précipitation hétérogène). A l'inverse, les teneurs du Ni hydrosoluble et du Ni phytodisponible de la **Goethite** ont fortement diminué sans toutefois conduire à une modification significative de la teneur du Ni total du minéral (excepté pour le sol VII). Lors de l'expérimentation, une fraction importante du Ni adsorbé à la surface du minéral aurait migré vers le sol en contact des sachets. La plupart du Ni au sein de la **Goethite** étant immobilisée dans la structure du minéral (octaèdres), cela aurait alors conduit à un épuisement du Ni hydrosoluble et du compartiment de Ni facilement échangeable. Une fois que le Ni adsorbé à la surface de la **Goethite** a été transféré vers la solution du sol, le Ni au sein du réseau cristallin de la **Goethite** est mobilisable essentiellement par dissolution du minéral (taux de dissolution de la **Goethite** < phyllosilicates). La dissolution de la **Goethite** conduit au relargage simultané et stoechiométrique de Ni et de Fe dans la solution. Néanmoins, une importante fraction des éléments solubilisés pourrait reprécipiter sous forme d'oxydes de Fe amorphes. Cela limiterait la lixiviation du Ni et du Fe au travers du système et par conséquent la quantité des éléments présents dans les percolats. Aussi, seulement 15 % du Ni initialement hydrosoluble de la **Goethite** (Tableau 8) auraient migré vers la solution de percolation. La reprécipitation d'oxydes de Fe au sein du système serait d'autant plus importante en présence d'acide citrique. Ce phénomène serait toutefois très hétérogène (écarts-types très élevés). La présence de citrate dans la solution au contact des particules minérales n'a pas influencé de manière significative l'altération de la **Goethite**. Le taux de dissolution du **Chrysotile** mesuré au cours de notre expérimentation (de l'ordre de 10^{-14} mol m^{-2} s^{-1}) est plus faible que celui mesuré par Bales et Morgan (1985) ($10^{-11,7}$ mol m^{-2} s^{-1} à pH 8). Cette différence peut être due aux conditions expérimentales utilisées. Dans les expérimentations menées par Bales et Morgan, le chrysotile était en suspension aqueuse tamponnée à pH 8 telle que la proportion minéral/solution soit de 1/10. La présence de citrate dans la solution au contact des particules minérales favorise la dissolution du **Chrysotile**. Cela peut s'expliquer, d'une part, par la présence de molécules organiques solubles complexant le Ni au sein la solution de percolation. D'autre part, le pH plus acide de la

solution en contact des particules minérales en présence d'acide citrique pourrait également être une cause de l'augmentation du taux de dissolution du chrysotile (Bales et Morgan, 1985).

4. Conclusion

La phytodisponibilité du Ni dans les sols dépend, d'une part, de la nature et de la teneur des minéraux du sol et, d'autre part, de la spéciation du Ni au sein des phases minérales. La localisation du métal au niveau de la structure du minéral a une forte influence sur la disponibilité du Ni. Le Ni de la goethite est essentiellement incorporé et immobilisé au sein du réseau cristallin ; alors que la majorité du Ni des phyllosilicates est localisé en dehors du réseau cristallin sous la forme adsorbée ou de précipités hétérogènes. Ainsi, la fraction de Ni échangeable est largement plus élevée dans les phyllosilicates (smectite et chrysotile) par rapport à celle de la goethite. La nature du minéral joue également un rôle important quant à l'altérabilité des phases minérales. Les minéraux facilement altérables, comme c'est le cas des phyllosilicates, conduisent rapidement à la solubilisation du Ni.

Nous avons vu au travers de ce chapitre que l'altération des phases porteuses de Ni contrôle la disponibilité du Ni dans les sols. Aussi, le prélèvement intense du Ni du sol par les plantes hyperaccumulatrices influence-t-il l'évolution des phases minérales au sein des sols ? Nous avons également constaté que la présence d'acide citrique pouvait favoriser la l'altération de minéraux tels que le **Chrysotile**. Aussi, l'exsudation de carboxylates de type citrate par les plantes hyperaccumulatrices pourrait-elle conduire à la mise en solution du Ni, et contribuer à l'augmentation de la phytodisponibilité du Ni au sein de la rhizosphère.

Chapitre V

Transferts du Nickel dans le système minéral-terre-plante hyperaccumulatrice

La disponibilité du métal dans les sols et l'écophysiologie des plantes hyperaccumulatrices sont deux paramètres importants qui contrôlent l'efficacité de la phytoextraction du métal du sol.

Les hyperaccumulateurs prélèvent le Ni du sol dans le compartiment des ions isotopiquement échangeables (Shallari, 1997 ; Hutchinson *et al.*, 2000 ; Puschenreiter *et al.*, 2003). Dans les sols contaminés en métaux, le prélèvement du métal par les plantes hyperaccumulatrices est généralement proportionnel à la teneur du métal extractible au DTPA-TEA dans le milieu (Massoura *et al.*, 2004 ; Chardot *et al.*, 2007). Dans ce cas, la culture des plantes hyperaccumulatrices de métaux (*e.g.* Ni, Cd) peut conduire à un appauvrissement significatif de la fraction de métal disponible du sol (Shallari, 1997 ; Gérard *et al.*, 2000 ; Sirguy *et al.*, 2004 ; Chardot *et al.*, 2005). En revanche, lorsque le métal n'est pas ou peu disponible pour la plante, cette dernière induirait des variations chimiques au niveau de la rhizosphère (Chapitre I). Certaines plantes hyperaccumulatrices du genre *Thlaspi* favoriserait ainsi l'altération de phases minérales porteuses du métal (Wenzel *et al.*, 2003), conduisant alors à une mise en solution du métal (Whiting *et al.* 1997 ; Puschenreiter *et al.*, 2003). Les hyperaccumulateurs pourraient ainsi accéder à des fractions de Ni initialement non disponibles telles que le Ni inclus dans le réseau cristallin des minéraux. Néanmoins, les mécanismes d'altération induits par les plantes hyperaccumulatrices restent peu connus.

Les différences génétiques entre les espèces hyperaccumulatrices, voire entre différentes populations d'une même espèce (Roosens *et al.*, 2003 ; Schmitt-Sirguy, 2004 ; Cosio *et al.*, 2005), pourraient expliquer les inégalités en terme d'efficacité de phytoextraction. Par exemple, *L. emarginata* en comparaison de *Th. caerulescens* et *Al. murale* est l'espèce qui extrait les quantités de Ni les plus élevées du substrat de culture, ce quel que soit le type de substrat (sol calcaire, limoneux ou serpentinisé) (Chardot *et al.*, 2005). Cette espèce développe-t-elle des mécanismes particuliers permettant d'expliquer son fort potentiel en terme de phytoextraction ?

L'objectif de ce chapitre est de qualifier et quantifier l'altération de phases porteuses de Ni modèles au sein de la rhizosphère des plantes hyperaccumulatrices. Il s'agit (i) de tester l'influence de la localisation et du statut du métal au sein des minéraux sur la disponibilité et le transfert du Ni dans le milieu de culture, et (ii) de déterminer l'impact du prélèvement de Ni par les espèces hyperaccumulatrices sur l'altération des minéraux nickélifères et la disponibilité du Ni dans la rhizosphère.

Pour répondre à cet objectif, trois espèces hyperaccumulatrices de Ni ainsi qu'une espèce témoin non accumulatrice de Ni ont été cultivées pendant cinq mois sur un substrat dans lequel ont été insérées trois phases minérales nickélifères modèles, représentant une gamme de disponibilité et du pouvoir tampon vis-à-vis du Ni.

Cette expérience a permis : (i) de caractériser le potentiel d'hyperaccumulation des espèces hyperaccumulatrices ; (ii) de déterminer l'influence de la source de Ni sur la distribution et la morphologie des racines des hyperaccumulateurs de Ni dans le substrat, (i) d'effectuer un bilan quantitatif sur l'évolution de la disponibilité du Ni dans le système après la culture, à partir de l'analyse chimique des échantillons de terre et de minéraux (extractions à l'eau, au DTPA-TEA et à l'eau régale).

1. Matériels et méthodes

1.1. Matériels

1.1.1. Terre de remplissage

La terre utilisée pour la culture provient de l'horizon de surface A_p (0-20 cm) d'un Luvisol Haplique (Sol brun lessivé limoneux) situé dans la commune d'Augny (Moselle, France). Les échantillons de terre récoltés ont été séchés à l'air libre, puis tamisés à 5 mm.

Les analyses physico-chimiques de la terre ont été réalisées au Laboratoire d'Analyses des Sols de l'INRA d'Arras suivant des méthodes normalisées. Ses principales caractéristiques physico-chimiques figurent dans le Tableau 10.

Tableau 10. Caractéristiques physico-chimiques de la terre de remplissage.

Fractions granulométriques %			Cations échangeables ‰				CEC Metson
Argile	Limons	Sables	Mg	Ca	K	Na	cmol ⁺ kg ⁻¹
13,8	66,2	20,0	0,044	0,099	0,117	0,005	7,3
P ₂ O ₅ Olsen ‰	pH _{eau}	M.O. ‰	N _{total} ‰	C/N	Ni total	Fe total mg kg ⁻¹	Mg total
0,103	5,2	17,5	1.11	9	20.6	20,6	2,5

La terre de remplissage est principalement caractérisée par :

(1) **sa faible teneur en Ni total** (Tableau 9), nettement inférieure à la concentration seuil imposée pour l'épandage de déchets en agriculture (50 mg kg^{-1}).

(2) **une faible phytodisponibilité du Ni**. La teneur du Ni extractible au DTPA-TEA ne représente que 5 % du Ni total. Elle correspond approximativement à la quantité de Ni instantanément échangeable ($E_{(0-1min)}$) (Tableau 11). Le Ni est essentiellement sous forme peu ou non échangeable ; $E_{(>5mois)}$ représentant 88 % du Ni total.

(4) **sa faible capacité de sorption vis-à-vis du Ni**, ce qui le rend quasiment neutre face à un relargage de Ni au cours de l'altération des minéraux tests. La valeur de r_1/R de la terre de remplissage est supérieure à 0,1 (Tableau 11), ce qui dans la plupart des sols est rarement le cas concernant le Ni (Echevarria, 2006). Cela traduit une faible capacité de sorption des sols vis-à-vis du Ni.

Tableau 11. Paramètres des cinétiques d'échange isotopique de la terre de remplissage et teneur du Ni extractible au DTPA-TEA.

r_1/R	n	C_{Ni} $\mu\text{g l}^{-1}$	$E_{(0-1min)}$ mg kg^{-1}	$E_{(1min-5mois)}$	$E_{(>5mois)}$	Capacité l kg^{-1}	$Ni_{DTPA-TEA}$ mg kg^{-1}
0,16	0,08	8	0,98	1,5	18,11	122	1,01

(5) **une invasion capillaire extrêmement rapide** lors du stade initial d'une phase d'humectation, qui est susceptible de jouer un rôle de vecteur dans la redistribution du Ni au sein de la terre. Le flux d'invasion capillaire est extrêmement rapide pendant le premier dixième de seconde (près de 8 mm s^{-1}), puis décroît de façon non linéaire en fonction du temps (Annexe 6). Le flux capillaire moyen de l'eau dans le substrat de culture est de $0,284 \pm 0,015 \text{ mm s}^{-1}$.

1.1.2. Minéraux porteurs de Ni

Trois minéraux nickélifères modèles ont été testés : la **Goethite**, le **Chrysotile** et la **Smectite**. L'origine et la caractérisation des minéraux tests ont été présentées dans les chapitres II et IV, respectivement. La quantité de Ni hydrosoluble (fraction la plus susceptible de migrer au sein du système) au sein des phases minérales est telle que : **Smectite > Goethite >> Chrysotile**. En revanche, la capacité de réapprovisionnement (pouvoir tampon) de la solution en ions Ni est telle que : **Smectite >> Chrysotile > Goethite**.

1.1.3. Espèces végétales

Dans cette expérimentation, trois espèces hyperaccumulatrices de Ni *L. emarginata*, *Al. murale* et *Th. caerulescens*, ainsi qu'une espèce non accumulatrice *Au. saxatilis* ont été étudiées. Des graines de chaque espèce (provenant du même lot que celles utilisées pour la culture) ont été minéralisées et analysées (Chapitre II) afin de connaître leur teneur moyenne en Ni (Tableau 12). D'une manière générale, les graines des hyperaccumulateurs sont 50 à 2000 fois plus concentrées en Ni par rapport à l'espèce non accumulatrice *Au. saxatilis*. La teneur en Ni la plus élevée a été mesurée dans les graines d'*Al. murale* (8563 µg g⁻¹). Néanmoins, les graines de *L. emarginata* étant beaucoup plus grosses par rapport aux graines des autres espèces, la quantité de Ni apportée par une graine de *L. emarginata* est trois fois plus élevée que celle apportée par *Al. murale*, et environ 10000 fois plus élevée que celle apportée *Au. saxatilis*.

Tableau 12. Concentration et quantité de Ni dans les graines des espèces végétales étudiées.

	Concentration en Ni	Estimation de la quantité de Ni par graine
 µg g ⁻¹ µg
<i>Au. saxatilis</i>	4	0,003
<i>Th. caerulescens</i>	172	0,055
<i>Al. murale</i>	8563	3,083
<i>L. emarginata</i>	4427	28,110

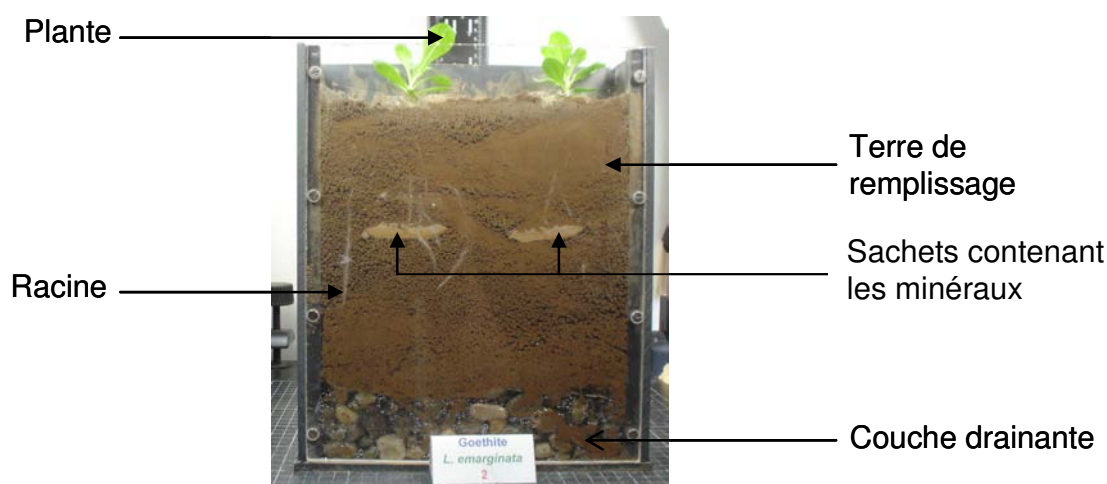
1.2. Méthodes

1.2.1. Dispositif de culture

Les rhizotrons sont des dispositifs en PVC (30 x 25 x 8 cm) couverts d'une face transparente amovible (Schwartz, 1997 ; photographie 5). La culture en rhizotron permet de suivre de façon précise le développement du système racinaire dans le sol et permet de visualiser l'effet de la présence d'inclusions localisées de minéraux porteurs au sein du sol sur la distribution des racines.

Le fond des rhizotrons a été pourvu d'une couche drainante de gravier d'environ 4 cm, recouverte par un fin grillage en matière synthétique (Photographie 5). Le reste du dispositif a été rempli avec 4 kg de terre. Deux sachets en nylon (dimensions : 6x4 cm ; taille des mailles : 1 μ m) contenant chacun un mélange homogène de 4 g de minéral (**Goethite** ou **Chrysotile** ou **Smectite**) et de 12 g de quartz (Chapitre II) ont été insérés au sein de la terre dans chaque rhizotron. Ceux-ci ont été disposés de chaque côté du rhizotron à environ 10 cm de la surface et contre la face transparente. Des témoins sans phase porteuse nickélifère ont été mis en place dans les mêmes conditions. Dans ce cas, le contenu du sachet minéral+quartz a été remplacé par un échantillon de 16 g de terre.

Le contenu de chaque rhizotron a ensuite été humidifié par remontée capillaire avec de l'eau déminéralisée (>15 M Ω).



Photographie 5. Dispositif de culture.

1.2.2. Conditions de culture

Des graines de *L. emarginata*, *Th. caerulescens*, *Al. murale* et *Au. saxatilis* ont été semées sur des plaques de germination contenant du terreau de plantation, dans une chambre de culture sous des conditions de photopériode (16 h), température (16/22 °C) et humidité de l'air (80 %) contrôlées. Après germination, deux plantules ont été repiquées par rhizotron. Des témoins sans plante ont été réalisés dans les mêmes conditions. Quatre répétitions de chaque modalité ont été mises en place.

La culture a été menée pendant cinq mois (avril à août 2005). Les rhizotrons étaient disposés dans une serre (température > 15 °C) sur des plans inclinés de 45°, suivant un plan d'expérimentation de type « criss-cross » (Photographie 6). L'humidité de la terre a été maintenue entre 60 et 100 % de la capacité au champ par arrosage avec de l'eau déminéralisée (> 15 MΩ). Afin d'éviter la formation d'une couche de battance en surface, l'arrosage a été effectué à la fois par nébulisations quotidiennes et par trempages hebdomadaires des rhizotrons dans des bacs (humidification par remontée capillaire).



Photographie 6. Disposition des rhizotrons.

Deux fertilisations azotées (2 x 20 mg N kg⁻¹), phosphatées (2 x 16 mg P kg⁻¹), potassiques (2 x 20 mg kg⁻¹), soufrées (2 x 20 mg S kg⁻¹) et magnésiques (2 x 15 mg Mg kg⁻¹) ont été effectuées après un et trois mois de culture. Les éléments nutritifs ont été apportés respectivement sous forme de nitrate d'ammonium (NH₄NO₃), de dihydrogénophosphate de potassium (KH₂PO₄) et de sulfate de magnésium (MgSO₄, 7H₂O).

Des photographies du système racinaire ont été réalisées chaque semaine pour suivre le développement des racines au cours de la culture.

1.2.3. Récolte des végétaux

Après 5 mois de culture, la totalité des feuilles et des tiges des plantes de chaque rhizotron, actives au moment de la récolte, ont été récoltées séparément. L'absence de tige chez l'espèce *Th. caerulea* est due à sa morphologie en rosette durant les stades végétatifs. Un échantillon des racines des plantes a également été prélevé, néanmoins la biomasse racinaire totale n'a pu être collectée. Les feuilles sénescents n'ont pas été récoltées, car la majorité de celles-ci était tombée en dehors des rhizotrons et était en partie mélangée avec les feuilles sénescents des individus voisins.

1.2.4. Récolte de la terre et des sachets contenant les minéraux

Après cinq mois de culture, le substrat de culture a été prélevé de sorte à isoler quatre zones (Figure 29):

- Zone A : surface.
- Zone B : autour des sachets sans contact direct.
- Zone C : directement au contact des sachets.
- Zone D : partie inférieure du rhizotron.

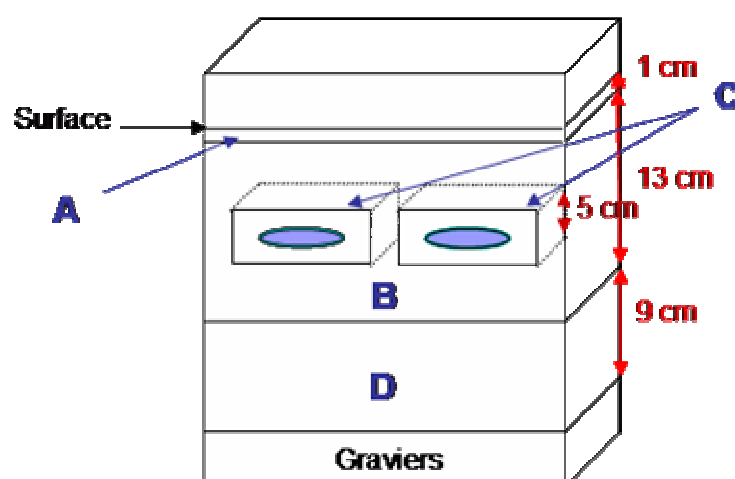


Figure 29 . Schématisation des différentes zones de prélèvement.

L'ensemble des échantillons de terre récoltés, ainsi que le mélange **Minéral+Quartz** contenu dans les sachets, ont été séchés à l'air libre puis décompactés à l'aide d'un pilon dans un mortier en porcelaine.

1.2.5. Analyses

A. Minéralisation des échantillons végétaux

L'ensemble des échantillons de feuilles, de tiges et de racines des végétaux récoltés à la fin de la culture a été minéralisé par attaque acide (Chapitre II). Le Ni contenu dans les minéralisats a été dosé par ICP-AES (Chapitre II).

B. Extractions chimiques

Différentes extractions chimiques ont été effectuées sur les échantillons de terre, de même que sur le contenu des sachets, avant et après la culture (détails dans le chapitre II) :

- Mesures du pH ;
- Extractions du Ni à l'eau (Ni hydrosoluble) ;
- Extractions du Ni au DTPA-TEA (estimation du Ni phytodisponible) ;
- Extractions du Ni à l'eau régale ($Ni_{REG} = 80 \%$ du Ni total) ;
- CEI (compartimentation du Ni).

Les extractions chimiques du Ni et les mesures du pH ont été effectuées sur chacune des zones prélevées A, B, C et D (Figure 29), de même que sur le contenu des sachets ; excepté pour le traitement témoin sans apport de minéraux nickélifères. Pour ce dernier, les analyses ont été effectuées sur la zone A, ainsi que sur le mélange homogène de la terre des zones B, C, D et des sachets. En effet, après vérification, seule la zone A présentait des différences par rapport aux autres zones de prélèvement (Annexe 7).

Les CEI ont été réalisées uniquement sur le contenu des sachets des modalités *Sans végétation* et *L. emarginata*.

1.2.6. Disponibilité du Ni dans l'ensemble du système et bilan de l'altération des minéraux nickélicifères

A. Quantité de Ni extractible au DTPA-TEA de la terre

Afin de réaliser un bilan de masse sur les transferts de Ni de la phase minérale nickélicifère (sachets) vers la terre de remplissage du rhizotron, la quantité de Ni extractible au DTPA-TEA de la terre a été calculée pour chaque zone prélevée dans le rhizotron (Figure 29) de la façon suivante :

$$QNi_{DTPA-TEA} (ZoneX) = Ni_{DTPA-TEA} (zoneX) \times M (zoneX) \quad [8]$$

Avec :

- $QNi_{DTPA-TEA}$, la quantité de Ni extractible au DTPA-TEA dans la terre prélevée au niveau de la zone X (mg) ;
- $Ni_{DTPA-TEA}$, la concentration en Ni extractible au DTPA-TEA dans la terre prélevée au niveau de la zone X (mg);
- et M , la masse de terre collectée dans la zone X.

B. Concentration moyenne du Ni extractible au DTPA-TEA de la terre

Pour évaluer l'impact de la culture des plantes sur les teneurs du Ni disponible dans l'ensemble de la terre de remplissage du rhizotron, nous avons calculé la concentration moyenne du Ni extractible au DTPA-TEA de la terre de culture (*i.e.* toutes zones confondues). Celle-ci a été calculée à partir de la somme des quantités de Ni extractible au DTPA-TEA mesurées dans chaque zone X (*i.e.* zones A, B, C et D), rapportée à un kg de terre, soit :

$$[Ni_{DTPA-TEA}]_{rhizo.} = \frac{\sum QNi_{DTPA-TEA} (zonesX)}{4} \quad [9]$$

Avec :

- $[Ni_{DTPA-TEA}]_{rhizo.}$, la concentration moyenne du Ni extractible au DTPA-TEA de la terre de remplissage dans l'ensemble du rhizotron ($mg\ kg^{-1}$) ;
- $QNi_{DTPA-TEA}$, la quantité de Ni extractible au DTPA-TEA dans la terre prélevée au niveau de la zone X (mg).
- Le chiffre 4 correspond à la masse du substrat de culture (kg).

C. Quantité de Ni libéré par l'altération des minéraux modèles

Afin de mettre en évidence l'altération propre du minéral inséré dans la terre, nous avons comparé les quantités de Ni extraites au DTPA-TEA et celles accumulées par les végétaux du traitement **Terre+Minéral** à celles du traitement témoin **Terre**, ce pour chaque modalité avec ou sans plante. Pour une modalité donnée, la moyenne des 4 répétitions du traitement témoin a été retranchée aux valeurs de chaque répétition du traitement **Terre+Minéral**, afin de déduire les quantités nettes induites par chaque minéral.

L'estimation de la quantité de Ni libérée par le minéral M puis transférée vers la terre T , *i.e.* $QNi_{M \rightarrow T}$, pour le traitement **Terre+Minéral** a été calculée de la manière suivante :

$$QNi_{M \rightarrow T} = [(QNi_{DTPA-TEA})_{rhizo}]_{Terre+Minéral} - [(QNi_{DTPA-TEA})_{rhizo}]_{Terre} \quad [10]$$

Avec : $(QNi_{DTPA-TEA})_{rhizo}$, la quantité moyenne de Ni extractible au DTPA-TEA de la terre de remplissage dans **l'ensemble du rhizotron** (mg kg⁻¹).

L'estimation de la quantité de Ni libérée par le minéral M puis transférée vers la plante P , *i.e.* $QNi_{M \rightarrow P}$, pour le traitement **Terre+Minéral** a été calculée de la manière suivante :

$$QNi_{M \rightarrow P} = [(QNi_p)]_{Terre+Minéral} - [(QNi_p)]_{Terre} \quad [11]$$

Avec : QNi_p la quantité de Ni contenue dans les **parties aériennes** des plantes après cinq mois de culture (mg).

Aussi, l'estimation de la quantité de Ni totale libérée par le minéral M dans le système terre- plante, *i.e.* $(QNi)_{Minéral}$, est la somme des 2 paramètres précédents, soit:

$$(QNi)_{Minéral} = QNi_{M \rightarrow T} + QNi_{M \rightarrow P} \quad [12]$$

2. Résultats

2.1. Dynamique du Ni dans le système minéral-terre- plante

2.1.1. Transfert du Ni vers les plantes

A. Production de biomasse

Des différences importantes en terme de production de biomasse ont été enregistrées en fonction des espèces (Figure 30). *Au. saxatilis* et *Al. murale* ont produit la plus grande quantité de biomasse (*i.e.* en moyenne 12,35 g MS et 11,03 g MS, respectivement), soit environ trois fois plus que *Th. caerulescens*. En revanche, la présence des minéraux porteurs de Ni au sein du milieu de culture est restée sans effet significatif sur le développement des plantes.

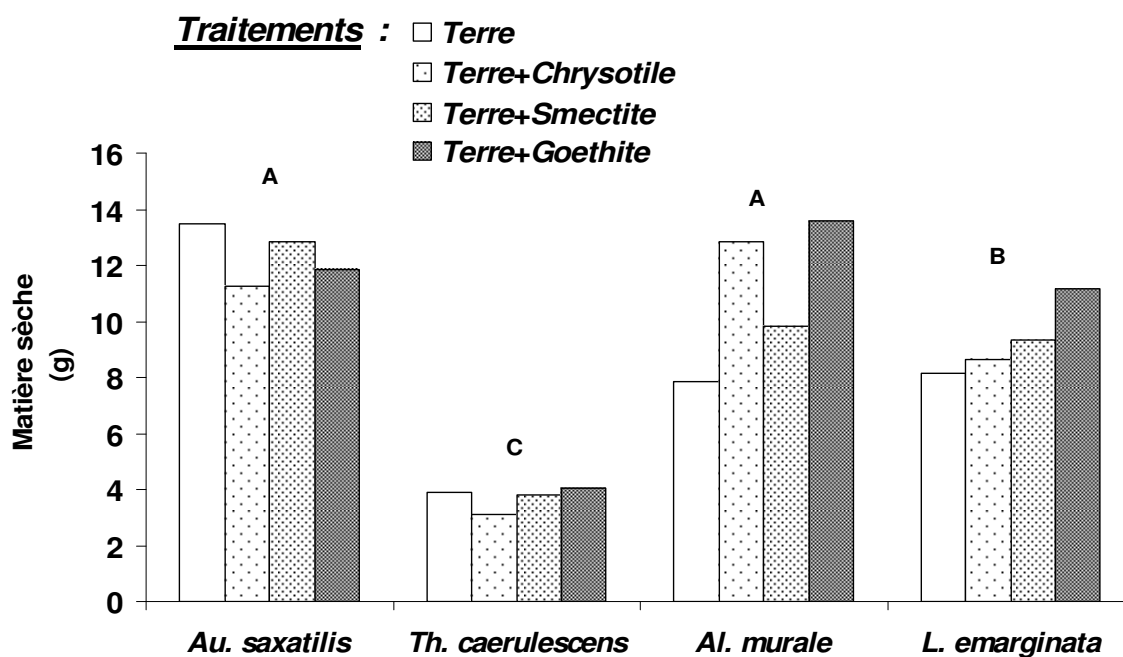


Figure 30. Biomasse produite par les parties aériennes des espèces étudiées sur les différents traitements. A, B, C : analyse de variance effectuée entre les différentes espèces végétales tous traitements confondus (Newman-Keuls, $p=0,05$).

B. Distribution des racines au sein du substrat

Au terme des cinq mois de culture, les racines des végétaux étaient présentes dans l'ensemble du rhizotron (Figure 31). Elles ont atteint les sachets contenant les minéraux porteurs de Ni sans les pénétrer. Nous avons pu observer que le réseau de racines était différent en fonction de l'espèce considérée. En effet, le système racinaire d'*Al. murale* et de *L. emarginata* est pourvu d'un pivot central et de racines relativement épaisses, tandis que celui de *Th. caerulescens* est plutôt formé de fines racines en réseau fasciculé. Pour les trois espèces hyperaccumulatrices le réseau de racines est plutôt vertical. Le système racinaire d'*Au. saxatilis* est composé de racines épaisses et présente un réseau de racines plus désordonné, *i.e.* aussi bien vertical qu'horizontal. Les racines n'ont montré ni d'affinité, ni de répulsion particulière pour les zones à forte concentration en Ni, *i.e.* la zone C au contact des sachets contenant les minéraux tests (Figure 31). Quelle que soit l'espèce, la distribution des racines pour les traitements **Terre+Chrysotile**, **Terre+Smectite** et **Terre+Goethite** n'est pas différente de celle observée pour le témoin **Terre**.

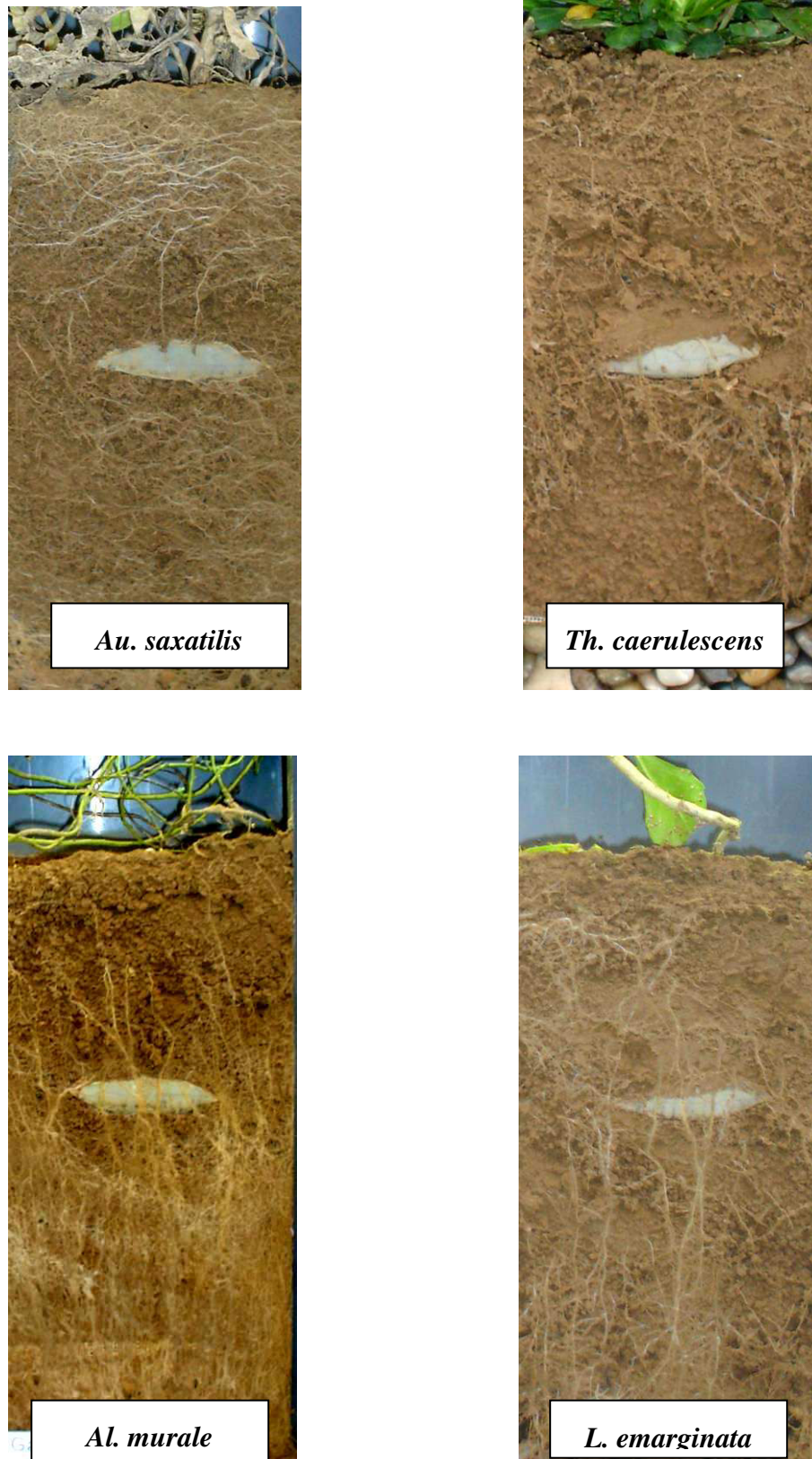


Figure 31. Architecture du système racinaire des espèces végétales cultivées pendant 5 mois sur le traitement Terre+Smectite.

C. Concentration du Ni dans les plantes

Les concentrations du Ni dosé dans les feuilles des plantes hyperaccumulatrices sont environ 20 fois supérieures à celles du témoin non accumulateur *Au. saxatilis* (Figure 32). Les hyperaccumulateurs accumulent le Ni principalement au niveau des parties foliaires. *L. emarginata* est l'espèce qui accumule le plus de Ni dans ses parties aériennes (jusqu'à 469,25 mg Ni kg (MS)⁻¹ dans les feuilles en présence de **Smectite**).

Les concentrations du Ni dans les parties aériennes de *Au. saxatilis* ont significativement augmenté en présence des minéraux porteurs de Ni dans la terre. De même, les hyperaccumulateurs accumulent plus de Ni dans leurs tissus en présence de **Goethite** et surtout de **Smectite**. En revanche, la présence du **Chrysotile** dans le milieu de culture n'a pas influencé l'accumulation du Ni par les plantes hyperaccumulatrices.

Le rapport des concentrations du Ni [racine/feuille] reflète la capacité de chaque espèce à transloquer le Ni des racines vers les feuilles. Dans notre étude, ce rapport est tel que : *L. emarginata* (0,1) < *Al. murale* (0,2) < *Th. caerulescens* (0,3) < *Au. saxatilis* (0,5).

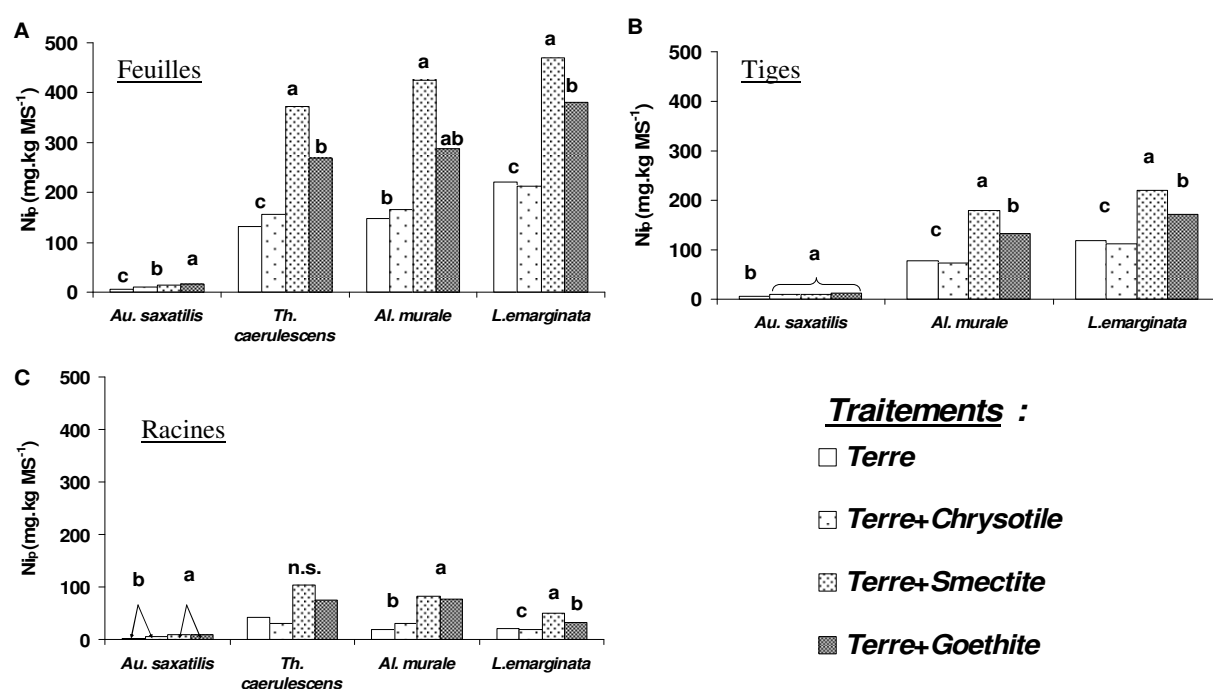


Figure 32. Concentration du Ni dans les feuilles (A), les tiges (B) et les racines (C) des espèces végétales cultivées sur les différents traitements. *a,b,c* : analyse de variance effectuée entre les différents traitements pour chaque espèce végétale (Newman-Keuls, p=0,05).

D. Quantités de Ni extraites par les plantes

Les plantes hyperaccumulatrices ont extrait environ dix fois plus de Ni que l'espèce non accumulatrice *Au. saxatilis* (valeur moyenne, tous traitements confondus) (Figure 33). L'extraction du Ni par les plantes a plus que doublé en présence de **Smectite** et de **Goethite**. En revanche, la présence de **Chrysotile** au sein du système n'a pas eu d'influence sur les quantités de Ni extraites par les végétaux. *L. emarginata* est l'espèce hyperaccumulatrice qui a extrait du milieu de culture et transféré vers ses parties aériennes les quantités de Ni les plus élevées quel que soit le traitement considéré (*Terre* : 1,49 mg, **Terre+Chrysotile** : 1,48 mg, **Terre+Smectite** : 3,56 mg, **Terre+Goethite** : 3,35 mg).

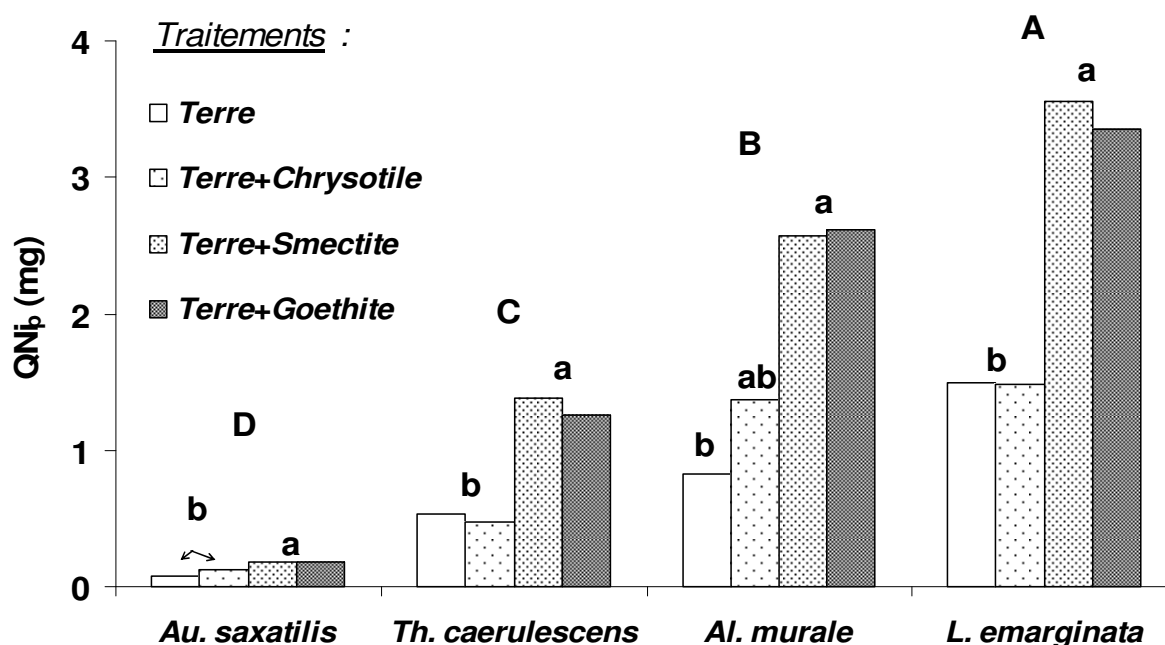


Figure 33. Quantités de Ni transférées dans les parties aériennes des plantes sur les différents traitements. *a, b, c* : analyse de variance effectuée entre les différents traitements pour chaque espèce végétale. *A, B, C* : analyse de variance effectuée entre les différentes espèces végétales tous traitements confondus (Newman-Keuls, $p=0,05$).

2.1.2. Effets de la culture sur les minéraux porteurs de Ni

A. pH

Au terme de la culture, le pH des minéraux porteurs de Ni tend vers le pH de la terre de remplissage, ce qui implique des échanges entre la terre, qui joue le rôle de tampon, et les minéraux (Figure 34). La culture a entraîné une diminution significative du pH du **Chrysotile** et de la **Smectite** (-0,8 et -0,5 unités pH en moyenne, respectivement). La diminution du pH du **Chrysotile** est d'autant plus marquée après la culture de *Th. caerulescens* et de *Al. murale* (-0,1 unité pH par rapport à *Sans végétation*). En revanche, la présence des plantes, et notamment de *L. emarginata*, a limité la diminution du pH de la **Smectite**. A l'inverse du **Chrysotile** et de la **Smectite**, le pH de la **Goethite** a augmenté en moyenne de 0,8 unité. Le pH de la **Goethite** a surtout augmenté après la culture de *Au. saxatilis* (+ 0.1 unité), *Al. murale* et *L. emarginata* (+ 0,2 unité). Le pH de la terre est significativement plus élevé après la culture des trois espèces hyperaccumulatrices par rapport au témoin sans plante (+ 0,3 unité pH en moyenne).

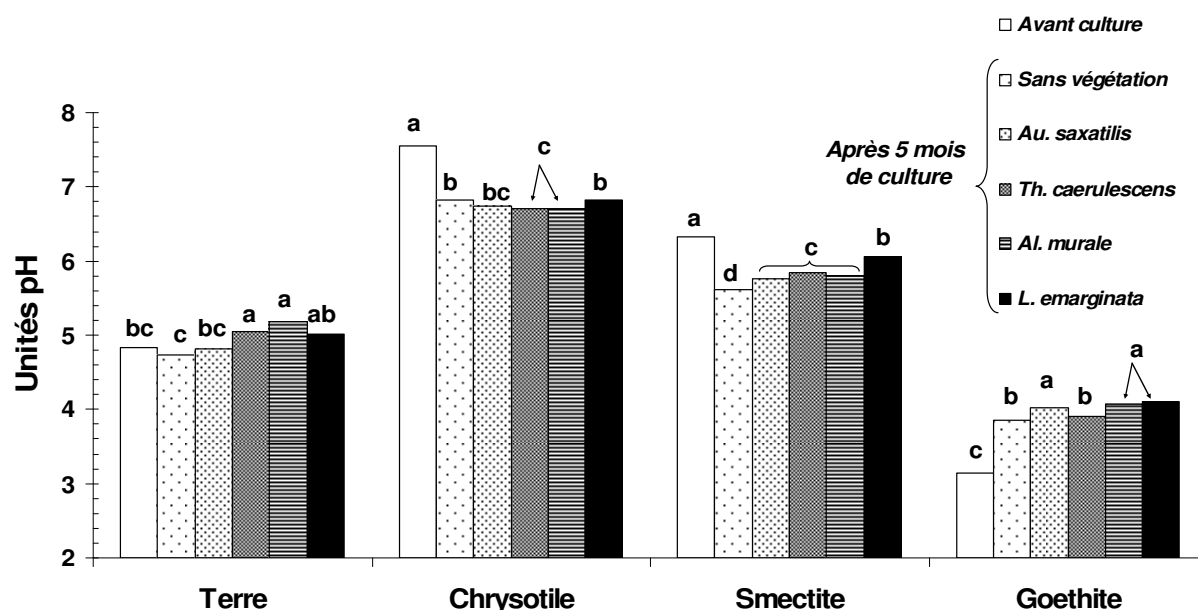


Figure 34. pH de la terre et des minéraux porteurs de Ni contenus dans les sachets avant et après culture. *a, b, c* : analyse de variance effectuée entre les différentes modalités pour chaque minéral (Newman-Keuls, $p=0,05$).

B. Ni hydrosoluble

Au terme de la culture, les teneurs du Ni hydrosoluble dans les minéraux modèles suivent l'ordre suivant : **Smectite** > **Goethite** >> **Chrysotile** > **Terre** (Figure 35). La teneur du Ni hydrosoluble dans la **terre** diminue pour l'ensemble des modalités après culture. Une diminution significative d'environ 34 % de Ni_{H_2O} a été observée après la culture de *Al. murale* et de *L. emarginata*. Dans le **Chrysotile**, la teneur du Ni hydrosoluble est en moyenne 15 fois plus élevée après la culture. La valeur la plus élevée a été mesurée en présence de l'espèce non accumulatrice *Au. saxatilis* ($27 \mu\text{g l}^{-1}$). Dans la **Smectite**, la teneur du Ni hydrosoluble est en moyenne 1,5 fois plus élevée après la culture. La présence des plantes (hyperaccumulatrices ou non) n'a pas eu d'effet significatif. La teneur en Ni hydrosoluble de la **Goethite** a diminué en moyenne d'environ 96 % sur l'ensemble des traitements après culture. La présence des plantes n'a pas eu d'effet significatif. Toutefois, Ni_{H_2O} tend vers des valeurs plus faibles en présence de *Au. saxatilis* et de *Al. murale*.

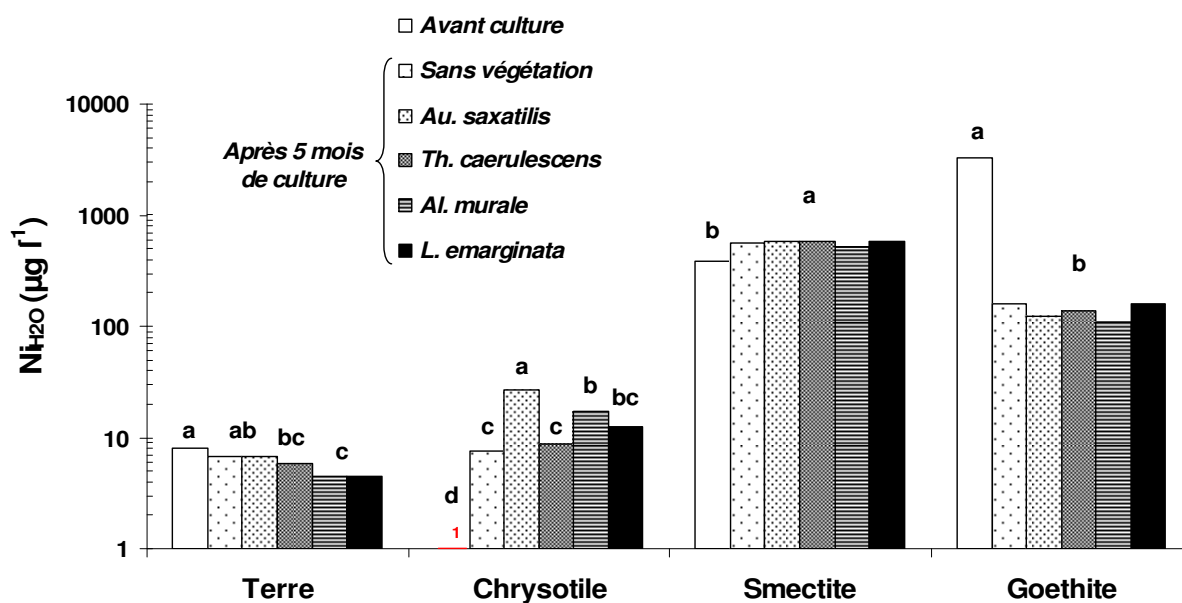


Figure 35. Concentration du Ni hydrosoluble mesurée sur la terre et les minéraux porteurs de Ni contenus dans les sachets avant et après cinq mois de culture. *a,b,c* : analyse de variance effectuée entre les différentes modalités pour chaque minéral (Newman-Keuls, $p=0,05$).

C. Ni extractible au DTPA-TEA

Nous avons vu dans le chapitre IV que la disponibilité du Ni est très différente en fonction de la nature des minéraux. Les teneurs du Ni extractible au DTPA-TEA mesurées au sein des phases minérales étudiées avant la culture sont telles que: **Smectite > Goethite >> Terre ~Chrysotile** (Figure 36).

La teneur du Ni extractible au DTPA-TEA de la **terre** est significativement plus faible après la culture des plantes hyperaccumulatrices par rapport au témoin sans plante (-16 % en présence de *Th. caerulescens* ; -29 % en présence de *Al. murale* et de *L. emarginata*). En revanche, $Ni_{DTPA-TEA}$ a légèrement augmenté (+ 6 %) en présence de l'espèce non accumulatrice *Au. saxatilis*, mais de manière non significative. La disponibilité du Ni dans le **Chrysotile** en présence des hyperaccumulateurs a évolué de façon similaire à celle de la terre. Néanmoins, $Ni_{DTPA-TEA}$ du chrysotile a augmenté de 31 % en présence de l'espèce non accumulatrice *Au. saxatilis* par rapport au témoin sans plante. La teneur du Ni extractible au DTPA-TEA dans la **Smectite** a diminué de 50 % en moyenne après la culture. Celle-ci reste cependant élevée par rapport à celles des autres minéraux porteurs de Ni (67,9 mg kg⁻¹ pour le témoin sans plante et 50,6 mg kg⁻¹ en moyenne pour l'ensemble des modalités avec plantes).

La culture a eu un fort impact quant à la disponibilité du Ni dans la **Goethite**. En effet, après la culture, $Ni_{DTPA-TEA}$ a diminué de plus de 95 % dans la **Goethite**, indépendamment de la présence des plantes et de l'espèce cultivée. Aussi, les teneurs du Ni extractible au DTPA-TEA dans la **Goethite**, après la culture, sont du même ordre de grandeur que celles du **Chrysotile** et de la terre.

D. Ni extractible à l'eau régale

La culture n'a pas eu d'effet significatif sur les teneurs du Ni extractible à l'eau régale de la **terre** et du **Chrysotile** (Figure 37). Pour la goethite, seule la présence de *Th. caerulescens* a diminué de façon significative Ni_{REG} par rapport à l'état initial du minéral. Toutefois, cette diminution n'est pas significative par rapport au témoin sans plante. En revanche, les teneurs du Ni extractible à l'eau régale dans la **Smectite** ont diminué en moyenne de 11 % après la culture, indépendamment de la présence des plantes et de l'espèce cultivée.

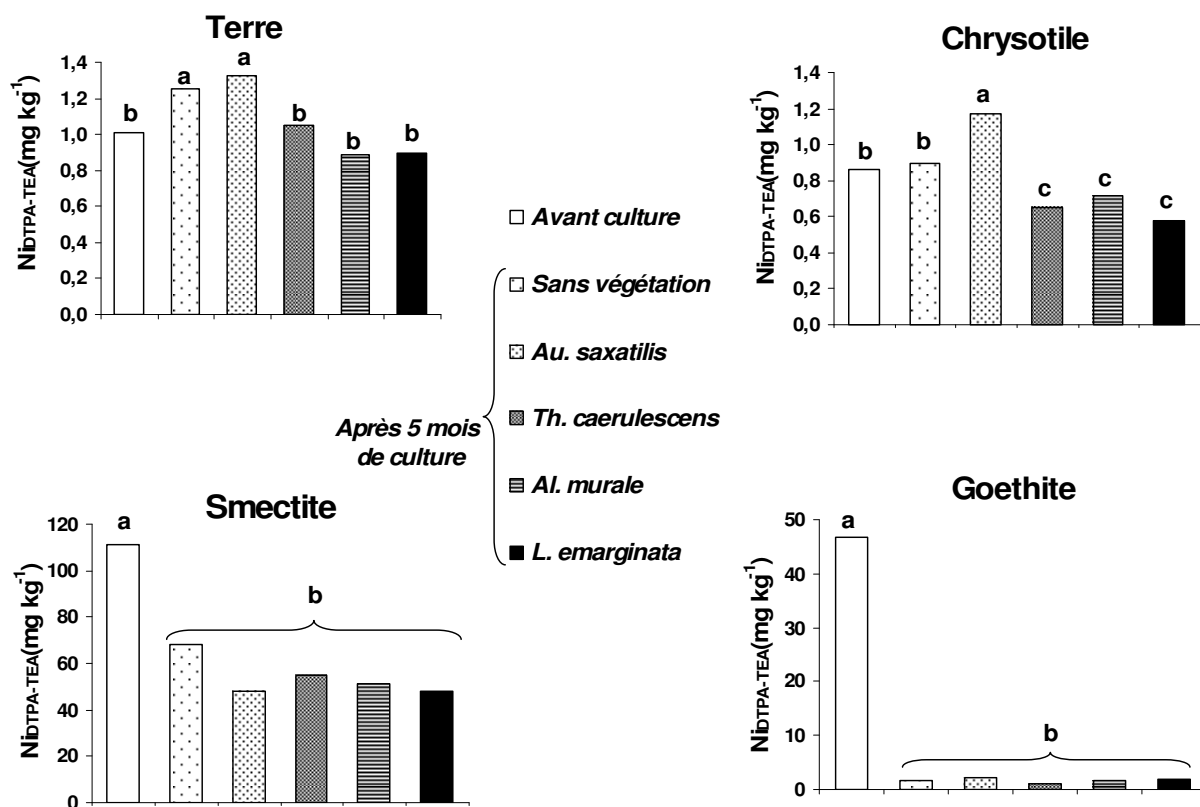


Figure 36. Concentration du Ni extractible au DTPA-TEA mesurée sur la terre et les minéraux porteurs de Ni contenus dans les sachets avant et après 5 mois de culture. *a,b,c* : analyse de variance effectuée entre les différentes modalités pour chaque minéral (Newman-Keuls, $p=0,05$)

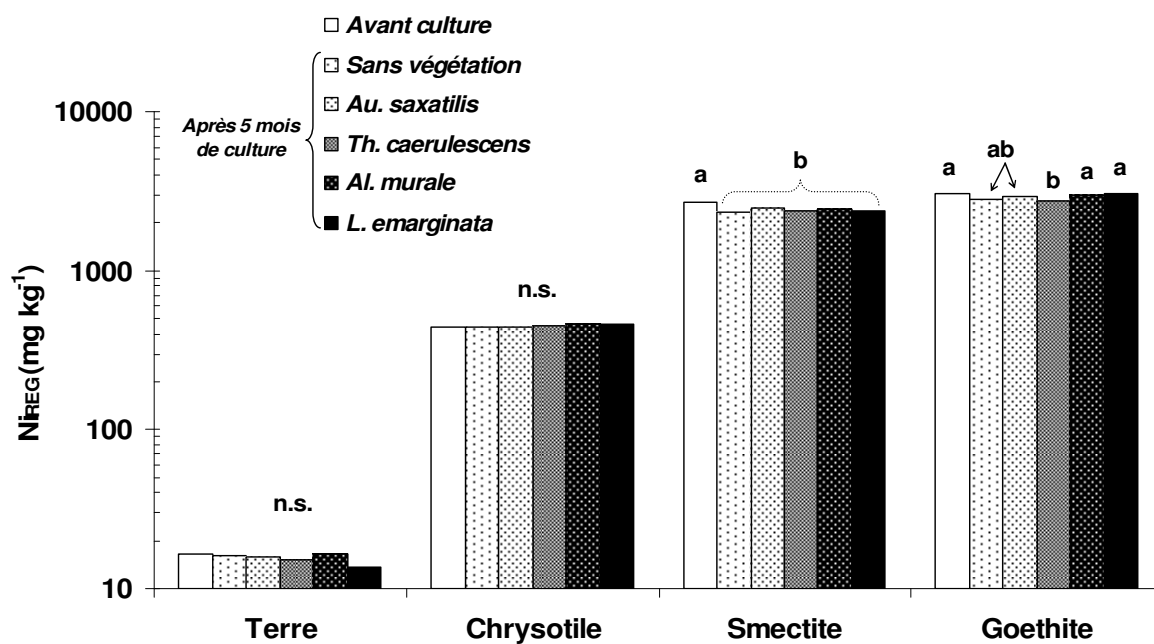


Figure 37. Concentration en Ni extractible à l'eau régale de la terre et des minéraux porteurs de Ni contenus dans les sachets avant et après cinq mois de culture. *a,b,c* : analyse de variance effectuée entre les différentes modalités pour chaque minéral (Newman-Keuls, $p=0,05$).

E. Paramètres de cinétiques d'échange isotopique du Ni

La répartition du Ni au sein des différents compartiments des phases minérales a été discutée dans le chapitre IV (Figure 22). Aussi, nous nous intéresserons ici à l'évolution de la compartimentation du Ni suite à la culture. Cette dernière a conduit à une redistribution du Ni au sein des différents compartiments plus ou moins échangeables du **Chrysotile** (Tableau 13). Cette redistribution se traduit par : (i) une augmentation significative des quantités de Ni hydrosolubles C_{Ni} et du Ni rapidement échangeable (compartiments $E_{(0-1\ min)}$ et $E_{(1-10\ min)}$) ; (ii) une diminution significative du compartiment $E_{(24h-5mois)}$; et (iii) une teneur du Ni total qui reste inchangée après la culture. La culture de *L. emarginata* n'a pas eu d'impact significatif sur la redistribution du Ni par rapport au témoin sans végétation.

Au terme de la culture, la solution et le compartiment $E_{(0-1min)}$ de la **Smectite** ont été fortement réapprovisionnés en Ni par les compartiments de Ni moins échangeable. Cela se traduit par l'appauvrissement des compartiments de Ni échangeable entre 10 min et 5 mois pour le témoin sans végétation, et par un appauvrissement du compartiment $E_{(>5\ mois)}$ en présence de *L. emarginata*. La culture a conduit à une diminution de la quantité du Ni total de la **Smectite**. Cette diminution est d'autant plus marquée en présence de *L. emarginata*. Aussi, la différence entre les valeurs du Ni total avant et après la culture donne une estimation de la quantité de Ni transférée vers le système terre-plante ; soit 11,2 mg de Ni en présence de *L. emarginata* et 8,7 mg de Ni pour le témoin sans plante.

Au terme de la culture, la quasi-totalité du Ni adsorbé à la surface de la **Goethite** aurait migré vers la terre de remplissage, conduisant à l'épuisement du Ni hydrosoluble et des compartiments les plus échangeables, et plus particulièrement du compartiment $E_{(0-1min)}$ (-95%). Ce transfert n'aurait pas eu de répercussion quantifiable sur la quantité de Ni total du minéral, compte tenu du fait que la quantité de Ni initialement adsorbé à la surface de la **Goethite** ne représentait que 2 % du Ni total.

Tableau 13. Paramètres de cinétiques d'échange isotopique effectués avant et après culture de *L. emarginata* sur le mélange minéral-Quartz (1-3) contenu dans les sachets.

Minéraux	Modalitésmg kg ⁻¹													
		CNi mg l ⁻¹	E _(0-1min)		E _(1min-10min)		E _(10min-24h)		E _(24h-5mois)		E _(>5mois)		Ni total		
Chrysotile	Avant culture	0,001	<i>b</i>	0,09	<i>b</i>	0,26	<i>b</i>	10,81	<i>n.s.</i>	228,40	<i>a</i>	325,44	<i>b</i>	565	<i>n.s.</i>
	Sans végétation	0,011	<i>a</i>	1,12	<i>a</i>	1,48	<i>a</i>	13,54	<i>n.s.</i>	74,70	<i>b</i>	452,92	<i>a</i>	544	<i>n.s.</i>
	<i>L. emarginata</i>	0,018	<i>a</i>	1,39	<i>a</i>	1,38	<i>a</i>	9,67	<i>n.s.</i>	36,42	<i>b</i>	517,39	<i>a</i>	566	<i>n.s.</i>
Smectite	Avant culture	0,456	<i>b</i>	392,89	<i>n.s.</i>	159,08	<i>b</i>	533,76	<i>b</i>	706,60	<i>a</i>	1320,17	<i>b</i>	3113	<i>a</i>
	Sans végétation	1,054	<i>a</i>	398,92	<i>n.s.</i>	106,24	<i>c</i>	301,62	<i>c</i>	393,23	<i>b</i>	1639,99	<i>a</i>	2840	<i>b</i>
	<i>L. emarginata</i>	1,188	<i>a</i>	326,93	<i>n.s.</i>	233,68	<i>a</i>	829,69	<i>a</i>	779,79	<i>a</i>	592,41	<i>c</i>	2763	<i>c</i>
Goethite	Avant culture	3,184	<i>a</i>	68,19	<i>a</i>	1,46	<i>a</i>	3,28	<i>a</i>	3,48	<i>a</i>	3746,09	<i>n.s.</i>	3823	<i>n.s.</i>
	Sans végétation	0,160	<i>b</i>	3,22	<i>b</i>	0,06	<i>b</i>	0,19	<i>b</i>	0,21	<i>b</i>	3648,82	<i>n.s.</i>	3653	<i>n.s.</i>
	<i>L. emarginata</i>	0,161	<i>b</i>	3,57	<i>b</i>	0,21	<i>b</i>	0,55	<i>b</i>	0,59	<i>b</i>	3797,57	<i>n.s.</i>	3803	<i>n.s.</i>

2.1.3. Effet de la culture sur la terre de remplissage

A. Effet des plantes sur la disponibilité du Ni dans la terre

La comparaison des modalités *Sans végétation* de chaque traitement montre que l'introduction de **Goethite** et de **Smectite** dans le système a conduit à une importante augmentation de la teneur du Ni extractible au DTPA-TEA de la terre de remplissage après la culture (Figure 38). En revanche, l'introduction de **Chrysotile** dans le système n'a pas eu d'impact sur la teneur du Ni extractible de la terre. Pour l'ensemble des traitements, y compris pour le traitement témoin sans apport de minéraux, la culture a conduit à une augmentation significative de $Ni_{DTPA-TEA}$ dans la terre. Néanmoins, la présence des plantes hyperaccumulatrices, et notamment de *Al. murale* et de *L. emarginata*, masque cette augmentation en réduisant de manière significative la teneur du Ni extractible dans le substrat. La culture de *L. emarginata* a conduit à une diminution du $Ni_{DTPA-TEA}$ dans la terre, de 28 % sur le traitement sans apport de minéraux, de 34 % sur **Terre+Chrysotile**, de 57 % sur **Terre+Smectite**, et de 44% sur **Terre+Goethite**, par rapport au témoin sans plante.

Contrairement à la culture des hyperaccumulateurs, l'impact de la culture de *Au. saxatilis* sur la disponibilité du Ni dans la terre varie en fonction des traitements : (i) sur les traitements *Terre*, **Terre+Chrysotile** et **Terre+Smectite**, $Ni_{DTPA-TEA}$ ne varie pas significativement en présence de *Au. saxatilis* par rapport au témoin sans plante, malgré une diminution de 5 % sur le traitement **Terre+Chrysotile** et de 17 % sur le traitement **Terre+Smectite** ; (ii) En revanche, sur le traitement **Terre+Goethite**, $Ni_{DTPA-TEA}$ est significativement plus élevé en présence de *Au. saxatilis* (+ 17 %) par rapport au témoin sans plante.

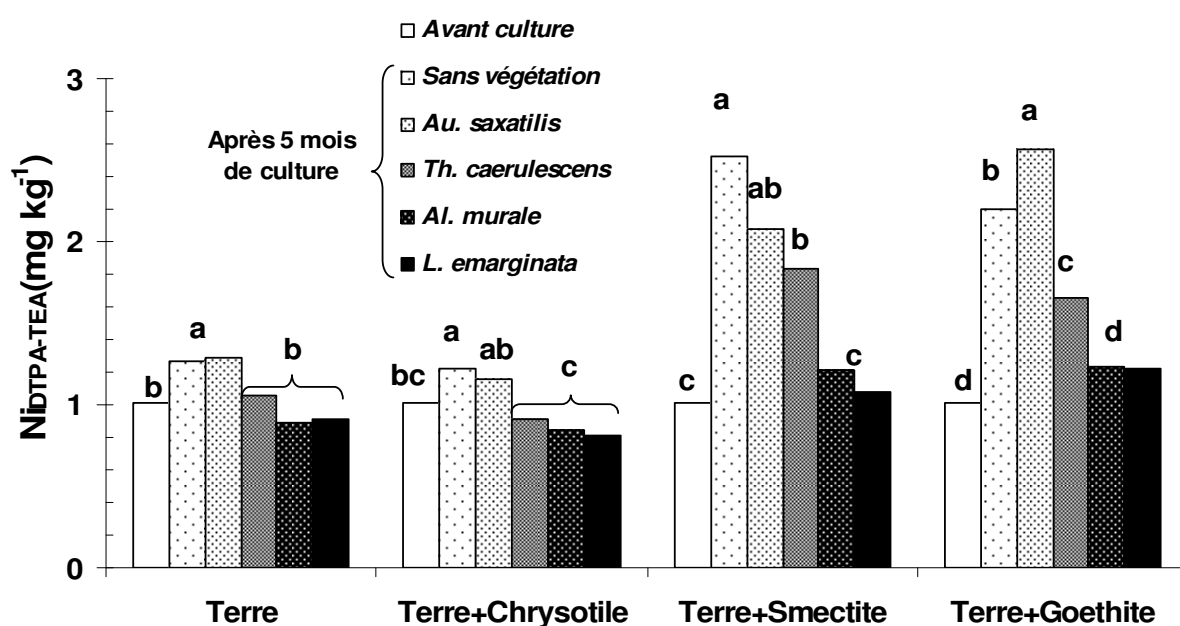


Figure 38. Concentration du Ni extractible au DTPA-TEA dans l'ensemble du substrat de culture pour chaque traitement. *a,b,c* : analyse de variance effectuée entre les différentes modalités pour chaque traitement **Terre+minéral** (Newman-Keuls, $p=0,05$).

B. Caractérisation des transferts de Ni au sein du substrat

La terre de remplissage ayant une faible capacité de sorption vis-à-vis du Ni, les transferts de Ni au sein de celle-ci peuvent être suivis à partir des concentrations du Ni extractible au DTPA-TEA, mesurées dans les différentes zones de prélèvement A, B, C et D (Figure 29).

Pour le traitement témoin sans apport de minéral, la concentration du Ni extractible est plus élevée en surface (zone A) par rapport aux zones B, C, et D, excepté pour la modalité avec *Au. saxatilis* pour laquelle $Ni_{DTPA-TEA}$ diminue quasiment de moitié (Figure 39). En présence de **Chrysotile**, $Ni_{DTPA-TEA}$ au terme de la culture est similaire au témoin sans apport de minéral. Aussi, l'introduction de **Chrysotile** dans le système n'a pas eu d'impact sur la répartition du Ni au sein de la terre de remplissage.

En présence de **Smectite** et de **Goethite**, les teneurs du Ni phytodisponible les plus élevées au sein du substrat ont été mesurées dans la zone directement au contact des sachets contenant les minéraux (zone C). L'augmentation de la concentration du Ni disponible en surface est toujours visible, notamment après la culture des trois espèces hyperaccumulatrices, mais minimisée par la teneur en Ni de la zone C.

La présence des plantes hyperaccumulatrices, et notamment de *Al. murale* et de *L. emarginata*, a fortement atténué l'augmentation de la concentration en Ni phytodisponible dans la zone C, par rapport aux modalités *Sans végétation* et *Au. saxatilis*. Après la culture de *L. emarginata*, $Ni_{DTPA-TEA}$ a diminué de 69 % sur le traitement **Terre+Smectite** et de 39 % sur le traitement **Terre+Goethite** (par rapport à la modalité *Sans végétation*). En revanche, la culture de *Au. saxatilis* a conduit à une importante augmentation du $Ni_{DTPA-TEA}$ dans la zone au contact de la goethite.

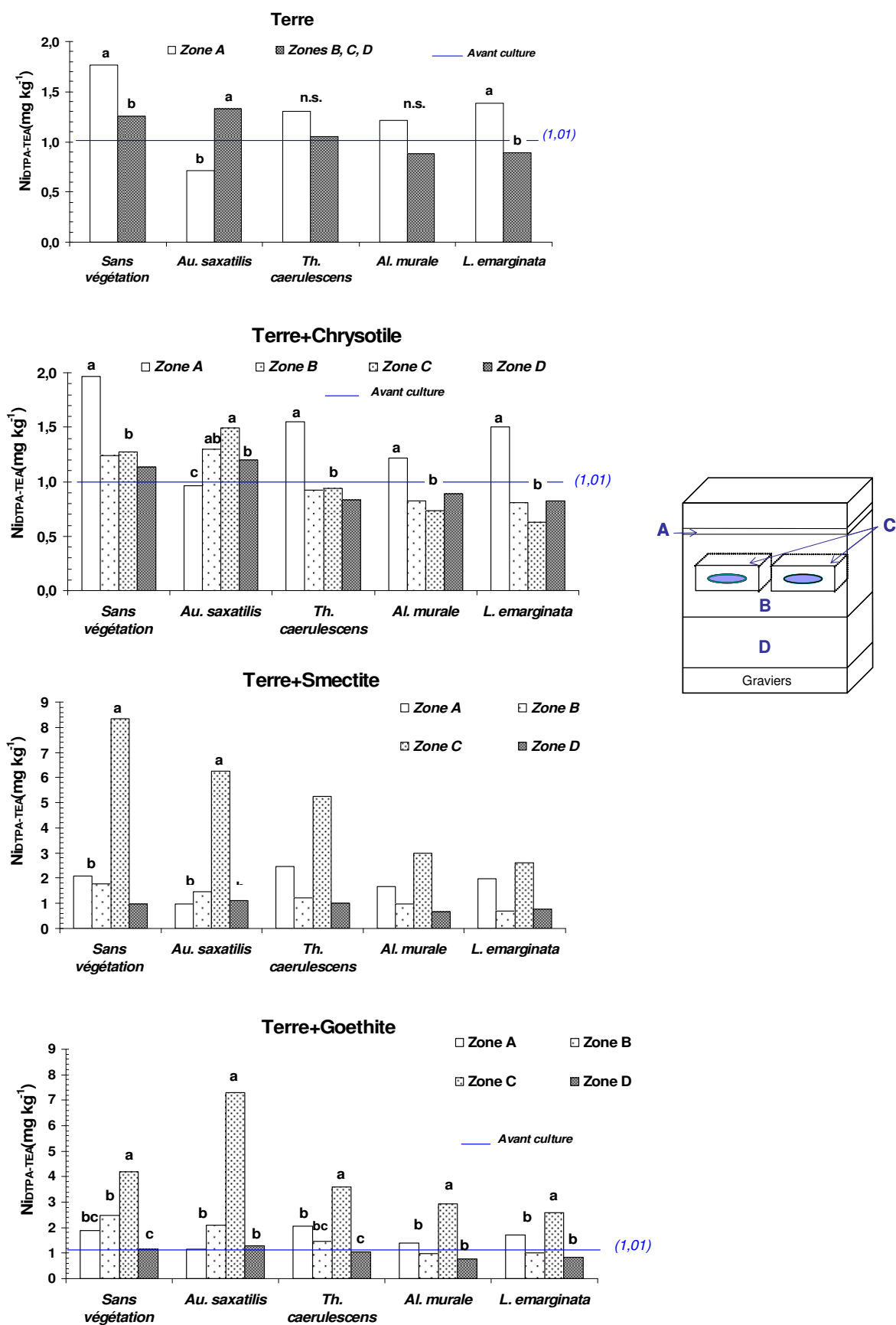


Figure 39. Concentration et répartition du Ni extractible au DTPA-TEA dans les différentes zones du substrat de culture. *a,b,c* : analyse de variance effectuée entre les différentes zones pour chaque modalité (Newman-Keuls, $p=0,05$).

$Ni_{DTPA-TEA}$ dans la zone directement en contact des minéraux porteurs de Ni est hautement corrélé ($R^2=0,98$) à la teneur initiale du Ni extractible au *DTPA-TEA* des phases minérales (Figure 40). Aussi, le transfert du Ni dans la terre au contact des sachets après la culture est d'autant plus important que la disponibilité initiale du Ni au sein du minéral est élevée.

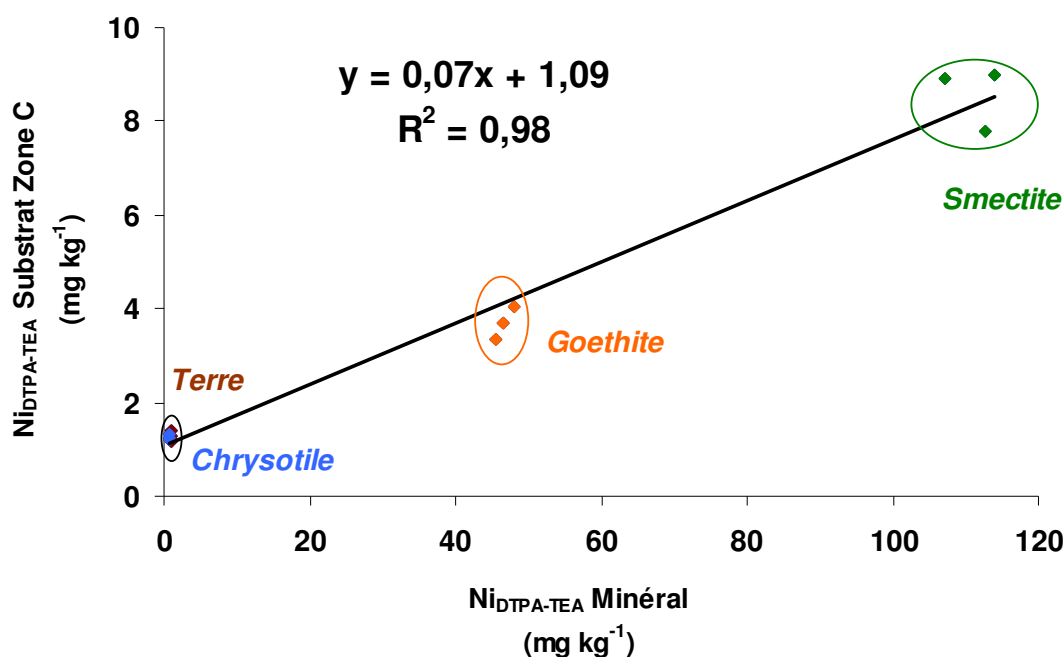


Figure 40. Relation entre la disponibilité initiale du Ni au sein des minéraux tests ($Ni_{DTPA-TEA}$ Minéral) et la disponibilité du Ni mesurée dans la zone C du substrat de culture ($Ni_{DTPA-TEA}$ Substrat Zone C) des différents traitements.

Pour chaque zone A, B, C et D du substrat de culture, la concentration du Ni hydrosoluble, mesurée pour l'ensemble des modalités après culture, a été représentée en fonction de la concentration en Ni disponible $Ni_{DTPA-TEA}$ correspondante (Figure 41). Le rapport $Ni_{H_2O}/Ni_{DTPA-TEA}$ est significativement plus faible en présence des phases minérales nickélifères par rapport au témoin sans apport des minéraux. Néanmoins, la distribution du Ni au sein de la terre de remplissage est indépendante de la nature et de la teneur du Ni disponible des minéraux insérés dans le système (Régression linéaire au seuil de confiance de 95 % ; Annexe 8).

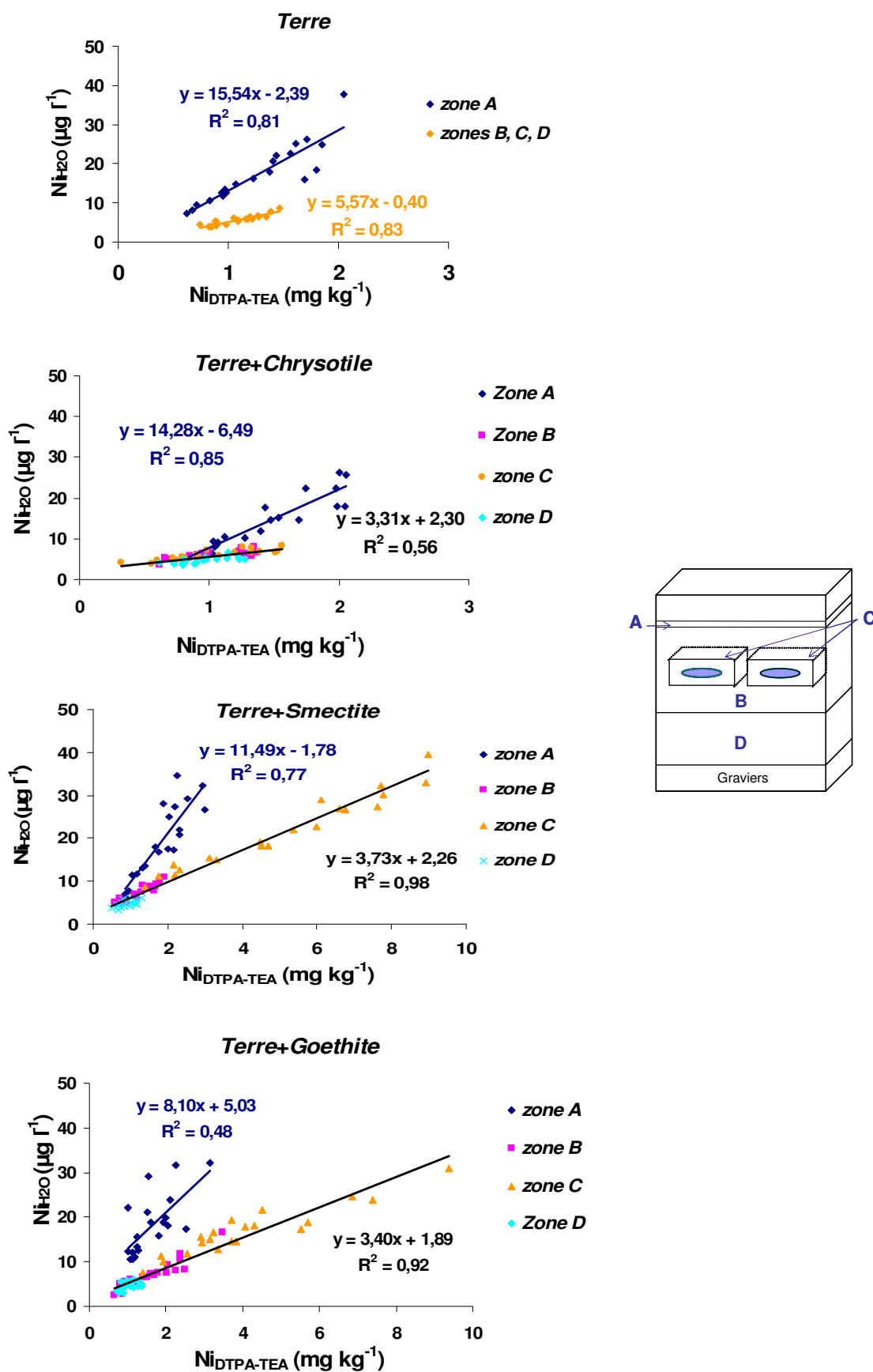


Figure 41. Relation entre la concentration en Ni hydrosoluble Ni_{H_2O} et la concentration en Ni extractible au DTPA-TEA $Ni_{DTPA-TEA}$ dans les différentes zones du rhizotron pour chaque traitement.

Les résultats montrent des relations significatives de type linéaire entre Ni_{H_2O} et $Ni_{DTPA-TEA}$, de sorte que, plus il y a de Ni disponible dans le substrat, plus la concentration du Ni en solution est élevée. Ces relations linéaires signifient que les échanges entre Ni adsorbé et Ni en solution dans la terre de remplissage sont à l'équilibre. Toutefois, la relation entre Ni_{H_2O} et $Ni_{DTPA-TEA}$ observée pour la zone A diffère de celles mesurées pour les zones B, C et D, et ce de la même manière quel que soit le traitement considéré. Pour une même valeur de $Ni_{DTPA-TEA}$, la concentration du Ni hydrosoluble mesurée dans la zone A est jusqu'à 4 fois plus élevée (**Terre+Chrysotile**) par rapport à celles mesurées dans les zones B, C et D.

Les valeurs de Ni_{H_2O} et de $Ni_{DTPA-TEA}$, nous ont permis de calculer les valeurs du coefficient de distribution (K_d) du Ni entre la solution et la phase solide (Ni adsorbé) au sein du système (Annexe 9). Les valeurs de K_d obtenues pour les différents traitements ne sont pas significativement différentes. Elles sont en moyenne de 75 l kg^{-1} en surface, et de 178 l kg^{-1} pour le reste du substrat (zones B, C, D), tous traitements confondus.

Les minéraux insérés dans le substrat n'ont pas eu d'influence sur le pH de la terre. Les valeurs de pH et les variations observées entre les différentes zones du substrat sont similaires quel que soit le traitement (Figure 42). Au terme de la culture, le pH de la terre de surface (zone A) a peu varié en absence de plante par rapport au pH initial de la terre. En revanche, celui-ci est plus élevé en présence des plantes, et notamment en présence de *Au. saxatilis*. Le pH mesuré dans les zones C et D a également augmenté, sans jamais dépasser une valeur de 5,3 unités pH. La zone B est la seule partie du substrat pour laquelle ont été observées de légères diminutions du pH de la terre. Cette diminution est visible après la culture de *Au. saxatilis* et de *Th. caerulescens*, ainsi que pour le témoin *Sans végétation*, notamment pour le traitement **Terre+Smectite**.

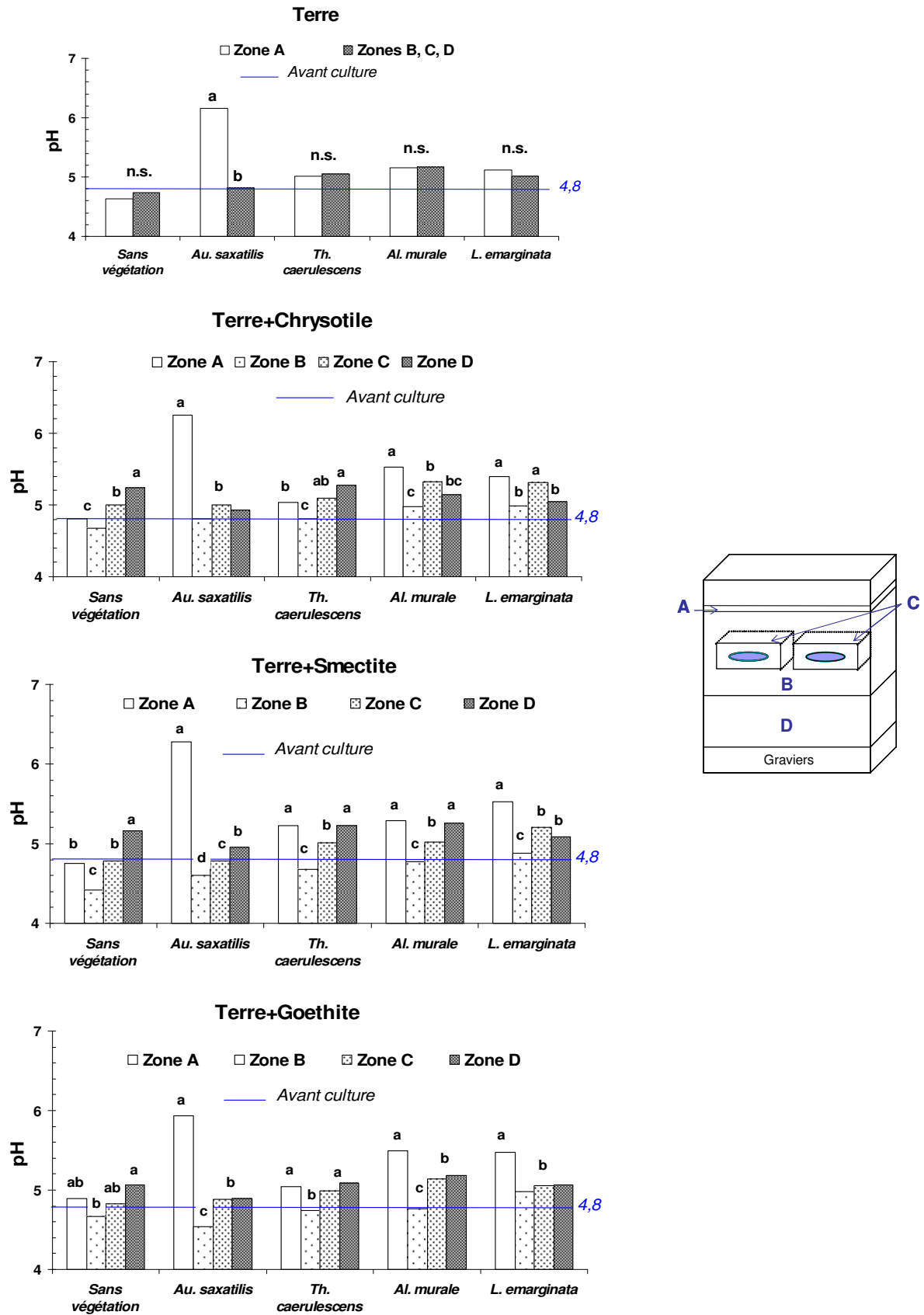


Figure 42. Evolution du pH de la terre après la culture au sein des différentes zones du rhizotron. *a,b,c* : analyse de variance effectuée entre les différentes zones pour chaque modalité (Newman-Keuls, $p=0,05$).

2.2. Bilan des transferts de Ni dans le système terre- plante

2.2.1. Influence des plantes sur la disponibilité du Ni dans la terre

Comme nous l'avons vu précédemment, la présence des plantes hyperaccumulatrices a entraîné une diminution significative de la quantité de Ni disponible dans la terre. Les relations entre la quantité de Ni extractible au DTPA-TEA et la quantité de Ni accumulé **par les hyperaccumulateurs** sont de type exponentiel (Figure 43). $QNi_{DTPA-TEA}$ dans la terre après culture est d'autant plus faible que la quantité de Ni accumulée par les plantes est élevée. L'efficacité des plantes hyperaccumulatrices en terme d'accumulation du Ni est proportionnelle à la quantité totale de Ni disponible au sein du système pendant la culture (représentée par la modalité *Sans végétation* de chaque traitement) (Figure 39) *i.e.* **Terre+Smectite** et **Terre+Goethite** >> **Terre+Chrysotile** et **Terre**.

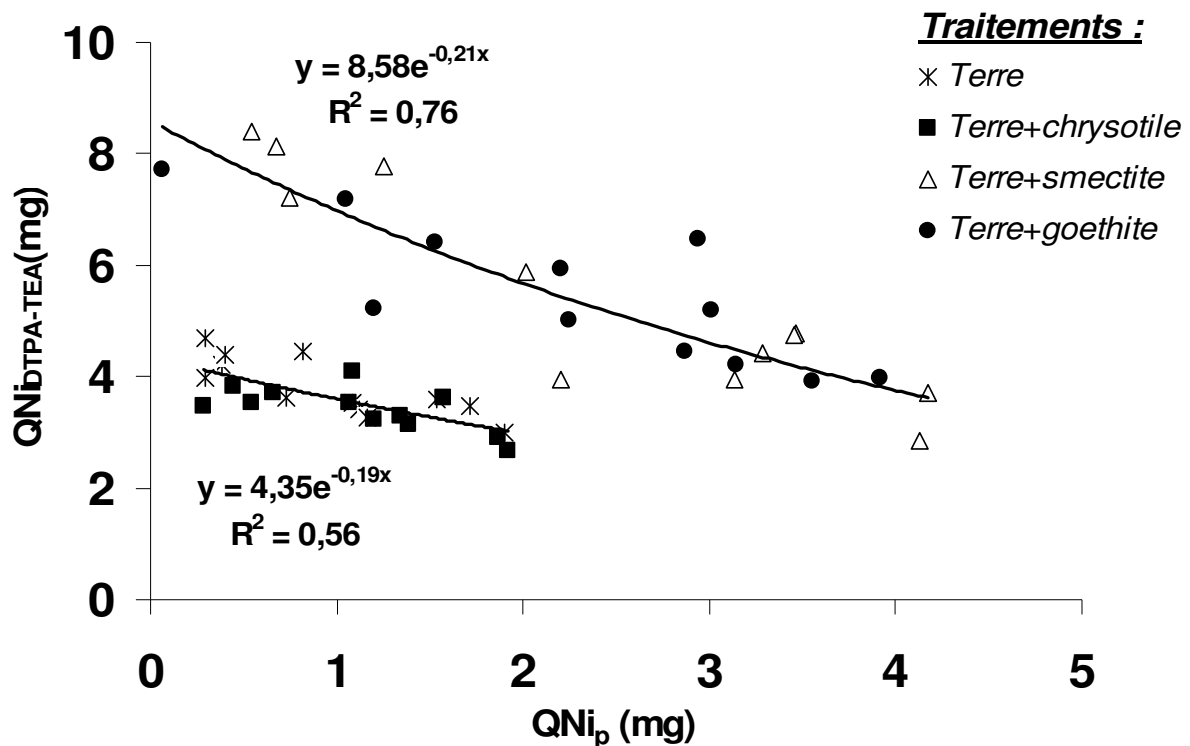


Figure 43. Relation entre la quantité de Ni disponible dans l'ensemble de la terre de remplissage après culture et la quantité de Ni prélevée par les plantes hyperaccumulatrices pour les différents traitements.

2.2.2. Influence des plantes sur l'altération des minéraux tests

A. Chrysotile

Après cinq mois de culture, le système terre- plante en présence de **Chrysotile** a évolué similairement au témoin sans apport de phase minérale porteuse de Ni. De ce fait, les valeurs obtenues sont proches de zéro (Tableau 14). La présence du **Chrysotile** au sein du substrat n'a eu d'impact quantifiable ni sur la phytodisponibilité du Ni, ni sur le prélèvement de Ni par les hyperaccumulateurs.

Nous avons montré dans le chapitre IV (Figure 27A) que la cinétique d'altération du **Chrysotile** suivait une loi puissance telle que :

$$Ni_{libéré} = 0,11 t^{0,39} (R^2=0,95) \quad [8]$$

Avec : $Ni_{libéré}$, la quantité de Ni libérée par l'altération du **Chrysotile** (en $\mu\text{g g}^{-1}$) ; t le nombre de jour de culture soit 150 jours.

D'après l'équation 8, la quantité théorique de Ni libérée dans le substrat pour 8 g de **Chrysotile** après cinq mois de culture sans plante serait de l'ordre de 6 μg . Cette quantité est très faible en comparaison des quantités de Ni disponible mesurées dans le système. Elle est nettement inférieure aux écarts-types obtenus entre les quatre répétitions, qui sont de l'ordre de la centaine de μg . Par conséquent, une éventuelle altération du **Chrysotile** ne serait pas perceptible dans le système. La culture n'a donc pas influencé de manière quantifiable l'altération du **Chrysotile**. Il est néanmoins possible de remarquer que *Al. murale* est la seule espèce qui montre un bilan des quantités totales libéré du minéral positif.

Tableau 14. Evaluation des quantités de Ni libérées par altération du **Chrysotile** après 5 mois de culture. *a,b,c* : analyse de variance effectuée entre les différentes modalités, *n.s.* : non significatif (Newman-Keuls, $p=0,05$).

	Quantité de Ni		
	transférée vers la terre	Quantité de Ni transférée vers les plantes	Quantité totale libérée par le Chrysotile
mg			
Sans végétation	-0,17		-0,17 <i>ab</i>
Au. saxatilis	-0,52	+0,10 <i>b</i>	-0,42 <i>ab</i>
Th. caerulescens	-0,56 <i>n.s</i>	-0,056 <i>b</i>	-0,62 <i>b</i>
Al. murale	-0,19	+0,55 <i>a</i>	+0,36 <i>a</i>
L. emarginata	-0,39	-0,009 <i>b</i>	-0,40 <i>ab</i>

B. Smectite

Au terme de la culture, la **Smectite** aurait libéré dans le système jusqu'à 5,01 mg de Ni pour la modalité *Sans végétation* (Tableau 15). Les quantités de Ni libérées par le minéral en présence des plantes sont significativement inférieures à celles mesurées pour le témoin sans plante. Ainsi, la présence des plantes (hyperaccumulatrices ou non) ralentirait l'altération « naturelle » de la **Smectite** induite par les seules conditions expérimentales.

En présence de *L. emarginata* et de *Al. murale*, la majorité du Ni libéré est prélevée et accumulée dans les plantes, contrairement à *Th. caerulescens* et à *Au. saxatilis*. L'altération de la **Smectite** a tendance à être plus importante lorsque le prélèvement de Ni par les plantes hyperaccumulatrices est plus faible.

La quantité de Ni échangeable en cinq mois de culture dans 8 g de **Smectite**, estimable par la valeur $E_{(5\text{mois})}$ des CEI (Chapitre IV), est de 57,4 mg. Aussi, la quantité de Ni libérée dans le système au terme de la culture par la **Smectite** correspond à 9 % de $E_{(5\text{mois})}$ pour le témoin sans plante, et à 6 % de $E_{(5\text{mois})}$ en moyenne en présence des espèces végétales. La quantité de Ni libérée au terme de la culture par l'altération de la **Smectite** représenterait moins de la moitié de la quantité de Ni rapidement échangeable ($E_{(0-1\text{min})}$; Chapitre IV) initialement présent dans les échantillons minéraux (*i.e.* 40 % pour le témoin sans plante ; et 25 % en moyenne en présence des plantes). Les espèces hyperaccumulatrices *Al. murale* et surtout *L. emarginata* ont prélevé plus de la moitié du Ni libéré par l'altération de la **Goethite** (*i.e.* 58 % pour *Al. murale* et 75 % pour *L. emarginata*). En revanche, *Th. caerulescens* n'en a prélevé que 16 %.

Tableau 15. Evaluation des quantités de Ni libérées par la **Smectite** après 5 mois de culture. *a,b,c* : analyse de variance effectuée entre les différentes modalités (Newman-Keuls, $p=0,05$).

	Quantité de Ni transférée vers la terre	Quantité de Ni transférée vers les plantes	Quantité totale libérée par la Smectite
	mg		
Sans végétation	+5,01 <i>a</i>		+5,01 <i>a</i>
Au. saxatilis	+3,14 <i>ab</i>	+0,10 <i>b</i>	+3,24 <i>b</i>
Th. caerulescens	+3,11 <i>ab</i>	+0,60 <i>ab</i>	+3,71 <i>b</i>
Al. murale	+1,27 <i>b</i>	+1,74 <i>a</i>	+3,01 <i>b</i>
L. emarginata	+0,67 <i>b</i>	+2,06 <i>a</i>	+2,73 <i>b</i>

C. Goethite

La culture des plantes hyperaccumulatrices n'a pas eu d'effet significatif sur l'altération de la **Goethite** (Tableau 16). La présence des hyperaccumulateurs aurait même tendance à limiter l'altération du minéral par rapport à une altération induite par les conditions expérimentales en absence des plantes (-0,68 mg de Ni extrait en moyenne). *L. emarginata* et *Al. murale* ont prélevé plus de la moitié du Ni libéré par l'altération de la **Goethite**. En revanche, *Th. caerulescens* n'en a prélevé que 23 %. La présence de l'espèce non accumulatrice *Au. saxatilis* favoriserait l'altération de la **Goethite** (+1,45 mg de Ni libéré par rapport à la modalité *Sans végétation*). Seulement 2 % du Ni libéré par la **Goethite** auraient été absorbés par la plante ; 98 % seraient restés dans la terre sous forme disponible. A la différence des espèces hyperaccumulatrices, *Au. saxatilis* a prélevé seulement 2 % du Ni libéré.

Tableau 16. Evaluation des quantités de Ni libérées par la **Goethite** après 5 mois de culture. *a,b,c* : analyse de variance effectuée entre les différentes modalités (Newman-Keuls, p=0,05).

	Quantité de Ni transférée	Quantité de Ni transférée	Quantité totale libérée
	vers la terre	vers les plantes	par la Goethite
mg			
Sans végétation	+3,72 <i>ab</i>		3,72 <i>b</i>
<i>Au. saxatilis</i>	+5,08 <i>a</i>	+0,10 <i>b</i>	5,17 <i>a</i>
<i>Th. caerulescens</i>	+2,42 <i>bc</i>	+0,42 <i>b</i>	2,85 <i>b</i>
<i>Al. murale</i>	+1,34 <i>c</i>	+1,79 <i>a</i>	3,13 <i>b</i>
<i>L. emarginata</i>	+1,26 <i>c</i>	+1,86 <i>a</i>	3,12 <i>b</i>

Nous avons montré dans le chapitre IV (Figure 28A) que la cinétique d'altération de la **Goethite** suivait une loi logarithmique telle que :

$$Ni_{libéré} = 28,75 \ln(t) + 224,55 \quad [9]$$

Avec : $Ni_{libéré}$, la quantité de Ni libérée par l'altération du **Chrysotile** (en mg g⁻¹) et t , le nombre de jour de culture soit 150 jours.

D'après cette l'équation 9, la quantité théorique de Ni libéré dans le substrat pour 8 g de **Goethite** après cinq mois de culture sans végétation serait de l'ordre de 2,95 mg. Ce résultat est similaire à ceux obtenus d'après le bilan de masse en présence des hyperaccumulateurs (Tableau 16). Cela renforce le fait que la présence des espèces hyperaccumulatrices n'a pas eu d'effet sur l'altération de la **Goethite**.

Une fois la fraction de Ni adsorbé à la surface de la **Goethite** passée en solution, le Ni inclus dans le réseau cristallin du minéral n'est quasiment plus échangeable (Tableau 13). Seule la dissolution du minéral peut alors réapprovisionner la solution du sol. La quantité de Ni issue de la dissolution de la **Goethite** peut s'exprimer par la différence entre (i) la quantité totale de Ni libérée par le minéral après la culture (Tableau 16) et (ii) la quantité de Ni échangeable en 5 mois mesurée par la méthode des CEI sur le minéral avant culture *i.e.* $E_{(5\text{mois})} = 2,45$ mg (soit environ 2 % de la teneur totale du Ni de la **Goethite**) (Tableau 13). La quantité de Ni libéré par dissolution de la **Goethite** après cinq mois d'expérimentation est ainsi estimée à 1,27 mg pour le témoin sans plante, et à 2,72 mg de Ni en présence d'*Au. saxatilis*. Ces quantités représentent respectivement 34 % et 53 % de la quantité totale de Ni libérée par la **Goethite** après la culture. En revanche, la présence des espèces hyperaccumulatrices n'a pas ou peu favorisé la dissolution de la **Goethite**.

3. Discussion

3.1. Transferts de Ni dans le système minéral-terre

L'étude de la distribution du Ni au sein du système minéral-terre, indépendamment de la présence des plantes, nous a permis de constater que le Ni libéré par l'altération des minéraux nickélifères a exclusivement migré vers la zone au contact des sachets contenant ces derniers. Les transferts de Ni dépendent fortement de la localisation du métal au sein des minéraux tests. Lorsque la fraction de Ni disponible et le pouvoir tampon du minéral sont quasiment nuls, il n'y a pas ou très peu de transfert apparent du Ni vers le substrat. C'est le cas du **Chrysotile**. En revanche, lorsque la fraction de Ni disponible est importante, le métal passe en solution et diffuse dans le substrat. Ce phénomène est facilement observable dans le cas de la **Goethite** dont le pouvoir tampon est quasiment nul. Ainsi, une fois que la fraction de Ni adsorbée à la surface du minéral est passée en solution et a été transférée vers la terre de remplissage du rhizotron, il ne reste que la fraction de Ni incluse au sein du réseau cristallin du minéral (représentée par la valeur $E_{(>5\text{mois})}$). A l'inverse du **Chrysotile** et surtout de la **Goethite**, la **Smectite** possède un fort pouvoir tampon. En effet, 58 % de la teneur totale du Ni du minéral sont échangeables en 5 mois. Les compartiments de Ni les plus échangeables, qui alimentent la solution du sol, sont rapidement réapprovisionnés par les compartiments les moins échangeables. Ainsi, la disponibilité apparente du Ni au sein du minéral reste assez élevée après la culture malgré une importante migration du Ni vers le substrat. Même si l'hypothèse d'une dissolution du minéral ne peut être écartée, le réapprovisionnement de la

solution semble toutefois être régi par les compartiments isotopiquement échangeables de Ni, car la quantité de Ni initialement phytodisponible au sein du minéral ($QNi_{DTPA-TEA} = 3,56$ mg) est du même ordre de grandeur que les quantités totales de Ni libérées par la **Smectite**, calculées d'après le bilan. De plus, les quantités totales de Ni libérées par le minéral représentent moins de 10 % du Ni initialement échangeable en 5 mois, mesuré par CEI.

En fin d'expérimentation, les enrichissements en Ni observés à la surface du substrat de culture des rhizotrons (avec ou sans plante) seraient liés aux nombreux cycles d'humectation-dessiccation (~100) provoqués au cours de la culture en serre. A chaque période de dessiccation (évaporation ou évapotranspiration sans arrosage), la terre en surface du rhizotron s'assèche, induisant un gradient de pression entre le terre humide et sa surface sèche. Lors de la période suivante d'humectation, le gradient de pression, le mode d'arrosage (remontée capillaire) et les propriétés de la terre, entraînent au tout début de la remontée capillaire une invasion capillaire extrêmement rapide de la solution au sein de la terre de des rhizotrons. Cela permet potentiellement d'induire une importante accélération du transfert du Ni et des autres solutés présents en solution, du sol humide vers la surface sèche du sol. L'enrichissement de Ni en surface additionné aux dessèchements fréquents et rapides de cette zone, entraînerait la précipitation de sels de Ni fortement hydrosolubles (K_d en surface $\gg K_d$ dans le reste de la terre). La présence des phases minérales nickélicifères au sein du substrat n'a pas eu d'influence significative sur les transferts de Ni vers la surface de la terre.

3.2. Influence de la culture de plante sur la fraction de Ni disponible de la terre et sur l'altération des minéraux nickélicifères

La culture des espèces hyperaccumulatrices, et notamment de *Al. murale* et de *L. emarginata*, a permis de réduire considérablement la quantité de Ni disponible au sein du substrat. L'efficacité du prélèvement du Ni par les hyperaccumulateurs est proportionnelle à la quantité de Ni rapidement échangeable du substrat de culture, *i.e.* **Terre ~ Terre+Chrysotile \ll Terre+Goethite $<$ Terre+Smectite**. Le potentiel de phytoextraction des espèces hyperaccumulatrices vis-à-vis du Ni (quel que soit le milieu de culture) est tel que : *L. emarginata* $>$ *Al. murale* $>$ *Th. caerulescens*. Ces résultats sont en concordance avec ceux observés par Chardot *et al.* (2005) pour les mêmes espèces cultivées en vases de végétation sur différents sols (dont un sol de serpentine). La capacité d'extraction du Ni par les plantes hyperaccumulatrices étudiées dépend de deux paramètres essentiels : (i) la production de biomasse (*Al. murale* $>$ *L. emarginata* \gg *Th. caerulescens*) ; et (ii) la capacité des plantes à concentrer le métal au niveau des feuilles (*L. emarginata* $>$ *Al. murale* $>$ *Th.*

caerulescens). La présence des phases minérales au sein du substrat n'a pas eu d'impact significatif sur la production de biomasse des différentes espèces végétales. Néanmoins, *L. emarginata* montre une tendance à produire plus de biomasse lorsque l'offre en Ni disponible du milieu de culture est plus élevée (*i.e.* en présence de **Goethite** et de **Smectite**).

Le potentiel élevé de *L. emarginata* et de *Al. murale* vis-à-vis de l'extraction du Ni du sol par rapport à celui de *Th. caerulescens*, pourrait être lié à des facteurs physiologiques tels que l'architecture et la morphologie des racines et/ ou la capacité de translocation du Ni des racines vers les feuilles. A la différence des résultats obtenus avec *Th. caerulescens* et le Zn (Schwartz, 1997 ; Schwartz *et al.*, 1999), les racines des différentes espèces n'ont pas développé de morphologie particulière, ni de distribution préférentielle face à une zone enrichie en Ni. Chez les hyperaccumulateurs, le rapport élevé [biomasse des racines/biomasse des parties aériennes] semble être un facteur important permettant de faciliter le prélèvement des métaux (Keller *et al.*, 2003 ; Keller, 2006). Le système racinaire de *L. emarginata* et de *Al. murale* (racines très nombreuses) pourrait être une adaptation visant entre autre à faciliter l'absorption par les racines du Ni présent dans le substrat, en augmentant la surface de sol prospectée et/ou en augmentant la surface de contact entre le sol et la racine. Chez les espèces hyperaccumulatrices, l'efficacité du transfert du Ni des racines vers les feuilles (*L. emarginata* > *Al. murale* > *Th. caerulescens* (> *Au. saxatilis*)) pourrait également favoriser le prélèvement du Ni du sol et son accumulation dans les parties foliaires.

La présence des plantes hyperaccumulatrices n'a pas eu d'impact quantifiable sur la mobilisation du Ni au travers de l'altération nette du **Chrysotile** et de la **Goethite** (*i.e.* par dissolution ou désorption du Ni). Elle semble même avoir limité l'altération naturelle de la **Smectite** induite par les seules conditions expérimentales. Deux hypothèses sont alors envisageables :

- l'hyperaccumulation du Ni joue un rôle spécifique dans la survie de la plante hyperaccumulatrice, autre qu'un mécanisme de tolérance au Ni (Martens et Boyd, 2002) et, dans le cas de notre expérimentation, l'offre en Ni phytodisponible était suffisante pour répondre aux besoins des hyperaccumulateurs. Les teneurs élevées en Ni mesurées dans les graines des hyperaccumulateurs vont dans le sens de cette hypothèse. L'accumulation du Ni au niveau des graines signifierait que les premiers stades de développement des hyperaccumulateurs (au moins) nécessitent d'importantes quantités de Ni, largement supérieures à celles des espèces non accumulatrices.

- l'hyperaccumulation est un mécanisme de détoxification qui permet de diminuer la fraction de Ni disponible au niveau de la rhizosphère. Dans ce cas, les plantes limitent la toxicité du Ni en prélevant la fraction de Ni disponible du sol. Ainsi, lorsque le sol est dépourvu en Ni disponible, la plante ne favorise pas l'altération des phases porteuses de Ni afin de mobiliser le métal.

A la différence des hyperaccumulateurs, la culture de l'espèce non accumulatrice *Au. saxatilis* aurait favorisé l'altération de la **Goethite**, conduisant à l'augmentation de la fraction de Ni phytodisponible au sein du substrat. *Au. saxatilis* est une espèce dite « excluante », capable de limiter l'entrée de Ni dans ses tissus, même lorsque la teneur en Ni phytodisponible est élevée (e.g. en présence de **Smectite** et de **Goethite**). L'altération de la **Goethite** serait liée aux processus physiologiques, spécifiques au fonctionnement de cette plante. Par exemple, chez les espèces excluantes telles que *T. arvense*, la production et l'exsudation d'acides organiques (e.g. acide citrique) permettraient la détoxification du Ni (Salt *et al.*, 2000 ; Boominathan et Doran, 2003). Toutefois, Marcusen *et al.* (2003) ont montré que la présence d'acide citrique dans le milieu n'influçait pas la sorption du Ni sur la goethite.

4. Conclusion

Le prélèvement du Ni par les plantes hyperaccumulatrices dépend, d'une part, de la biodisponibilité du Ni dans les sols et, d'autre part, du potentiel de phytoextraction des espèces hyperaccumulatrices.

Les plantes hyperaccumulatrices absorbent le Ni proportionnellement à la quantité de Ni disponible dans le sol. La présence de phases minérales nickélicifères à forte disponibilité en Ni (e.g. **Smectite**) dans les sols contribue fortement à l'accumulation du Ni dans les parties aériennes des hyperaccumulateurs. En revanche, en présence de Ni phytodisponible dans le milieu, les minéraux à faible disponibilité en Ni (e.g. **Chrysotile**) n'influencent pas l'accumulation du Ni dans les plantes. Les plantes hyperaccumulatrices sont capables de réduire considérablement la fraction de Ni initialement disponible du sol.

L. emarginata est l'espèce qui présente le potentiel de phytoextraction le plus élevé, quelle que soit la fraction de Ni disponible dans le milieu. L'hyperaccumulation du Ni dépend de la capacité de chaque espèce (i) à produire de la biomasse ; et (ii) à prélever le Ni du sol, à le transférer et à l'accumuler dans les parties foliaires. Chez les espèces *L. emarginata* et *Al. murale*, l'architecture et la morphologie du système racinaire, ainsi que la forte capacité de

translocation du Ni des racines vers les feuilles, pourraient jouer un rôle important dans le prélèvement et l'accumulation du Ni. La translocation du Ni chez les espèces hyperaccumulatrices les plus performantes en terme d'extraction du Ni pourrait faire intervenir des processus spécifiques (mobilisation du Ni par des molécules organiques spécifiques? Transfert du Ni facilité par des transporteurs membranaires?). En présence de Ni disponible dans les sols, les espèces hyperaccumulatrices ne semblent pas influencer de manière quantifiable l'altération des minéraux porteurs de Ni présents au sein du milieu de culture. Elles semblent se contenter de quantités limitées de Ni disponible, et pourraient par conséquent se développer sans problème hors des milieux ultramafiques.

Chapitre VI

Spéciation du nickel dans les tissus des plantes hyperaccumulatrices

La formation de complexes organo-métalliques peut faciliter le transport du Ni du sol rhizosphérique vers la racine, jusqu'aux feuilles des plantes hyperaccumulatrices. Les principaux composés organiques impliqués dans les transferts du métal au sein de la plante seraient des acides organiques (principalement du citrate et/ou du malate) (Lee *et al.*, 1978 ; Brooks *et al.*, 1981 ; Krämer *et al.*, 2000 ; Schaumlöffel *et al.*, 2003), des acides aminés *e.g.* histidine (Krämer *et al.*, 1996 ; Kerkeb et Krämer, 2003 ; Salt *et al.*, 1999), ou des dérivés d'acides aminés *e.g.* nicotianamine (Vacchina *et al.*, 2003 ; Ouerdane *et al.*, 2006). La nature des molécules organiques impliquées dans le transport semble dépendre, d'une part, de l'espèce hyperaccumulatrice considérée et, d'autre part, de l'organe végétal au niveau duquel se trouve le Ni (racines, tiges, feuilles). L'histidine (*His*) serait largement impliquée dans l'hyperaccumulation du Ni et du Zn, notamment en favorisant la translocation du métal des racines vers les parties aériennes des plantes (Krämer *et al.*, 1996 ; Kerkeb et Krämer, 2003 ; Salt *et al.*, 1999).

L'objectif de ce chapitre est de déterminer la spéciation du Ni dans les organes de trois espèces hyperaccumulatrices (racines, tiges, feuilles) n'ayant pas les mêmes capacités en terme d'extraction du Ni. Ainsi, nous pourrions établir si les formes chimiques Ni au sein des tissus des hyperaccumulateurs a un impact sur l'efficacité de la phytoextraction. Pour répondre à cet objectif, des analyses en spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS) ont été effectuées sur des organes végétaux provenant de trois espèces hyperaccumulatrices cultivées pendant cinq mois dans des conditions proches de celles d'un sol.

1. Matériels et méthodes

1.1. Matériels

Les analyses XAS ont été effectuées sur des échantillons de racines, de tiges et de feuilles provenant des espèces *L. emarginata*, *Al. murale* et *Th. caerulescens*. Les échantillons proviennent des végétaux issus de la culture en rhizotron présentée dans le Chapitre V : les trois espèces hyperaccumulatrices ont été cultivées pendant cinq mois sur des échantillons de terre (4 kg) dans lesquels ont été insérées trois phases minérales nickélifères (**Chrysotile**, **Smectite** et **Goethite**). La culture en rhizotron a permis aux plantes de se développer dans des conditions proches de celles d'un sol, et pendant une durée suffisamment longue pour refléter le fonctionnement des plantes à un stade avancé de leur développement végétatif.

En fonction des phases minérales nickélifères insérées au sein du système, les plantes avaient accès à des quantités de Ni disponible variables, telles que : **Terre+Chrysotile** << **Terre+Goethite** < **Terre+Smectite**.

Des échantillons de végétaux frais ont été prélevés sur un seul rhizotron parmi les quatre répétitions d'une même modalité. Les concentrations du Ni dans les tissus des végétaux ayant été utilisés pour les analyses XAS ont été déterminées après minéralisation (Chapitre II) du reste de la biomasse (Tableau 17).

Tableau 17. Concentration du Ni dans les racines, les tiges et les feuilles des plantes hyperaccumulatrices utilisées pour les analyses XAS.

		Concentration en Ni dans les plantes		
		<i>mgNi kg(MS)⁻¹</i>		
		Terre+Chrysotile	Terre+Smectite	Terre+Goethite
<i>Th. caerulescens</i>	<i>Racines</i>	141,63	121,23	105,52
	<i>Feuilles</i>	164,82	426,83	390,42
<i>Al. murale</i>	<i>Racines</i>	25,22	57,43	70,46
	<i>Tiges</i>	74,64	181,07	135,22
	<i>Feuilles</i>	138,43	401,29	345,63
<i>L. emarginata</i>	<i>Racines</i>	21,69	57,26	34,06
	<i>Tiges</i>	107,93	209,51	150,37
	<i>Feuilles</i>	253,09	462,59	338,73

Les concentrations mesurées dans les échantillons végétaux utilisés pour l'analyse XAS sont représentatives des concentrations moyennes du Ni mesurées dans les tissus de l'ensemble des plantes qui se sont développées sur un même traitement (Figure 31, Chapitre V). Pour l'ensemble des espèces hyperaccumulatrices, les concentrations du Ni mesurées dans les tissus sont telles que : Feuilles > Tiges > Racines. Et, les concentrations du Ni mesurées dans les parties aériennes sont d'autant plus élevées que la quantité de Ni disponible initiale du milieu de culture était élevée (Figure 35, Chapitre V), de sorte que : **Terre+Smectite** > **Terre+Goethite** > **Terre+Chrysotile**.

1.2. Méthodes

La spéciation du Ni dans les différents organes des plantes hyperaccumulatrices a été déterminée par spectroscopie d'absorption des rayons X (Teo, 1986 ; Koningsberger et Prins, 1988 ; Aksenov *et al.*, 2001). La spéciation est mesurée sur des échantillons frais de végétaux (conservés dans l'azote liquide dès la récolte), sans préparation, extraction ou imprégnation de l'échantillon préalable. Cela permet ainsi d'éviter les modifications de la spéciation du Ni pouvant advenir lors de différents traitements chimiques. De plus cette méthode est non destructive. Elle permet de récupérer l'échantillon intact en fin de mesure.

1.2.1. Préparation des échantillons végétaux

Les feuilles, les tiges (absentes pour *Th. caerulescens*) et les racines des plantes hyperaccumulatrices ont été récoltées, séparées et rincées avec de l'eau distillée (>15 M Ω). Afin d'éviter des modifications chimiques au sein de la matière végétale, nous avons choisi d'effectuer une congélation rapide des échantillons en les immergeant dans l'azote liquide rapidement après leur récolte (Persans *et al.*, 1999 ; Krämer *et al.*, 2000 ; Küpper *et al.*, 2001). Quelques grammes d'échantillon de végétal frais ont été placés dans l'azote liquide, et broyés dans un mortier en porcelaine. L'addition régulière d'azote liquide a permis de garder les échantillons à 77 K (-196 °C) tout au long du broyage. Les échantillons broyés conservés dans l'azote liquide ont ensuite été placés dans des cellules en téflon recouvertes d'un film de kapton (7,5 μ m), puis légèrement compactés. Le film de kapton présente l'avantage de ne pas absorber le signal incident ou le signal de fluorescence lors des analyses XAS. Les échantillons ont été conservés dans l'azote liquide dans un deware spécifique jusqu'à leur analyse. Lors des analyses XAS, les échantillons ont été maintenus à la même température grâce à un cryostat à azote liquide.

1.2.2. Solutions modèles

Des solutions de référence contenant les complexes Ni-Ligand ont été préparées. Cinq composés organiques modèles, représentatifs des données bibliographiques, ont été étudiés : le succinate, le malate, le citrate, l'oxalate, et l'histidine. La composition des solutions de référence était telle que : Ni-Oxalate (7 mM NiNO₃ + 70 mM oxalate, pH 7,0) ; Ni-Citrate (6.7 mM NiNO₃ + 27 mM citrate, pH 7,0) ; Ni-Malate (7 mM NiNO₃ + 70 mM malate, pH 7,0) ; Ni-Succinate (7 mM NiNO₃ + 70 mM succinate, pH 7,0) ; Ni-Histidine (6.7 mM Ni + 80 mM histidine, pH 7,0).

La stabilité des complexes formés avec le Ni (Tableau 18) dépend (i) de la nature et de la structure du ligand organique (Figure 44); et (ii) du rapport métal/ligand.

Tableau 18. Constantes de stabilité K des différents complexes Ni-Ligand organique (^aMartell et Smith, 1974 ; ^bBissani, 2000 ; ^cHomer *et al.*, 1997 cité par Brooks, 1998 c).

<i>Ni-Ligand</i>	Log K	
	Ni-L	Ni-L ₂
<i>Ni-Succinate</i>	2,4 ^a	
<i>Ni-Malate</i>	3,2 ^b	
<i>Ni-Oxalate</i>	4,2 ^b	7,6 ^b
	3,7 ; 5,2 ^a	
<i>Ni-Citrate</i>	5,2 ^b	8,1 ^b
	4,8 ; 5,1 ; 5,4 ^a	7,8 ^c
<i>Ni-Histidine</i>	8,7 ^a	15,5 ^c

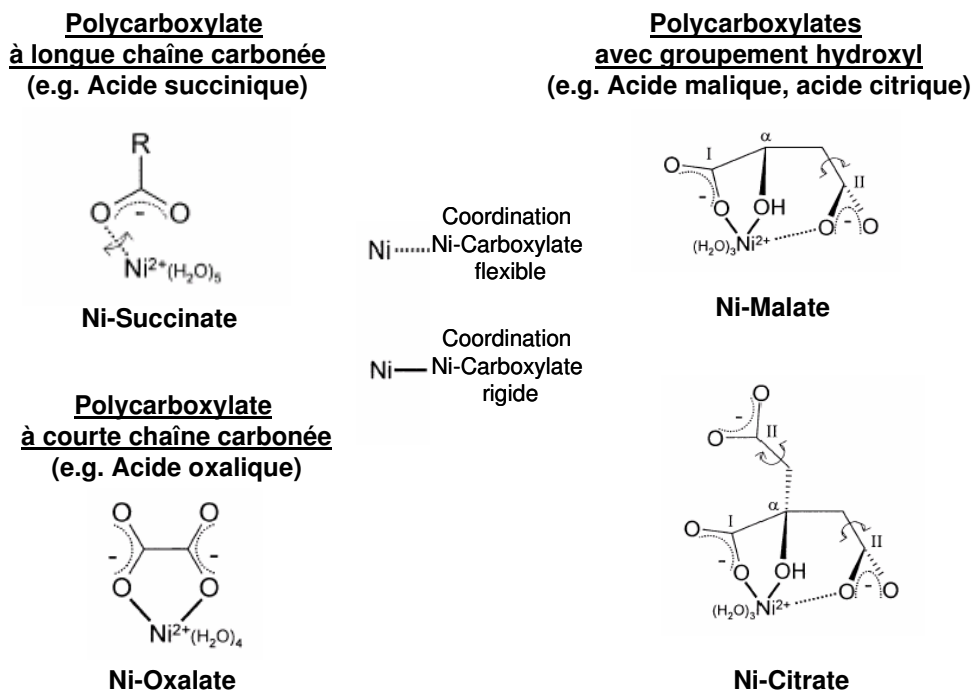


Figure 44. Représentation des structures de complexes Ni-L, Ni(II)-carboxylate (Strathmann et Myneni, 2004).

1.2.3. Acquisition des spectres XAS

L'analyse des échantillons a été effectuée sur la ligne de lumière 16.5 du CCLRC (Daresbury, UK). Cette ligne est particulièrement adaptée aux systèmes ultra-dilués. Le faisceau X est rendu monochromatique à l'aide d'un monochromateur équipé de cristaux Si(220). La ligne expérimentale est équipée d'un détecteur à 30 éléments. L'acquisition des spectres a été réalisée en mode fluorescence ; l'échantillon étant maintenu à un angle de 45 ° par rapport au faisceau incident. Le signal de fluorescence est amplifié par une électronique spécifique (high counts). Le temps de détection était de 10 s par point. Trois à dix acquisitions ont été effectuées pour chaque échantillon.

2. Résultats

2.1. XANES

La région XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure) renseigne sur l'état d'oxydation de l'élément étudié, et dépend de la symétrie du champ électrique local autour de l'atome central. Dans la région XANES, le pic de pré-seuil et le pic principal d'absorption sont tous deux sensibles à l'état d'oxydation et à la coordination du Ni.

2.1.1. Solutions de référence

Dans la région XANES, les pics de pré-seuil situés à 8332 eV obtenus pour l'ensemble des solutions de référence sont de faible intensité (Figure 45). Le pic de pré-seuil est théoriquement plus intense pour les molécules non centro-symétriques *i.e.* dans le cas de complexes en coordination V (géométrie bipyramidale trigonale et pyramidale carrée) ou de complexes en coordination IV (géométrie plane) (Colpas *et al.*, 1991). Cela indique que le Ni se trouverait en coordination octaédrique dans l'ensemble des solutions de référence.

Le complexe Ni-Histidine est caractérisé par un élargissement et un dédoublement du seuil d'absorption (à 8350 eV), permettant de le différencier des autres complexes étudiés. La forme de la bande située autour de 8365 eV varie en fonction de la nature du ligand. Cette bande apparaît mieux résolue pour les complexes Ni-Oxalate, Ni-Citrate et Ni-Malate. En revanche, celle-ci est difficilement observable sur le spectre du complexe Ni-Histidine.

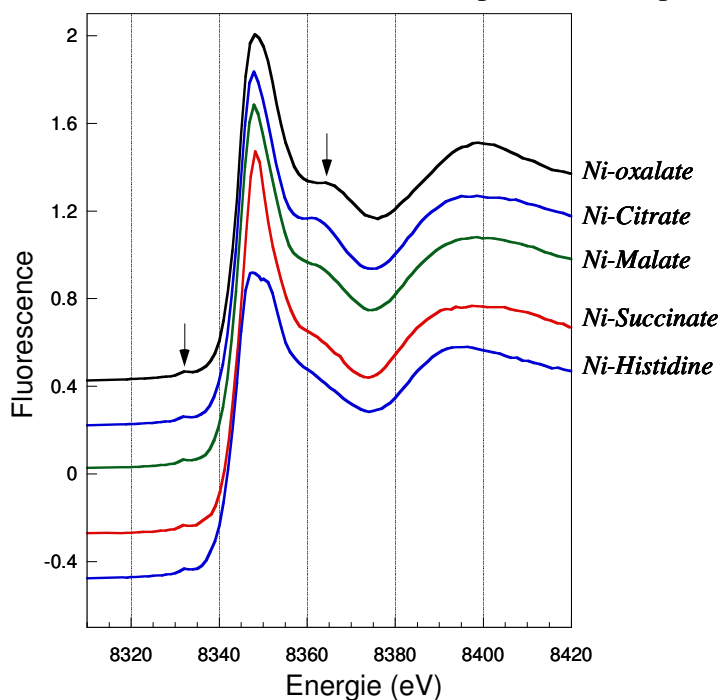


Figure 45. Spectres XANES des solutions de référence contenant les complexes Ni-Ligand.

2.1.2. Echantillons végétaux

Les spectres XANES obtenus pour les échantillons de feuilles et de tiges provenant des espèces hyperaccumulatrices *L. emarginata*, *Al. murale* et *Th. caerulescens* ont une allure similaire (Figure 46), *i.e.* (1) une intensité du pic de pré-seuil faible voire nulle ; (2) l'absence d'élargissement ou de dédoublement du seuil d'absorption ; (3) la présence d'une bande relativement bien résolue autour de 8365 eV. Le Ni présent dans les tissus des trois hyperaccumulateurs apparaît donc majoritairement en coordination octaédrique, avec une prédominance d'atomes d'oxygène dans sa première sphère de coordination. L'allure plus générale du spectre XANES laisse à penser que le Ni serait complexé par des acides organiques du type acide oxalique, malique et/ou citrique. Les teneurs relativement basses des échantillons de racines par rapport à celles des parties aériennes (Tableau 17) se sont traduites par une forte diminution du rapport signal/bruit des données. Par exemple, le spectre obtenu pour les racines de *L. emarginata* sur le traitement **Terre+Smectite** (teneurs de l'ordre de 50 mg Ni kg(MS)⁻¹) est issu de l'accumulation de 10 spectres, et seule la partie XANES est restée à peu près exploitable (Figure 45, Spectre e).

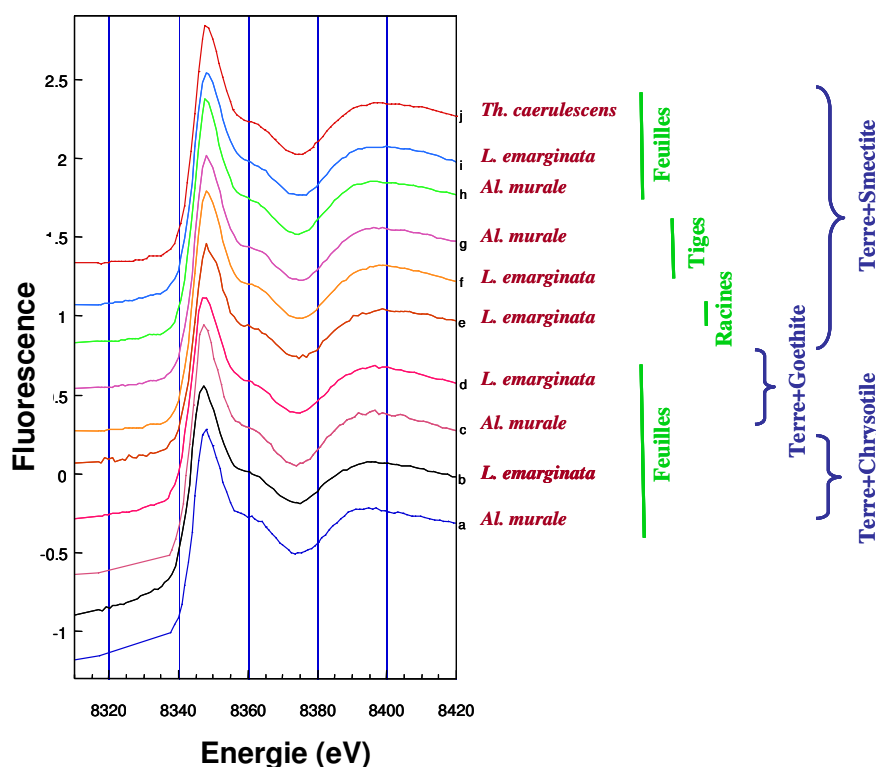


Figure 46. Spectres XANES obtenus pour les échantillons végétaux. **a** : feuilles d'*Al. murale* - traitement **Terre+Chrysotile**, **b** : feuilles de *L. emarginata* - traitement **Terre+Chrysotile**, **c** : feuilles d'*Al. murale* - traitement **Terre+Goethite**, **d** : feuilles de *L. emarginata* - traitement **Terre+Goethite**, **e** : Racines de *L. emarginata* - traitement **Terre+Smectite**, **f** : Tiges de *L. emarginata* - traitement **Terre+Smectite**, **g** : Tiges d'*Al. murale* - traitement **Terre+Smectite**, **h** : Feuilles d'*Al. murale* - traitement **Terre+Smectite**, **i** : Feuilles de *L. emarginata* - traitement **Terre+Smectite**, **j** : Feuilles de *Th. caerulescens* - traitement **Terre+Smectite**.

2.2. EXAFS

2.2.1. Solutions de référence

Les courbes ou oscillations EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) obtenues pour les solutions de référence varient en fonction de la nature du ligand (Figure 47).

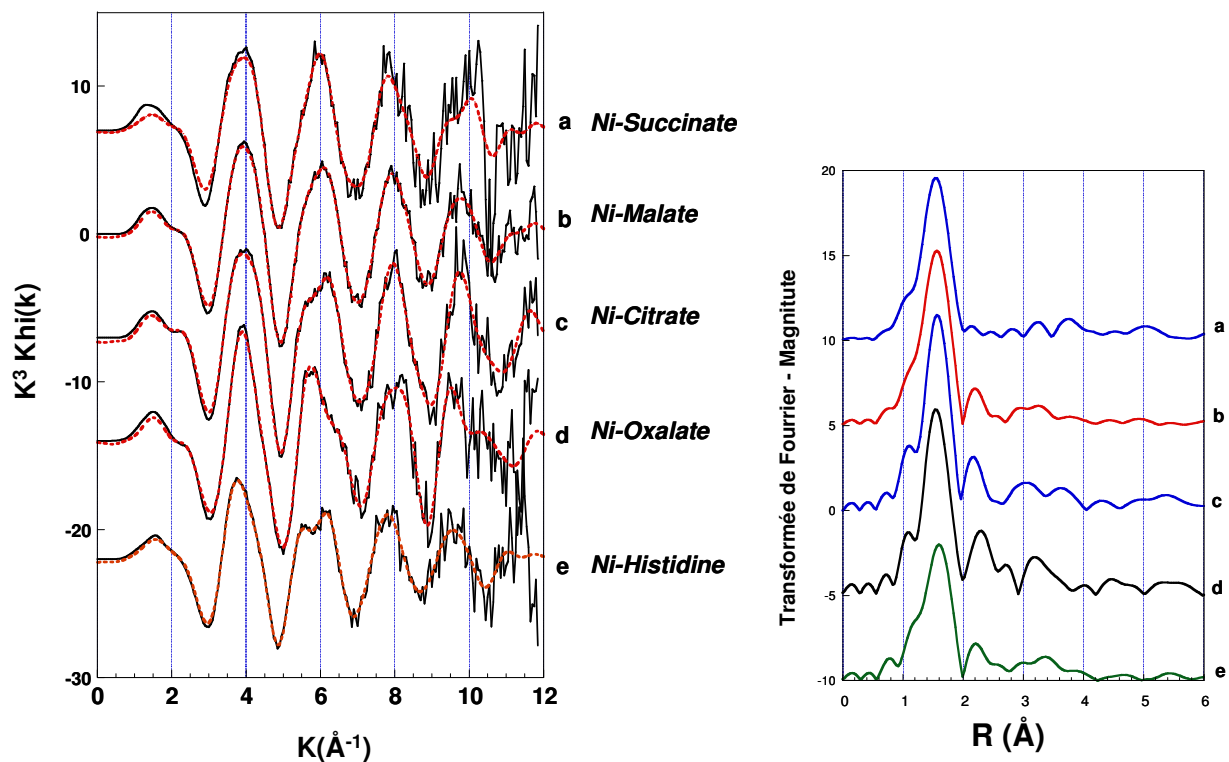


Figure 47. Oscillations EXAFS brutes (—) et filtrées (---) (à gauche) et transformées de Fourier (à droite), obtenues pour les solutions de référence.

Les oscillations EXAFS obtenues pour le complexe Ni-Succinate (Figure 47) présentent une évolution en fréquence et en amplitude semblable à celle obtenue pour la forme hydratée du Ni ($\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6$) (Strathmann et Myneni, 2004). Cette similitude suggère que, dans les deux cas, la première sphère de coordination du Ni(II) (*i.e.* les six atomes d'oxygène de la première couche d'atomes voisins) contribue de manière prédominante au signal EXAFS. La comparaison des oscillations EXAFS brutes et des signaux filtrés à 0,7-2 Å et 0,7-4 Å à partir de la transformée de Fourier (Figure 48) confirme que les oscillations EXAFS obtenues pour la solution de référence Ni-Succinate ne sont pas influencées par les atomes voisins situés au-delà de la première sphère de coordination pour le complexe Ni-Succinate.

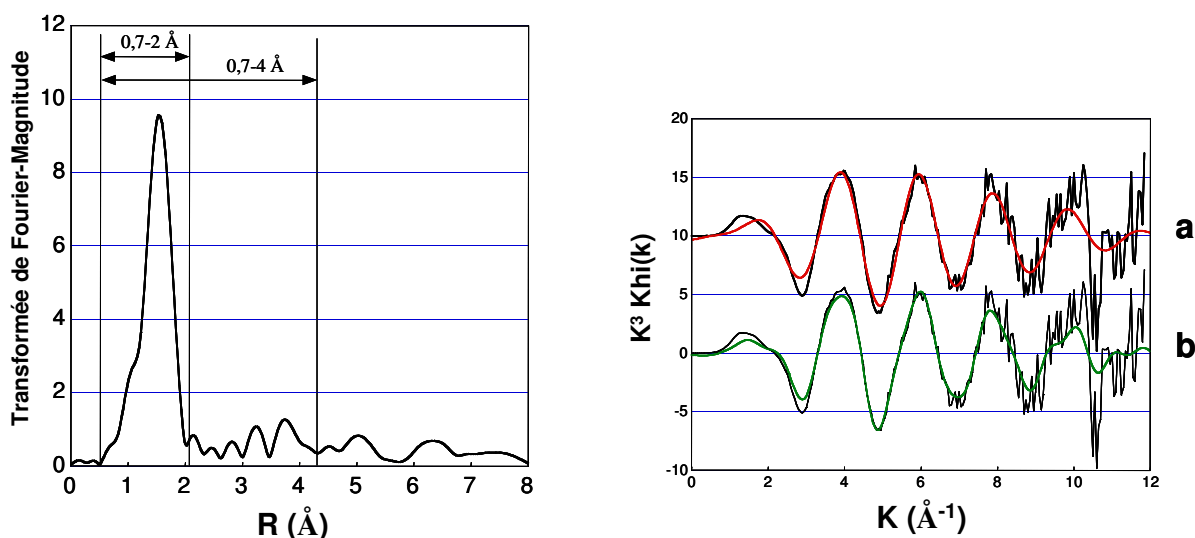


Figure 48. Transformée de Fourier obtenue pour la solution de référence Ni-Succinate (à gauche). Oscillations EXAFS obtenues pour le complexe Ni-Succinate : oscillations brutes (en noir) et filtrées (a) à 0.7-2 Å et (b) à 0.7-4 Å (à droite). Le pic intense à 1,6 Å (phase non corrigée) de la transformée de Fourier provient de la rétrodiffusion des photoélectrons par les atomes d'oxygène situés dans la première sphère de coordination du Ni(II). Et, les petits pics entre 2 et 2,6 Å (phase non corrigée) proviennent de la rétrodiffusion des photoélectrons par les atomes C, N, ou O situés dans la seconde sphère de coordination du Ni(II).

Les courbes obtenues pour les complexes Ni-Malate, Ni-Citrate et Ni-Oxalate (Figure 47), présentent une déformation de la seconde oscillation centrée à 6 \AA^{-1} . Cette dissymétrie serait due à une distorsion de la structure du complexe Ni-carboxylate, induite lorsqu'il y a chélation du Ni (Strathmann et Myneni, 2004).

Les oscillations EXAFS obtenues pour le complexe Ni-Histidine se distinguent de celles des complexes Ni-carboxylates par (i) un léger décalage des oscillations vers des valeurs plus faibles de K ; et (2) par un dédoublement marqué du pic de la seconde oscillation à 6 \AA^{-1} .

Compte tenu du rapport Ni/Ligand, du pH et des constantes de stabilité des différents complexes dans les solutions de référence, les complexes Ni-Citrate et Ni-Oxalate formés en solution seraient majoritairement sous forme de complexes Ni- L_2 . En revanche, le complexe Ni-Malate serait majoritairement sous forme Ni-L (Strathmann et Myneni, 2004).

Dans le cas du complexe Ni-Citrate, lorsque les complexes formés en solution sont majoritairement sous forme Ni-L, les oscillations sont prédominées par le signal de la première sphère de coordination. Aussi, les atomes voisins situés au-delà des six atomes d'oxygène de la première couche ne sont pas visibles (pas de déformation). En revanche, lorsque les complexes formés en solution sont majoritairement sous forme Ni-L₂, un signal supplémentaire est détectable *via* la déformation de la deuxième oscillation centrée à 6 Å⁻¹ (Strathmann et Myneni, 2004). Aussi, cette déformation étant décelable dans notre solution de référence Ni-citrate (Figure 47, courbe c), cela implique que le complexe Ni-citrate est effectivement majoritairement sous forme Ni-L₂ dans la solution de référence.

La comparaison des oscillations EXAFS brutes et des signaux filtrés à partir de la transformée de Fourier (Figure 49) a permis de montrer que les oscillations obtenues pour la solution de référence Ni-Citrate sont influencées par les atomes voisins situés au-delà de la première sphère de coordination. En effet, la déformation de la seconde oscillation centrée sur 6 Å n'apparaît que pour des distances supérieures à 2,6 Å.

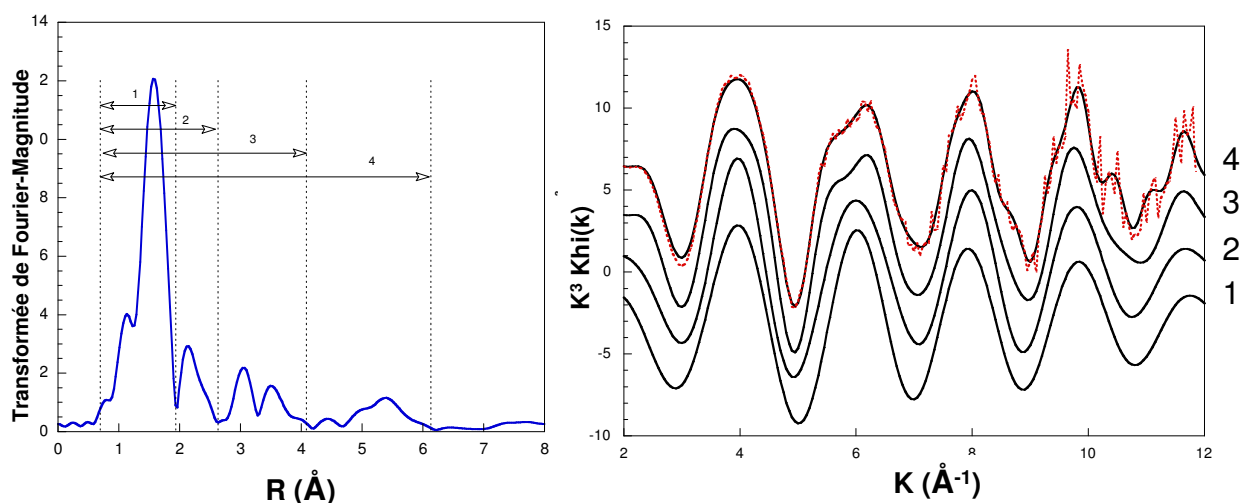


Figure 49. Transformée de Fourier obtenue pour la solution de référence Ni-Citrate (à gauche) ; et oscillations EXAFS filtrées à (1) : 0,7-1,9 Å ; (2) : 0,7-2,6 Å ; (3) : 0,7-4,1 Å ; et (4) : 0,7-6,1 Å (à droite). Le dernier filtre est comparé aux oscillations EXAFS brutes (----).

2.2.2. Echantillons végétaux

L'allure des oscillations EXAFS obtenues pour les végétaux est analogue à celle des oscillations obtenues pour les solutions de référence contenant les complexes Ni-Malate et Ni-Citrate (Figure 50). Les oscillations EXAFS obtenues pour les échantillons de feuilles et de tiges des espèces *L. emarginata*, *Al. murale* et *Th. caerulescens* cultivées sur le traitement **Terre+Smectite** sont caractérisées par une déformation de la seconde oscillation centrée sur 6 \AA^{-1} .

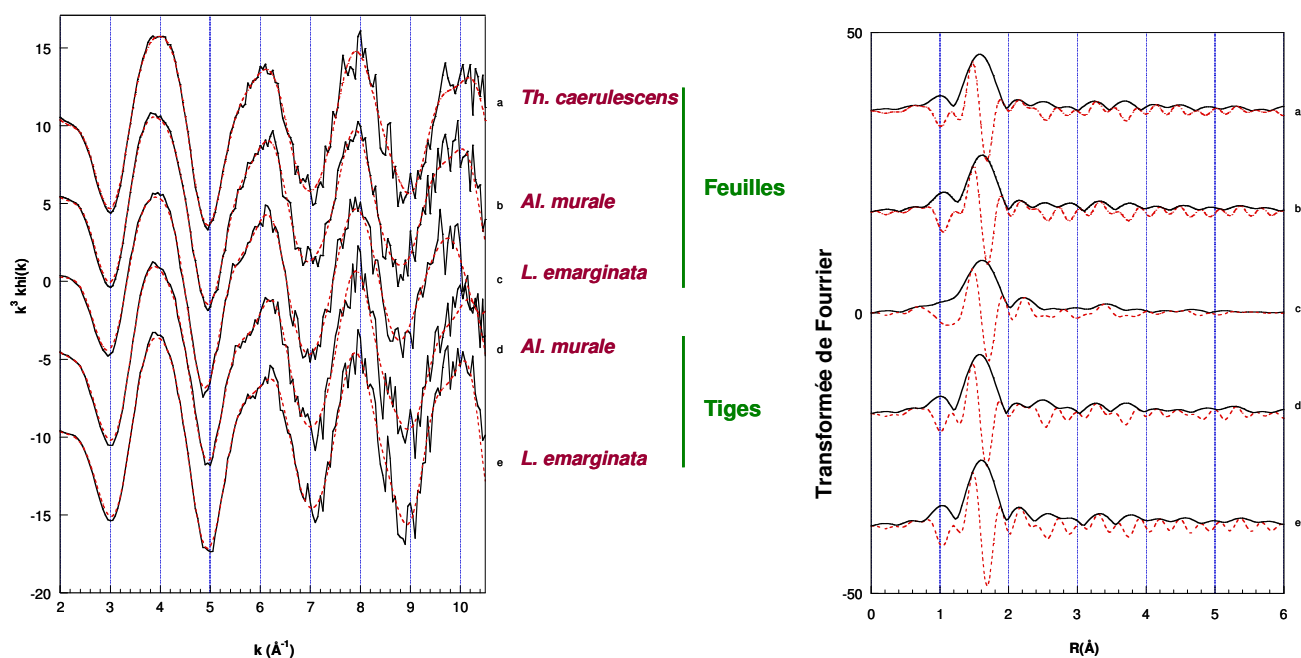


Figure 50. Oscillations EXAFS brutes (—) et filtrées (----) (à gauche), et transformées de Fourier (à droite), obtenues pour les plantes hyperaccumulatrices cultivées sur le traitement **Terre+Smectite**. **a** : Feuilles de *Th. caerulescens*, **b** : Feuilles d'*Al. murale*, **c** : Feuilles de *L. emarginata*, **d** : Tiges d'*Al. murale*, **e** : Tiges de *L. emarginata*.

Les oscillations EXAFS obtenues pour les solutions de référence Ni-Citrate et Ni-Malate sont proches, néanmoins la forme caractéristique de la déformation de la seconde oscillation centrée sur 6 \AA^{-1} pour le complexe Ni-Citrate (épaulement) permet de différencier les deux complexes (Figure 51).

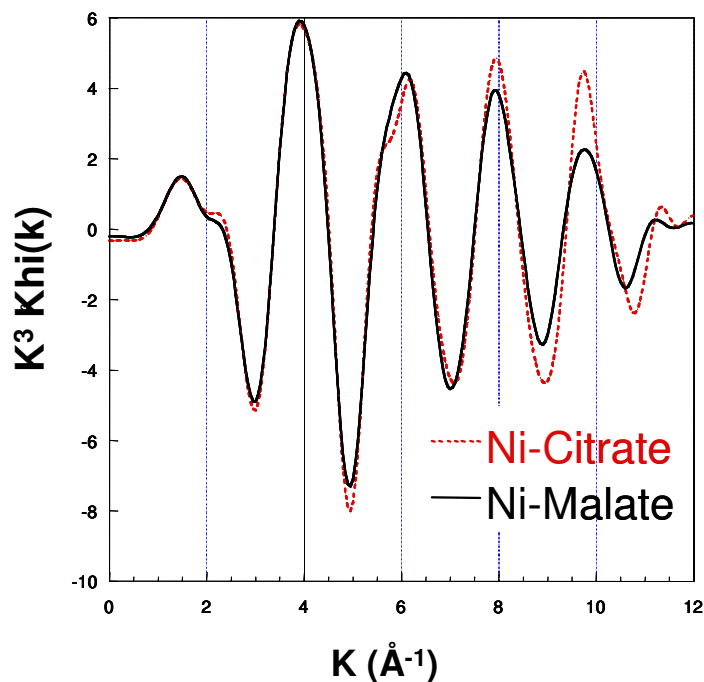


Figure 51. Comparaison des oscillations EXAFS filtrées obtenues pour les solutions de référence Ni-Citrate et Ni-Malate.

La comparaison des courbes Ni-Malate et Ni-Citrate des solutions de référence avec les courbes obtenues pour les échantillons végétaux semble montrer que :

- (i) La courbe obtenue pour les feuilles de *Th. caerulescens* concorde bien avec celle obtenue pour le complexe Ni-Malate de la solution de référence (Figure 52 C). Aussi, dans les feuilles de *Th. caerulescens*, le Ni pourrait être majoritairement complexé à du malate.
- (ii) Dans les feuilles de *L. emarginata* et *Al. murale*, le très léger épaulement au niveau de la deuxième oscillations centrée à 6 \AA^{-1} suggère que le Ni pourrait être complexé par un mélange de malate et de citrate (Figure 52 A et B).
- (iii) Les courbes obtenues pour les tiges de *L. emarginata* et de *Al. murale* concordent avec celle obtenue pour le complexe Ni-Citrate de la solution de référence (Figure 52 C). Le Ni présent dans les tiges de *L. emarginata* et *Al. murale* serait donc majoritairement complexé à du citrate, et principalement sous forme de complexe Ni-L₂ (Figure 53).

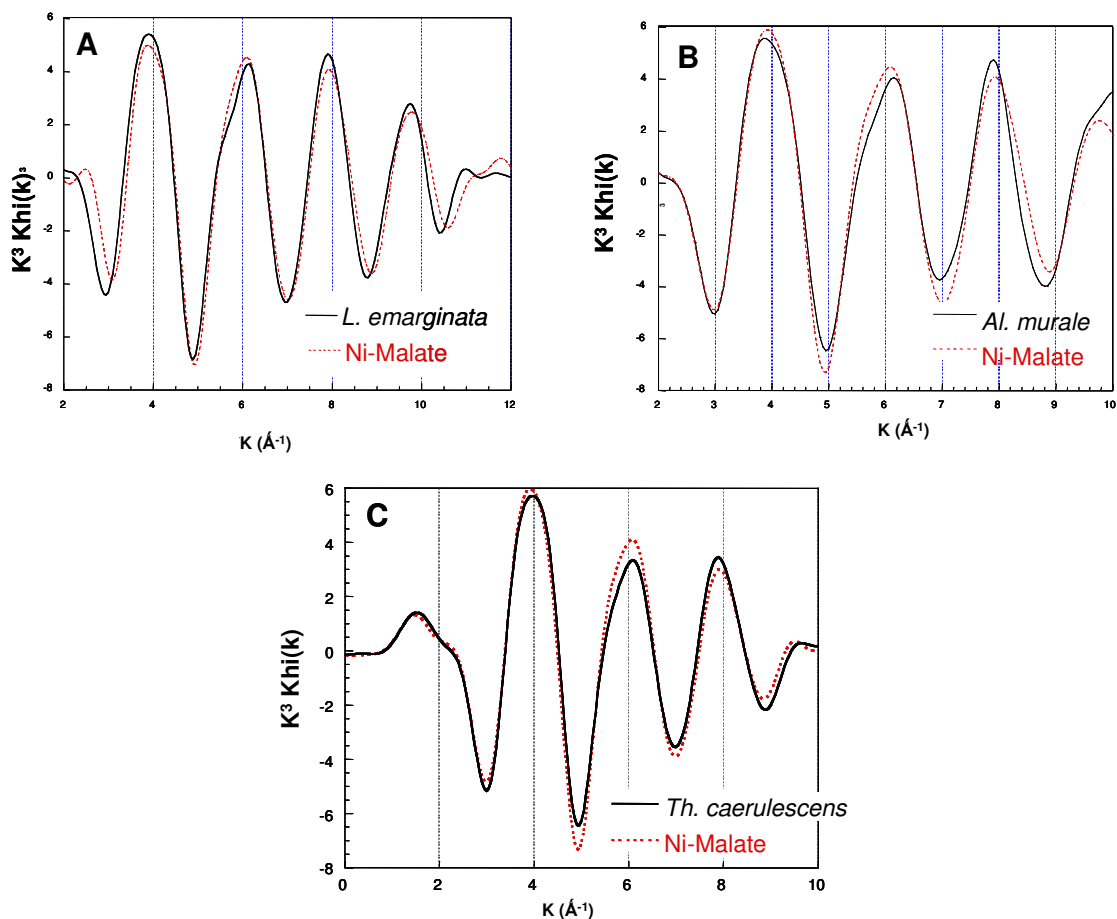


Figure 52. Comparaison des oscillations EXAFS (filtrées) obtenues pour la solution de référence Ni-Malate et ceux obtenus pour les échantillons de **feuilles** des espèces hyperaccumulatrices *L. emarginata* (A), *Al. murale* (B) et *Th. caerulescens* (C).

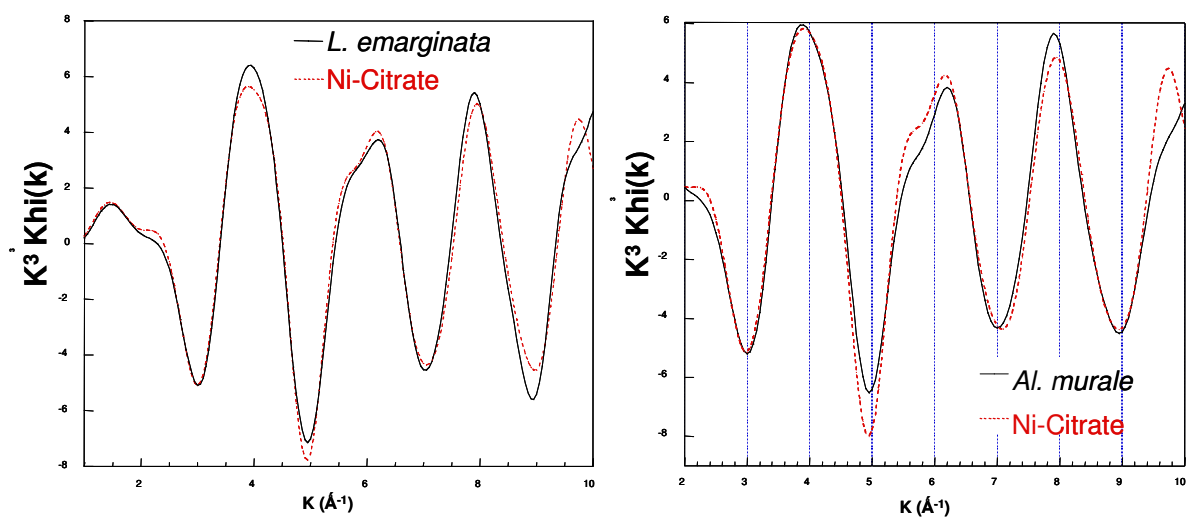


Figure 53. Comparaison des oscillations EXAFS (filtrées) obtenues pour la solution de référence Ni-Citrate et ceux obtenus pour les échantillons de **tiges** des espèces hyperaccumulatrices *L. emarginata* (A) et *Al. murale* (B).

Le signal de fluorescence étant trop bruité pour les faibles teneurs du Ni (rapport signal/bruit très faible), il est plus délicat d'interpréter les oscillations EXAFS obtenues pour les plantes cultivées sur le traitement **Terre+Chrysotile**. Les plus fortes concentrations en Ni dans les plantes cultivées en présence de **Chrysotile** ont été mesurées dans les feuilles de *L. emarginata*. Néanmoins, les oscillations EXAFS brutes montrent que le rapport signal/bruit pour cet échantillon est largement inférieur à celui des plantes cultivées en présence de **Goethite** et de **Smectite** (Figure 54 A). Les courbes EXAFS obtenues pour les feuilles de *L. emarginata* cultivée en présence de **Goethite** et en présence de **Smectite** sont similaires (Figure 54 B). La présence de **Goethite** ou de **Smectite** (phases minérales caractérisées toutes deux par une forte teneur de Ni disponible) dans le milieu de culture ne semble donc pas avoir influencé la spéciation du Ni dans les feuilles de *L. emarginata* ; le Ni serait complexé à un mélange de malate et de citrate.

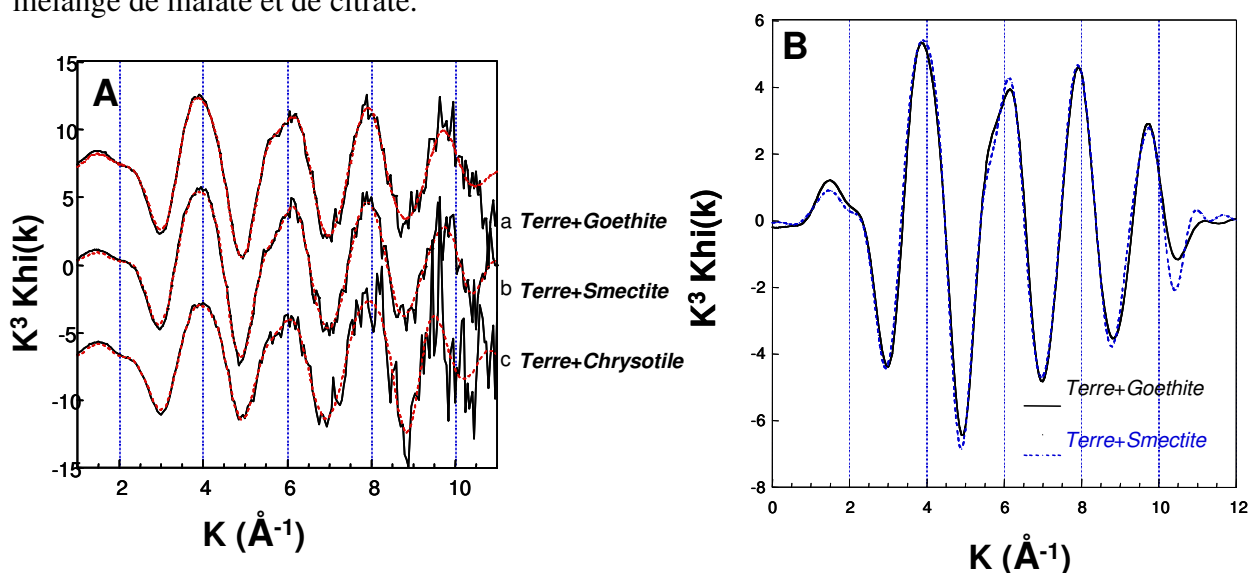


Figure 54. Oscillations EXAFS (brutes et filtrées) obtenues pour les échantillons de feuilles de *L. emarginata* (A) sur les différents traitements (a, **Terre+Goethite** ; b, **Terre+Smectite** ; et c, **Terre+Chrysotile**) ; et comparaison des spectres EXAFS (filtrés) pour les traitements **Terre+Goethite** et **Terre+Smectite** (B).

Des oscillations EXAFS théoriques au seuil K du Ni ont été calculées à l'aide des programmes ATOMS et FEFF (Version 6 et 7) sur la base des données cristallographiques des complexes Ni-Citrate et Ni-Malate (Annexe 10 ; Baker *et al.*, 1983 ; Zhou *et al.*, 2002). Les chemins de diffusion majoritaires sélectionnés par FEFF sont quasiment identiques pour les deux complexes. La reproduction de l'asymétrie du pic à 6\AA^{-1} , caractéristique d'un signal de rétrodiffuseurs à grande distance, est difficilement reproductible et implique de modifier les distances et le nombre théoriques des atomes voisins d'oxygène. Aussi, la simulation de courbes EXAFS pour des mélanges Ni-Malate/Ni-Citrate nécessite encore une étude approfondie, et n'est donc pas présentée dans ce travail.

3. Discussion

Chez les espèces hyperaccumulatrices *L. emarginata*, *Al. murale* et *Th. caerulescens*, le Ni serait majoritairement chélaté par des carboxylates du type malate et citrate. Le Ni serait en coordination octaédrique, lié à six atomes d'oxygène provenant des groupements -COOH et -OH des carboxylates, et de molécules d'eau (Strathmann et Myneni, 2004). Le rapport Ni-Malate/Ni-Citrate semble varier en fonction (i) des différentes espèces hyperaccumulatrices et (ii) de l'organe de la plante (tiges et feuilles). Dans les feuilles de *Th. caerulescens*, le Ni serait majoritairement complexé par du malate. Des analyses XAS supplémentaires étudiant différents rapports de concentration Ni/malate sont nécessaires pour savoir si, comme pour le citrate, il est possible de distinguer la forme sous laquelle se trouve le complexe Ni-Malate (*i.e.* Ni-L ou Ni-L₂). Des analyses en spectrométrie de masse (Electrospray) ont montré que dans les tissus de *Th. caerulescens* le complexe Ni-Malate se présentait sous forme Ni-L₂ (Ouerdane *et al.*, 2006). Le malate serait également impliqué dans la complexation du Cd et du Zn chez les populations de *Th. caerulescens* hyperaccumulatrices de Cd et de Zn (Sarret *et al.*, 2002 ; Ueno *et al.*, 2005). En revanche, pour les espèces *L. emarginata* et *Al. murale*, le Ni serait majoritairement complexé par un mélange de citrate et de malate au niveau des feuilles, et par du citrate au niveau des tiges. Les complexes Ni-Citrate se présenteraient sous forme de complexes Ni-L₂ très stables (> à Ni-malate) (Strathmann et Myneni, 2004). L'implication du citrate dans les transferts du Ni des racines vers les feuilles pourrait être à l'origine de l'efficacité de la translocation du Ni chez ces deux espèces. Le malate jouerait un rôle important dans le stockage du Ni, celui-ci étant présent dans les feuilles des trois hyperaccumulateurs. Aussi, les feuilles étant le lieu de répartition du Ni transporté dans les nervures (xylème), vers le(s) lieu(x) de stockage dans le limbe, cela pourrait expliquer le mélange Ni-Malate et Ni-Citrate globalement présent au niveau des feuilles de *L. emarginata* et de *Al. murale*. La localisation de la zone de stockage pourrait intervenir sur la spéciation du Ni et sur la capacité des plantes à séquestrer le Ni, en influant sur la nature et la quantité des ligands disponibles susceptibles de complexer le métal. La présence de trichomes fortement concentrés en Ni au niveau de l'épiderme inférieur des feuilles de *Al. murale* pourrait contribuer au stockage du Ni (étude préliminaire présentée en Annexe 11).

A la différence de certains travaux qui ont montré l'implication d'histidine dans la translocation du Ni chez les espèces *Al. murale* (Krämer *et al.*, 1996 ; Kerkeb et Krämer, 2003), et du Zn chez *Th. caerulescens* (Salt *et al.*, 1999), nous n'avons décelé la présence de complexes Ni-histidine chez aucun des hyperaccumulateurs étudiés. Certains travaux ont

montré que la nature du substrat de culture (culture hydroponique ou sol) pouvait influencer la spéciation du Zn dans les racines de l'hyperaccumulateur de Zn *Arabidopsis halleri* (Sarret *et al.*, 2002). Aussi, dans les milieux largement pourvus en azote facilement assimilable (*e.g.* dans le cas de culture hydroponique), l'histidine pourrait majoritairement être impliquée dans la complexation du Ni au niveau des racines des espèces hyperaccumulatrices de Ni et dans son transfert vers le xylème (Kerkeb et Krämer, 2003). En revanche, la complexation du Ni par des acides organiques pourrait être privilégiée lorsque les plantes se développent sur un sol (*e.g.* cultures en rhizotron, notre étude) et *a fortiori* sur les sols ultramafiques pauvres en nutriments. L'incorporation de phases minérales nickélifères (**Smectite** et **Goethite**), de natures différentes mais présentant toutes deux une forte teneur de Ni disponible, ne semble pas avoir influencé la nature des ligands impliqués dans la complexation du Ni au niveau des feuilles de *L. emarginata*. Néanmoins, le rapport Ni-citrate/Ni-Malate semble varier légèrement, tel que **Goethite** > **Smectite**. Toutefois, il apparaît difficile d'attribuer cette variation à la nature du minéral compte tenu de la variabilité entre individus d'une même espèce, et des erreurs lors du traitement des données EXAFS (faible rapport signal sur bruit, mise en place et passage de l'échantillon en mode fluorescence).

4. Conclusion

Dans les tissus de *L. emarginata*, *Al. murale* et *Th. caerulescens* le Ni serait majoritairement complexé par du malate et du citrate. La chélation du Ni par du citrate (plus stable que par du malate) dans les tiges des hyperaccumulateurs pourrait en partie expliquer la plus forte translocation du Ni chez *L. emarginata* et *Al. murale* par rapport à *Th. caerulescens*. Le malate jouerait un rôle dans le stockage du Ni dans les feuilles des trois hyperaccumulateurs. Pour identifier et quantifier les éventuelles phases minoritaires au sein des tissus des hyperaccumulateurs, il serait intéressant de compléter nos résultats par des microanalyses XAS. En μ EXAFS, l'information sur l'environnement local de l'atome cible est moyennée sur un volume beaucoup plus restreint qu'en EXAFS. D'autres méthodes peuvent être utilisées pour caractériser la spéciation du Ni dans les plantes. Il s'agit de méthodes de séparation par chromatographie (*e.g.* HPLC, chromatographie sur gel) couplées à des méthodes spectrométriques pour le dosage d'éléments (ICP-MS) ou de molécules (Electrospray-MS) (Vacchina *et al.*, 2003 ; Schaumlöffel *et al.*, 2003 ; Ouerdane *et al.*, 2006). Ces méthodes complémentaires permettraient de caractériser la spéciation du Ni de manière plus localisée au sein des tissus des plantes (*e.g.* xylème, épiderme foliaire), et de préciser la forme sous laquelle se présentent les complexes Ni-carboxylates (*i.e.* Ni-L ou Ni-L₂).

Chapitre VII

Mobilisation du Ni dans la rhizosphère des hyperaccumulateurs dans les milieux à faible disponibilité du Ni

Nous avons vu dans les chapitres III et V que les plantes hyperaccumulatrices prélèvent le Ni proportionnellement à l'offre de Ni phytodisponible du sol. Ces plantes sont ainsi capables de réduire jusqu'à plus de la moitié la fraction de Ni phytodisponible du sol. Lorsque le Ni phytodisponible du sol est en quantité suffisante pour répondre à la demande des plantes, les hyperaccumulateurs ne semblent pas favoriser l'altération des minéraux nickélicifères pour augmenter la fraction de Ni disponible (Chapitre V). Néanmoins, certains travaux ont montré que les hyperaccumulateurs pouvaient être impliqués dans la mobilisation du Ni dans sol de serpentine, en favorisant la dissolution de minéraux porteurs de Ni tels que la forstérite (Mg_2SiO_4) (Wenzel *et al.*, 2003). Aussi, dans le cas où le Ni n'est pas disponible dans le sol, les hyperaccumulateurs sont-ils capables de favoriser l'altération des minéraux porteurs de Ni dans le but d'acquérir le Ni initialement non disponible du sol? Et, si oui quels sont les mécanismes impliqués dans la mobilisation du métal?

L'objectif de chapitre est, d'une part, de qualifier et quantifier l'altération d'une phase minérale nickélicifère, seule source de Ni, dans un milieu à faible disponibilité du Ni pour les hyperaccumulateurs et, d'autre part, de tester l'impact (i) du pH et des microorganismes du milieu, et (ii) de la production d'acides organiques par les plantes, sur la mobilisation du Ni.

Dans une première expérimentation, l'espèce hyperaccumulatrice *L. emarginata* (espèce à fort potentiel de phytoextraction) a été cultivée sur une phase minérale nickélicifère à faible disponibilité en Ni (**Chrysotile**) et représentant la seule source de Ni du système. Ce dispositif nous a permis (i) d'effectuer un bilan précis entre éléments relargués par les minéraux et éléments mobilisés ou absorbés par la plante, (ii) de suivre l'évolution du pH et (iii) d'effectuer un comptage bactérien en fin de culture (système initialement stérile).

Dans une seconde expérimentation, plusieurs espèces hyperaccumulatrices ont été cultivées sur une solution nutritive (hydroponie) en présence ou en absence de Ni. L'identification et de la quantification des acides organiques présents dans les solutions nutritives et les plantes ont été réalisées au travers d'analyses en chromatographie ionique.

1. Matériels et méthodes

1.1. Culture en colonne lysimétrique

1.1.1. Matériels

A. Phase minérale porteuse de Ni

L'origine et les caractéristiques du chrysotile utilisé dans cette expérimentation ont été présentées dans les chapitres II et IV, respectivement. La disponibilité du Ni au sein de cette phase minérale est très faible. La concentration de Ni hydrosoluble du minéral est quasiment nulle ($4 \mu\text{g l}^{-1}$). La fraction de Ni extractible au DTPA-TEA représente 0,15 % du Ni total du minéral. Et, la fraction de Ni rapidement échangeable ($E_{(0-1\text{min})}$) ne représente que 0,02 % du Ni total du minéral.

B. Espèce végétale

Nous avons montré dans le chapitre V que *L. emarginata* était l'espèce qui présente le potentiel de phytoextraction le plus élevé par rapport à *Al. murale* et *Th. caerulescens* quelle que soit la fraction de Ni disponible dans le milieu. C'est pourquoi nous avons choisi de tester le comportement de cette espèce face à un milieu à faible disponibilité en Ni.

1.1.2. Méthodes

A. Mise en place et suivi de la culture

Le dispositif utilisé pour la culture de *L. emarginata* est similaire à celui ayant été utilisé pour la caractérisation de l'altération du **Chrysotile** (Chapitre IV), à la différence près que le système était stérile avant le repiquage des plantules (Figure 55). Aussi, avant d'être inséré dans les colonnes stériles, le Quartz a été préalablement stérilisé par autoclavage (121°C), et le **Chrysotile** a été traité plusieurs heures sous UV afin d'éliminer un maximum de microorganismes sans modifier la structure et la composition initiale du minéral. La mise en place du dispositif a été effectuée stérilement sous une hotte à flux laminaire.

Des graines de *L. emarginata* (non stériles) ont été semées sur des cristaux millimétriques de quartz pur (Chapitre II). L'ensemble a été placé dans une chambre de végétation, sous conditions de photopériode (18 h) et température ($16^\circ\text{C}/22^\circ\text{C}$) contrôlées, et a été humidifié régulièrement avec de l'eau ultrapure ($18 \text{ M}\Omega$). Après germination, les plantules de *L. emarginata* ont été repiquées dans les colonnes, à raison d'une plantule par colonne. Les

plantules non repiquées ont été rincées à l'eau ultrapure et séchées à l'étuve à 70 °C. Des témoins sans plante ont été réalisés dans les mêmes conditions. Six répétitions de chaque modalité (avec ou sans plante) ont été mises en place.

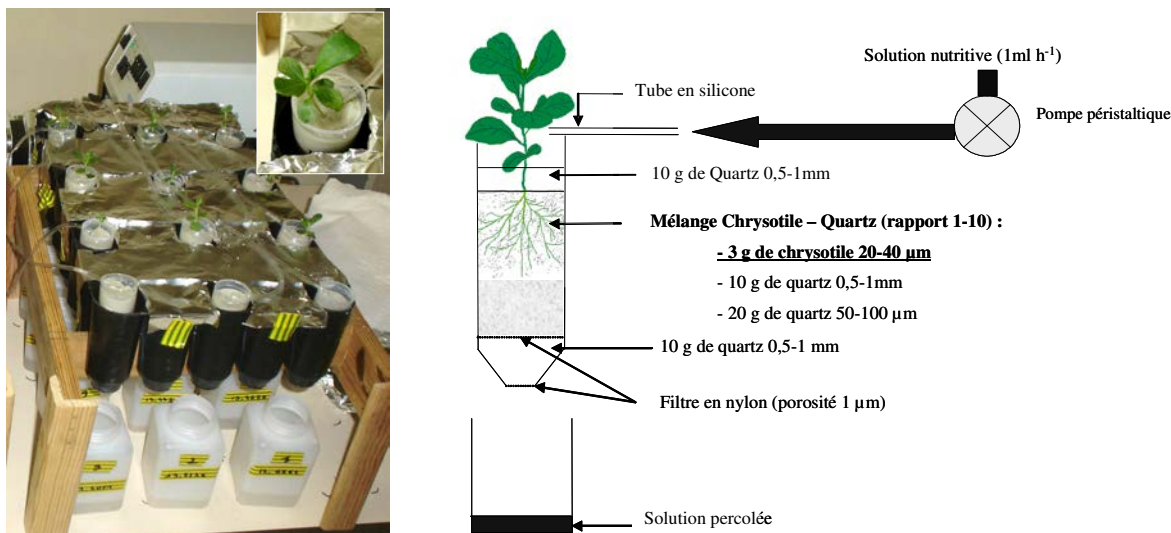


Figure 55. Dispositif de culture

La solution apportée au système était préalablement stérilisée (autoclavage) et contenait les éléments nutritifs nécessaires au développement des plantes (*i.e.* N, Ca, S, P, K, Mn, Zn), à l'exception du Mg, du Fe et du Ni, apportés uniquement par le **Chrysotile**. La teneur et la forme sous laquelle ont été apportés ces éléments sont présentées dans le Chapitre IV (solution A, Tableau 6). Le pH de la solution nutritive apportée au système était en moyenne de $5,8 \pm 0,7$. La solution de percolation a été filtrée grâce à une toile en nylon stérile placée à la base de la colonne (maille de 1 µm) et récupérée dans un flacon inerte en polyéthylène.

B. Suivi de la culture

La culture a été conduite pendant 15 semaines dans une chambre de végétation sous conditions de photopériode (16 h), température (15 °C/22 °C le jour), et humidité de l'air (60 %) contrôlées. La solution nutritive stérile a été renouvelée chaque semaine.

C. Récolte des échantillons

Au cours de la culture, une aliquote (environ 20 ml) de solution percolée au travers de chaque colonne a été prélevée chaque semaine afin de suivre la cinétique de dissolution du chrysotile.

Au terme de la culture, les solutions de percolation ont été regroupées et homogénéisées (solution globale). Les parties aériennes (*i.e.* ensemble tiges + feuilles), ainsi que la totalité des racines des plantes ont été récoltées et rincées avec de l'eau ultrapure. Le contenu de chaque colonne (**Chrysotile+Quartz**) a été homogénéisé et séché à l'étuve à 50 °C pendant 1 semaine.

D. Analyses chimiques

a. Minéralisation des végétaux

L'ensemble des échantillons de feuilles, de tiges et de racines de *L. emarginata* récoltés à la fin de la culture a été minéralisé par attaque acide (Chapitre II). Les plantules qui n'ont pas été repiquées lors de la mise en place de l'expérimentation ont également été minéralisées afin d'avoir une référence avant culture.

b. Caractérisation de la disponibilité du Ni

Des extractions chimiques ont été réalisées sur le mélange homogène **Chrysotile+Quartz** afin de caractériser la disponibilité du Ni dans le système après la culture (détails dans le chapitre II):

- Extractions du Ni à l'**eau** (Ni hydrosoluble) ;
- Extractions du Ni au **DTPA-TEA** (estimation du Ni phytodisponible) ;

c. Mesure de pH

Des mesures du pH ont été effectuées sur l'ensemble des solutions percolées.

d. Dosages des éléments

Le Mg et le Fe contenus dans les minéralisats et les percolats ont été dosés par ICP-AES ; le Ni a été dosé par spectrométrie AAS (Chapitre II).

E. Analyses minéralogiques et microscopiques

Au terme de la culture, des analyses en DRX et des observations en MEB (chapitre II) ont été effectuées sur des particules de chrysotile adhérentes aux racines de *L. emarginata*.

F. Comptage bactérien

Au terme de l'expérimentation en colonne lysimétrique, un échantillonnage du milieu de culture a été effectué dans le but de réaliser un comptage bactérien, la stérilité initiale du système n'ayant pas été conservée pendant la culture. Un gramme du mélange chrysotile-quartz a été prélevé dans chaque colonne sous hotte à flux laminaire, mis en suspension dans de l'eau ultrapure et homogénéisé à l'aide d'un vortex pendant une minute. Le surnageant a alors été dilué 100 fois et 49,2 µl ont été étalés stérilement à l'aide d'un ensemenceur spiral sur un milieu Tryptic Soy Agar 10 % (Tryptic Soy Broth 3 g l⁻¹ et Agar 15 g.l⁻¹). Les bactéries ont été dénombrées après une semaine d'incubation à l'étuve à 28 °C.

Les différentes colonies qui se sont développées sur le milieu TSA ont été récupérées et conservées afin d'être ultérieurement identifiées.

1.2. Culture en hydroponie

1.2.1. Matériels

A. Solution nutritive

Afin d'établir si l'absence de Ni stimule la production d'acides carboxyliques, deux traitements, *i.e.* avec et sans Ni, ont été mis en place. La solution nutritive de base utilisée pour la culture des plantes contenait tous les éléments nécessaires au développement des plantes *i.e.* Mg, N, Ca, S, P, K, Fe, Mn, Zn. La teneur et la forme sous laquelle ont été apportés ces éléments (excepté pour Fe) sont présentées dans le Chapitre IV (solution C, Tableau 6). Le Fe a été apporté à la solution C sous forme FeSO₄, 7H₂O à une concentration de 10 µg Fe l⁻¹. Pour les traitements avec Ni, le Ni a été ajouté à la solution de base sous forme de NiCl₂ à une concentration de 1 mg Ni l⁻¹. Le pH des solutions initiales avec ou sans Ni était de 5,2 unités pH. L'ensemble des solutions utilisées a préalablement été stérilisé (autoclave) avant la mise en culture des plantes.

B. Espèces végétales

Dans cette expérimentation, les trois espèces hyperaccumulatrices de Ni, *L. emarginata*, *Al. murale* et *Th. caerulescens*, ainsi que l'espèce non accumulatrice *Au. saxatilis* (Chapitre II) ont été testées.

1.2.2. Méthodes

A. Mise en place de la culture

Les graines de chaque espèce végétale (non stériles) ont été semées dans des boîtes de pétri sur du papier filtre imbibé d'eau ultrapure (18 MOhm). L'ensemble a été placé à l'intérieur d'une petite serre située dans une chambre de végétation, sous conditions de photopériode (18 h) et température (16°C/22°C) contrôlées (Photographie 7). Après germination, la partie racinaire des plantules a été placée dans des petits piluliers en verre stériles contenant la solution nutritive (5ml). Les parties aériennes ont été maintenues hors de la solution grâce à un support en polypropylène préalablement stérilisé, rattaché au bord du pilulier par des feuilles adhésives extensibles inertes (PARAFILM® M) (Photographie 7). La mise en place du dispositif a été effectuée stérilement sous une hotte à flux laminaire. Quatre répétitions, en présence et en absence de Ni dans la solution nutritive, ont été effectuées pour chaque plante. Les piluliers ont été entourés de papier en aluminium afin de maintenir les parties racinaires à l'obscurité. L'ensemble du dispositif a été placé dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la germination des graines. Des témoins sans plante ont été réalisés dans les mêmes conditions.



Photographie 7. Dispositif de culture en milieu hydroponique.

B. Suivi de la culture et récolte des échantillons

La culture a été menée pendant deux semaines. A la fin de la première semaine de culture, les plantules ont été transplantées stérilement sous une hotte à flux laminaire dans d'autres piluliers, préparés de manière identique aux précédents. Après leur récolte *i.e.* après une et deux semaines de culture, les solutions contenues dans les piluliers ont été immédiatement placées et conservées à $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ afin de ne pas dénaturer les éventuels exsudats libérés par les racines.

Au terme des deux semaines de culture, les racines et les parties aériennes des plantules ont été récoltées séparément, rincées à l'eau ultrapure, égouttées puis pesées. Immédiatement après leur récolte, les échantillons frais ont été broyés dans 2 ml d'eau ultrapure dans un mortier en agate, puis filtrés à $0,45\text{ }\mu\text{m}$.

C. Analyses

Les filtrats provenant des échantillons végétaux, et les solutions nutritives récoltées après une et deux semaines de culture, ont été analysés par ICP-AES (Chapitre II) pour le dosage du Ni, et par chromatographie ionique pour le dosage des acides organiques. Nous avons vu dans le chapitre précédent que, dans les tissus des hyperaccumulateurs *L. emarginata*, *Al. murale* et *Th. caerulescens*, le Ni était majoritairement complexé par du malate et/ou du citrate, c'est pourquoi nous nous intéresserons plus particulièrement à ces deux acides organiques.

2. Résultats

2.1. Altération du chrysotile dans la rhizosphère de *L. emarginata*

2.1.1. Biomasse

Après 15 semaines de culture sur **Chrysotile**, *L. emarginata* a produit une biomasse totale (racines+parties aériennes) de 261 mg de matière sèche (Tableau 19). La biomasse racinaire représentait 22 % de la biomasse totale.

Tableau 19. Biomasse produite par *L. emarginata* après 15 semaines de culture sur chrysotile.

	Biomasses (mg)	
<i>Racines (R)</i>	57	(17)
<i>Parties aériennes (PA)</i>	204	(62)
<i>Totale</i>	261	(72)
<i>Rapport R/PA</i>	0,22	(0,06)

2.1.2. Concentration en Mg, de Ni et de Fe dans les tissus de *L. emarginata*

Les teneurs en Mg, Ni et Fe mesurées dans la plante varient en fonction : (i) de la nature de l'élément (Macronutriment *i.e.* Mg >> Micronutriments *i.e.* Ni et Fe) ; et (ii) de l'organe de la plante (racines \geq parties aériennes) (Figure 56). Les teneurs en Mg et en Fe sont nettement plus élevées dans les racines de *L. emarginata* que dans les parties aériennes. A l'inverse, les teneurs en Ni dans les parties aériennes de la plante sont quasiment deux fois plus élevées par rapport à celles des racines.

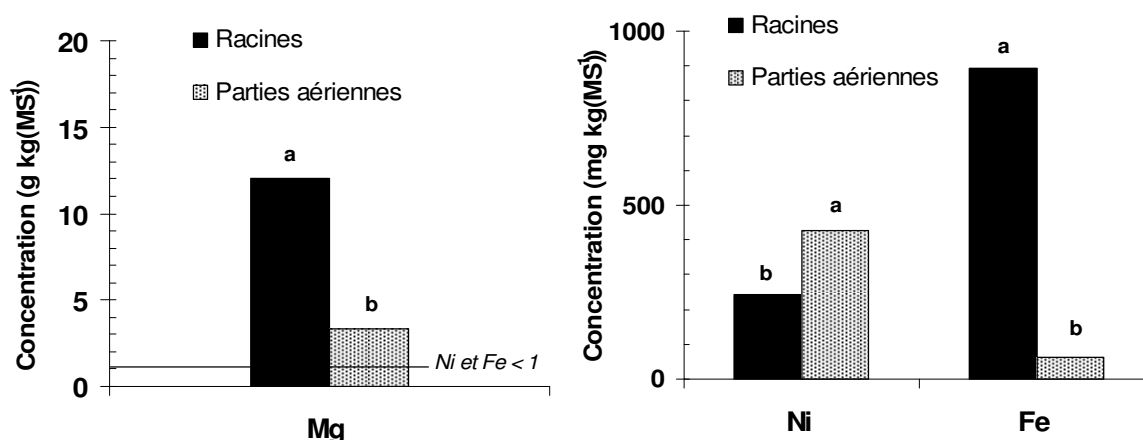


Figure 56. Concentration en Mg, Fe et Ni dans les racines et les parties aériennes de *L. emarginata* après 15 semaines de culture sur chrysotile. *a,b* : analyse de variance effectuée entre les différents organes de la plante (Newman-Keuls, $p=0,05$).

2.1.3. Minéralomasse

Les quantités moyennes d'éléments dans les parties aériennes des plantules avant la mise en culture étaient de 17 μg pour le Ni, de 9 μg pour le Mg, et inférieures à 1 μg pour le Fe. Dans les racines de ces mêmes plantules, les quantités de Ni, Mg et Fe étaient toutes inférieures à 1 μg . Les quantités de Mg, Ni et Fe dans l'ensemble des tissus de *L. emarginata* sont telles que : Mg >> Ni > Fe (Figure 57). Le Mg absorbé par la plante est réparti de manière équivalente entre les racines et les parties aériennes du végétal. En revanche, la majorité du Ni est associée aux parties aériennes (87 %). A l'inverse, le Fe est situé surtout au niveau des racines (81 %). La translocation des éléments des racines vers les feuilles (*rapport [racine/feuille]*) est telle que Ni (0,15) > Mg (0,98) > Fe (4,14).

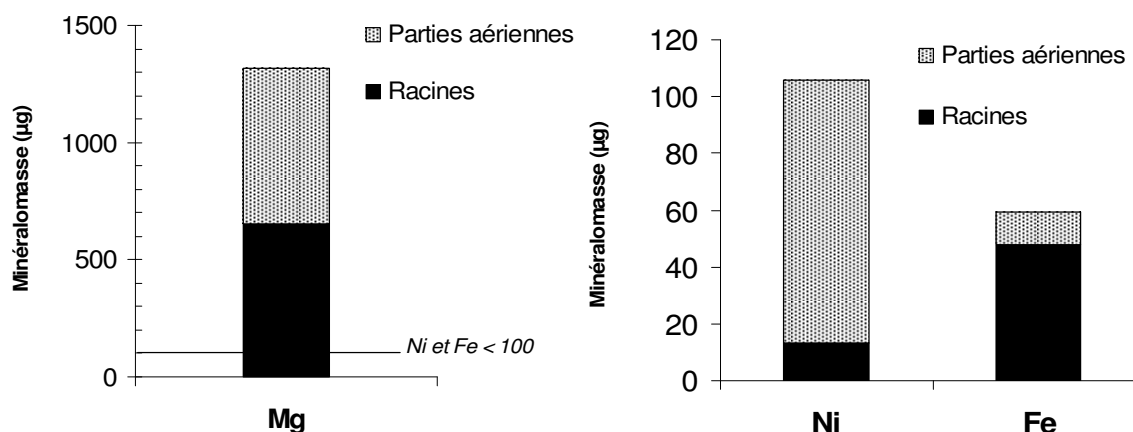


Figure 57. Quantités de Mg, Fe et Ni (minéralomasses) dans les racines et les parties aériennes de *L. emarginata* après 15 semaines de culture sur chrysotile.

2.1.4. Bilan d'altération du chrysotile

A. Quantification et transferts du Mg et du Ni

La présence de *L. emarginata* a augmenté de plus de 50 % la quantité de Mg libérée par l'altération du **Chrysotile**; et a multiplié par 50 celle du Ni (Figure 58). En absence de plante, la fraction de Ni transférée vers les percolats ne représente que 0,003 % de la quantité de Ni initialement apportée au système par le **Chrysotile**. En revanche, après la culture de *L. emarginata* 1,48 % du Ni initialement présent au sein du **Chrysotile** ont été transférés vers les percolats et la plante. *L. emarginata* a absorbé 88 % de la quantité totale du Ni libéré au cours de la culture. En revanche, la majorité du Mg libéré (91 %) a été lixiviée dans les percolats.

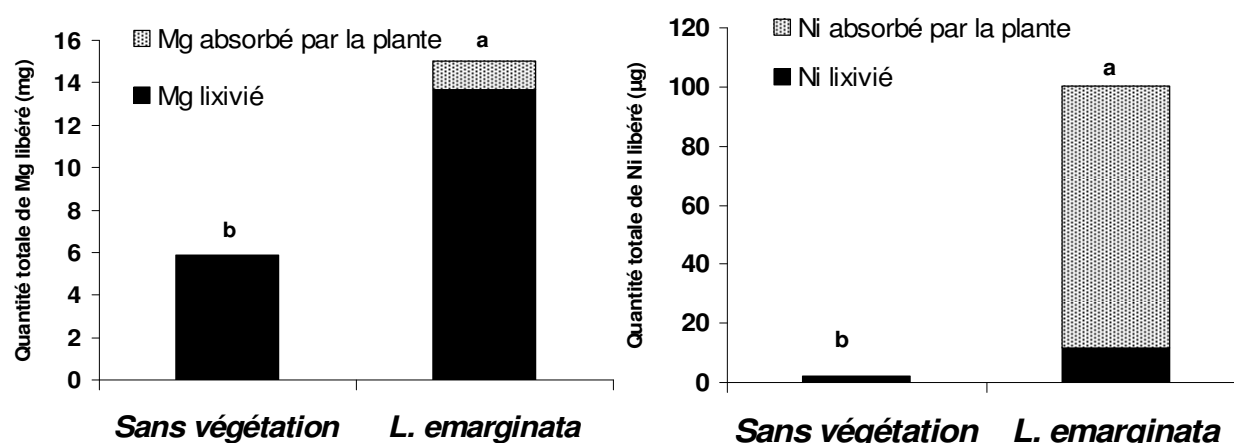


Figure 58. Quantités totales de Mg et de Ni libérées par l'altération du **Chrysotile** après 15 semaines de culture (quantités percolées et absorbées par la plante). *N.B. : les quantités d'éléments initialement contenues dans la plante avant la culture ont été préalablement retranchées pour le calcul du Ni absorbé par la plante.* a,b,c : analyse de variance effectuée entre les différentes modalités (Newman-Keuls, $p=0,05$).

Les quantités **théoriques** de Ni libérée par dissolution stoechiométrique des couches du **Chrysotile** $Ni_{stoechiométrique}$ ont pu être estimée à partir (i) des coefficients stoechiométriques du Mg (2,755) et du Ni (0,008) et (ii) des quantités totales de Mg libérées par l'altération du **Chrysotile** au terme de l'expérimentation (Tableau 20). La quantité de Ni lixiviée dans le percolat du témoin sans plante est nettement inférieure à $Ni_{stoechiométrique}$. En revanche, la quantité totale de Ni libérée par l'altération du **Chrysotile** en présence de *L. emarginata* est très proche de la valeur de $Ni_{stoechiométrique}$.

Tableau 20. Comparaison entre les quantités totales de Ni théoriquement libérées au cours de la culture par dissolution du **Chrysotile** (pour les valeurs de Mg correspondantes) et les quantités totales de Ni effectivement mesurées.

	<i>Mg</i> mesuré (mg)	<i>Ni</i> mesuré(µg).....	<i>Ni</i> stoechiométrique
<i>Sans végétation</i>	5,90	1,95	41,36
<i>L. emarginata</i>	15,00	100,47	105,05

B. Evolution de la disponibilité du Ni dans le Chrysotile après la culture

La teneur en Ni hydrosoluble (Ni_{H2O}) mesurée au sein du mélange *Quartz-Chrysotile* est significativement moins élevée après culture sans végétation par rapport à la référence *Avant culture* (-1,5 µg l⁻¹) (Tableau 21). Les deux tiers de cette diminution correspondraient à la quantité de Ni percolée après culture sans végétation (Figure 58). Aussi, cela signifie que la solution n'est pas réapprovisionnée par le Ni contenu au sein du **Chrysotile**. La teneur en Ni hydrosoluble après la culture de *L. emarginata* est équivalente à celle mesurée avant culture, ce malgré une quantité de Ni percolée plus élevée en présence de la plante par rapport au témoin sans plante (Figure 57). Compte tenu que la solution est initialement non tamponnée par le Ni du **Chrysotile** (cf. CEI, Figure 22), cela suggère qu'une partie du Ni contenu au sein du **Chrysotile** a été solubilisé.

La teneur en Ni extractible au DTPA-TEA ($Ni_{DTPA-TEA}$) mesurée au sein du mélange *Quartz-Chrysotile* avant la culture est très faible ; elle ne représente que 0,2 % de la teneur initiale en Ni total du système (Tableau 21). Après la culture, $Ni_{DTPA-TEA}$ dans le mélange *Quartz-Chrysotile* est significativement plus élevé, ce d'autant plus en présence de *L. emarginata*.

Tableau 21. Quantités de Ni hydrosoluble et extractible au DTPA-TEA au sein du mélange **Chrysotile -Quartz**, avant et après la culture. *a,b,c* : analyse de variance effectuée entre les différentes modalités (Newman-Keuls, $p=0,05$).

	Ni_{H_2O} $\mu g l^{-1}$	$Ni_{DTPA-TEA}$ $mg kg^{-1}$
Avant culture	4,5 a	0,29 c
Sans végétation	3,0 b	0,40 b
<i>L. emarginata</i>	4,1 a	0,49 a

C. Cinétique d'altération du Chrysotile

Pendant les dix premières semaines de culture, les quantités de Mg lixiviées dans le percolat en présence de *L. emarginata*, sont significativement plus élevées par rapport au témoin sans plante (Figure 59). Les quantités de Mg libérées mesurées pour les deux modalités évoluent alors de façon similaire.

En revanche, à partir de la dixième semaine de culture de *L. emarginata*, les quantités de Mg lixiviées ont brutalement diminué (- 15 % en moyenne) puis se sont stabilisées jusqu'à la fin de la culture. Les valeurs obtenues en présence ou en absence de *L. emarginata*, ne sont alors plus significativement différentes. La diminution observée (environ 1,5 mg de Mg en moyenne) correspond approximativement à la quantité totale de Mg mesurée dans les tissus de *L. emarginata* (1,3 mg) à la fin de la culture.

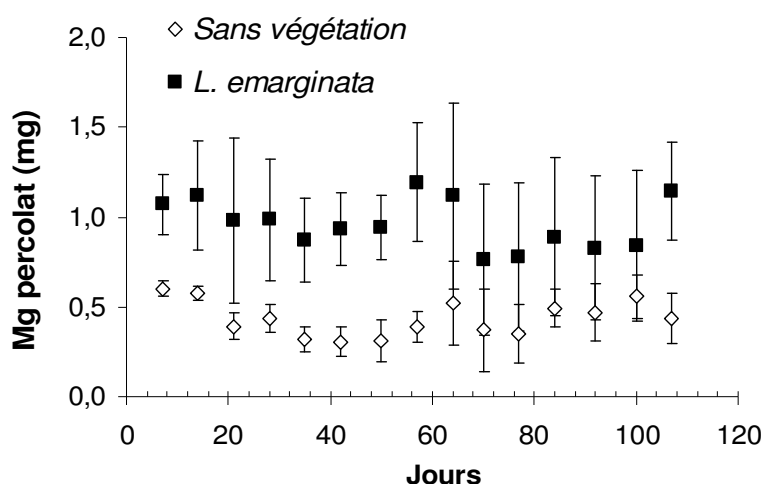


Figure 59. Quantités de Mg percolée au cours de chaque semaine de la culture.

D. Taux de dissolution du Chrysotile

Le taux de dissolution du **Chrysotile** a été calculé d'après la formule [7] (Chapitre IV) à partir des concentrations en Mg mesurées dans les solutions globales obtenues en fin de culture (Tableau 22). Dans ce calcul la quantité de Mg absorbée par *L. emarginata* a été négligée. Le taux de dissolution du **Chrysotile** est significativement plus élevé en présence de *L. emarginata*, soit 2,3 fois par rapport au témoin.

Tableau 22. Taux de dissolution du **Chrysotile** en présence ou non de *L. emarginata*. a,b : analyse de variance effectuée entre les différentes modalités (Newman-Keuls, p=0,05).

	r (mol m ⁻² s ⁻¹)	
Sans végétation	9,3.10 ⁻¹⁴	b
<i>L. emarginata</i>	2,2.10 ⁻¹³	a

2.1.5. Analyses minéralogiques du mélange Chrysotile-Quartz

Aucune variation de la composition minéralogique (néoformation ou transformation) n'a pu être mise en évidence par les analyses en DRX effectuées sur les échantillons **Quartz-Chrysotile** (lames orientées) avant et après 15 semaines de culture (Figure 60).

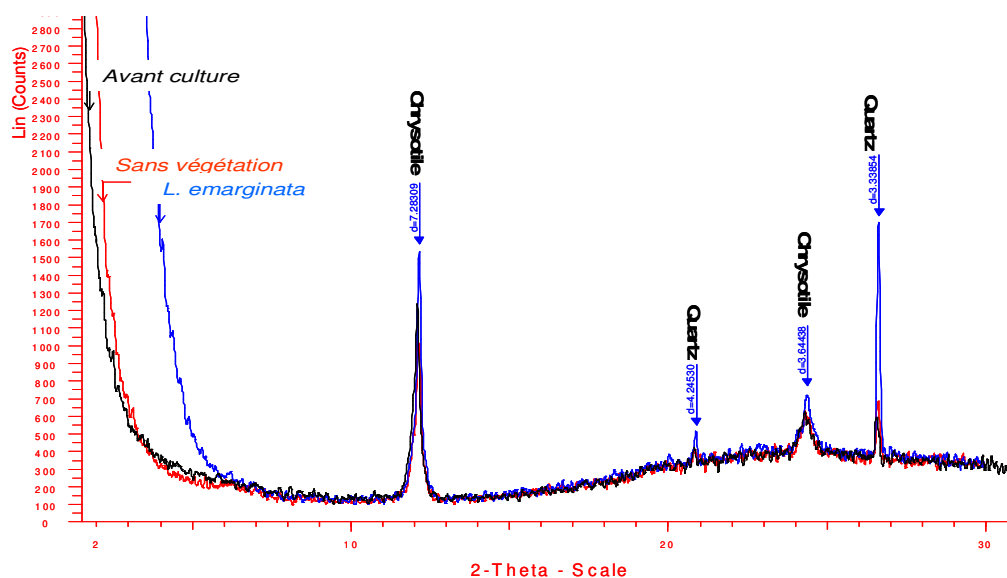


Figure 60. Diffractogrammes issus de l'analyse en DRX des échantillons Quartz-Chrysotile (lames orientées) avant et après la culture de 15 semaines.

2.1.6. Analyses microscopiques du mélange Chrysotile-Quartz

Aucune figure de dissolution ou de précipitation n'a été observée sur les particules de **Chrysotile** après la culture. Les fibres de **Chrysotile**, avant et après la culture, apparaissent le plus souvent sous forme de pelotes (Figure 61 A). Néanmoins, lorsque la plante est présente, les fibres de **Chrysotile** peuvent se lier étroitement à la racine, et ainsi former des plages minérales se confondant avec la racine (Figure 61 B).

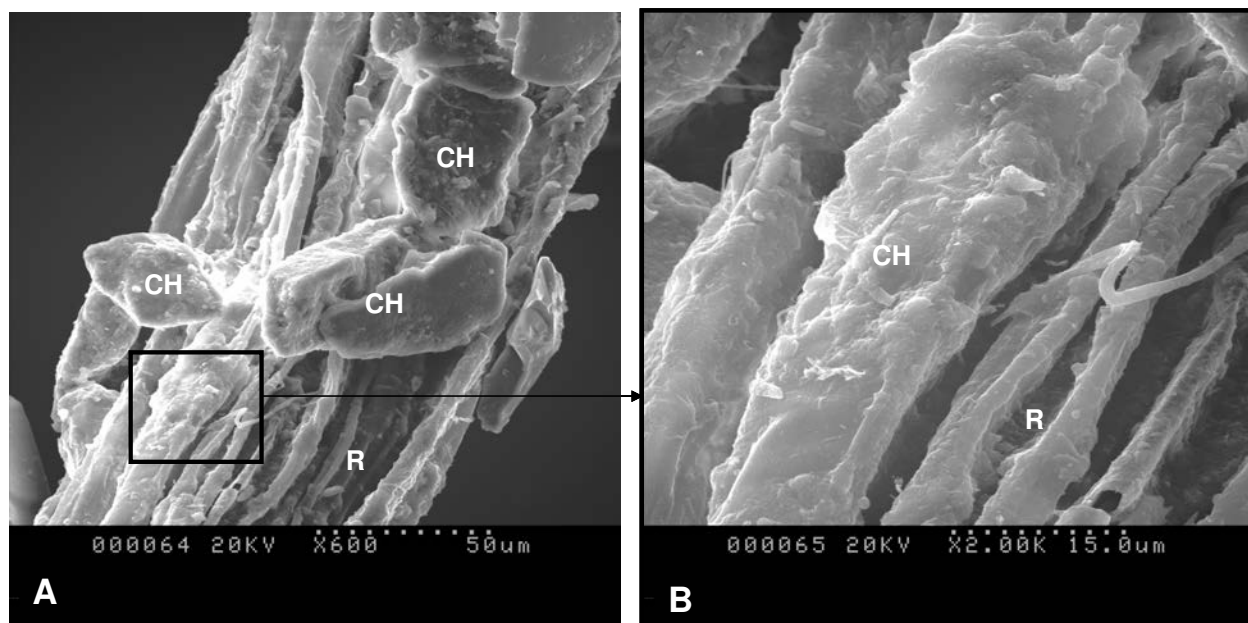


Figure 61. (A) Fibres de chrysotile (CH) sous forme de pelotes adhérentes à la racine de *L. emarginata* (R) après 15 semaines de culture. (B) Fibres de chrysotile plaquées contre la racine.

2.2. Mécanismes impliqués dans la mobilisation du Ni

2.2.1. Activité des bactéries dans la rhizosphère de *L. emarginata*

Les bactéries présentes dans les colonnes témoin (Sans végétation) proviennent de contaminations externes contractées pendant la culture (Figure 62). Le nombre de bactéries mesuré après 15 semaines d'expérimentation est significativement plus élevé en présence de *L. emarginata*. De nombreuses colonies de bactéries de couleur blanche, jaune et rose se sont développées en présence de *L. emarginata*. En revanche, les colonies qui se sont développées sur le milieu TSA pour la modalité *Sans végétation* étaient toutes translucides. Aussi, des bactéries habituellement associées à la rhizosphère de *L. emarginata* auraient été apportées au système par le biais des graines.

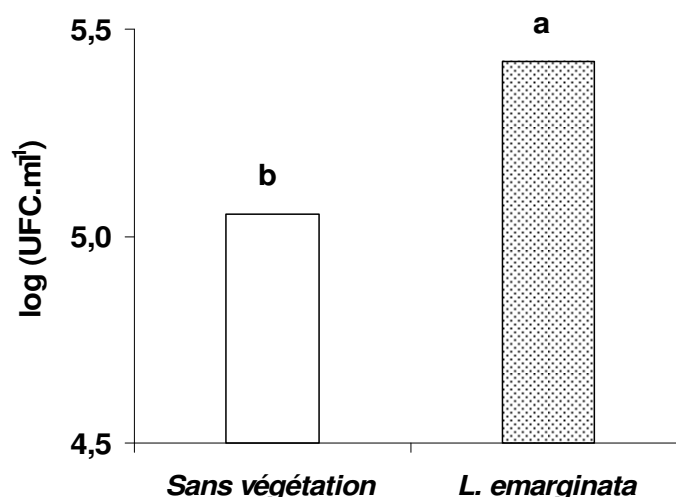


Figure 62. Nombre de colonies bactériennes présentes dans le système après culture. *a,b* : analyse de variance effectuée entre les différentes modalités (Newman-Keuls, $p=0,05$).

2.2.2. Evolution du pH dans la rhizosphère de *L. emarginata*

En fin d'expérimentation, le pH du mélange homogène des solutions percolées au cours des 15 semaines est de 6,7 pour le témoin sans plante et de 7,1 en présence de *L. emarginata*. Ces valeurs de pH sont nettement supérieures à celle de la solution nutritive apportée initialement au système ($pH=5,8$). L'évolution du pH au cours des 15 semaines de culture suit globalement l'évolution des quantités de Mg percolées (Figure 63). Ainsi, plus l'altération du **Chrysotile** est importante, plus le pH est élevé. Le pH de la solution de percolation est donc largement contrôlé par la présence du **Chrysotile** ($pH_{(\text{Chrysotile})} = 7,6$) qui joue le rôle de tampon en relarguant des ions OH^- lors de la dissolution des feuillets octaédriques.

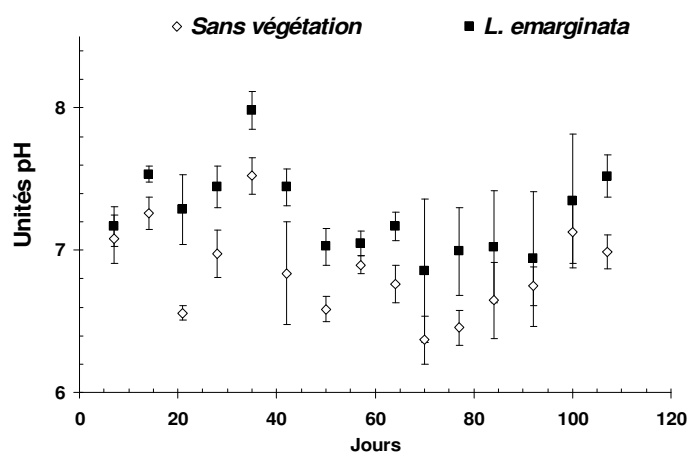


Figure 63. Evolution du pH des percolats au cours de la culture.

2.2.3. Relation entre l'absorption du Ni et la production de malate et de citrate par les hyperaccumulateurs

A. Teneur en Ni

Après deux semaines de culture hydroponique, les teneurs en Ni **dans les tissus** de *L. emarginata* et *Al. murale* sont plus élevées au niveau des parties aériennes qu'au niveau des racines (Figure 64). En revanche, les racines de l'hyperaccumulateur *Th. caerulescens* sont plus concentrées en Ni que ses parties aériennes, à l'instar de celles du témoin non accumulateur. En présence de Ni dans la solution nutritive, les teneurs en Ni dans les tissus des plantes sont nettement plus élevées par rapport au témoin sans Ni, excepté dans les parties aériennes d'*Al. murale* où les teneurs en Ni sont équivalentes dans les deux traitements.

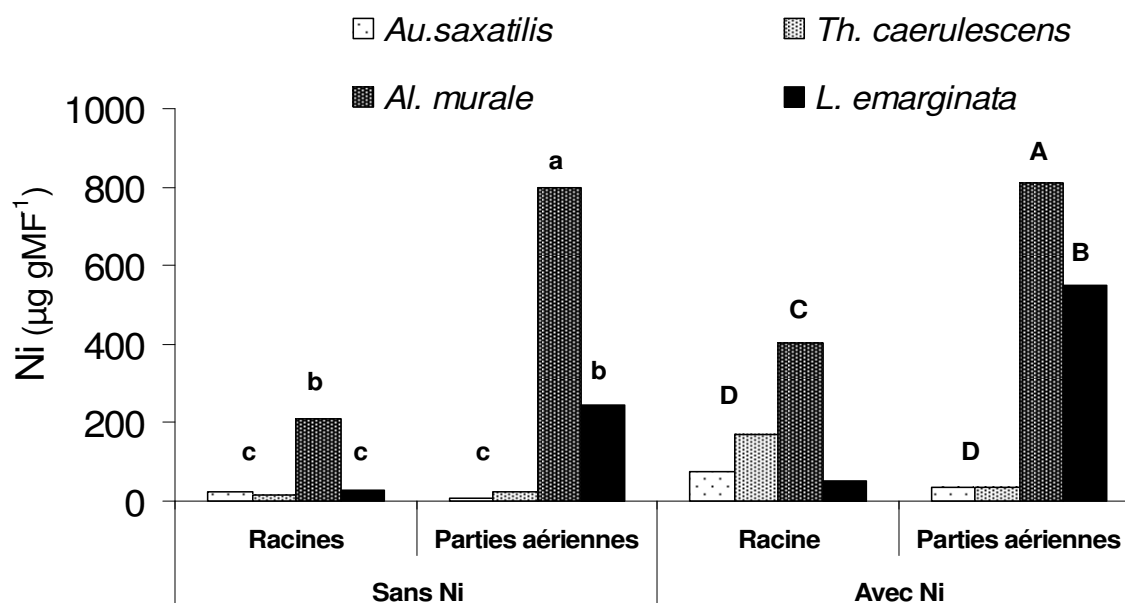


Figure 64. Teneurs en Ni dans les racines et les parties aériennes des plantes cultivées en absence ou en présence de Ni (1 mg l⁻¹) dans la solution nutritive. a,b,c : analyse de variance effectuée entre les différentes modalités (Newman-Keuls, p=0,05).

Le Ni présent dans les plantes malgré l'absence de Ni dans la solution nutritive provient des réserves de Ni contenues dans les graines (Tableau 11, Chapitre V). La quantité totale de Ni contenue dans les plantules de *L. emarginata* est néanmoins largement inférieure à celle d'une graine (8,68 µg de Ni par rapport à 28 µg de Ni par graine). Aussi, une large fraction du Ni contenu dans la graine a pu rester au niveau du tégument.

Le rapport R/PA entre les quantités de Ni contenues dans les racines (R) et celles contenues dans les parties aériennes (PA) des végétaux nous a permis d'estimer l'efficacité de translocation du Ni chez les différentes espèces (Tableau 23). Le Ni initialement contenu dans les graines des espèces hyperaccumulatrices, et notamment dans celles de *L. emarginata*, est préférentiellement distribué au sein des parties aériennes. La forte valeur du rapport R/PA pour l'espèce *Au. saxatilis* est due à une très grande variabilité entre les individus testés (R/PA varie entre 0,1 et 12). Néanmoins, les rapports obtenus pour chaque individu de l'espèce non accumulatrice étaient tous largement supérieurs à ceux des espèces hyperaccumulatrices *L. emarginata* et *Al. murale*. Lorsque les plantes ont été cultivées en présence de Ni, les quantités de Ni au sein des tissus ont augmenté. La distribution du Ni entre les racines et les parties aériennes de *L. emarginata* et de *Al. murale* est restée similaire à celle du témoin sans Ni. En revanche, le rapport R/PA sur le traitement avec Ni pour l'espèce *Th. caerulescens* a quasiment été multipliée par quatre par rapport au témoin en absence de Ni. L'efficacité de la translocation du Ni des racines vers les parties aériennes en présence de Ni apparaît telle que : *L. emarginata* ~ *Al. murale* > *Au. saxatilis* ~ *Th. caerulescens*.

Tableau 23. Quantité de Ni mesurée dans les racines (R) et les parties aériennes (PA) des plantes cultivées en absence ou en présence de Ni (1 mg l⁻¹). *a,b,c* : analyse de variance effectuée entre les différentes modalités, *n.s.* : non significatif (Newman-Keuls, p=0,05).

	SANS NICKEL			AVEC NICKEL		
	R	PA	R/PA	R	PA	R/PA
 Ni (µg)					
<i>L. emarginata</i>	0,21	8,47 <i>a</i>	0,02	0,40 <i>a</i>	19,10 <i>a</i>	0,03 <i>b</i>
<i>Th. caerulescens</i>	0,01 <i>n.s.</i>	0,08 <i>c</i>	0,13 <i>n.s.</i>	0,05 <i>b</i>	0,11 <i>b</i>	0,49 <i>a</i>
<i>Al. murale</i>	0,08	2,91 <i>b</i>	0,03	0,19 <i>b</i>	3,82 <i>b</i>	0,05 <i>b</i>
<i>Au. saxatilis</i>	0,04	0,03 <i>c</i>	3,24	0,06 <i>b</i>	0,19 <i>b</i>	0,32 <i>a</i>

La différence entre la quantité de Ni mesurée dans les plantes cultivées sur les solutions nutritives contenant du Ni et celles mesurées dans les plantes cultivées en absence de Ni nous a permis d'estimer la quantité nette de Ni absorbée par la plante pendant la culture. La quantité de Ni initialement contenue dans la solution était de 5 µg de Ni. Aussi, *L. emarginata* aurait absorbé 100 % de la quantité initiale de Ni en solution, *Al. murale* 10 %, *Au. saxatilis* 2 %, et *Th. caerulescens* seulement 1 %.

L'analyse des **solutions nutritives** des témoins sans plante a montré qu'entre 61 et 81 % du Ni initialement en solution a été adsorbée sur les parois des piluliers en verre. En présence des plantes, l'adsorption du Ni varie en fonction des espèces cultivées. La fraction de Ni adsorbé sur les parois peut être estimée à partir des concentrations du Ni mesurées dans les solutions avant et après culture et de celles mesurées dans les plantes. En présence de *Th. caerulescens* et de *Au. saxatilis*, la différence entre la teneur du Ni initiale et celle après culture est due en quasi-totalité à l'adsorption du Ni sur la paroi des piluliers (≥ 98 %). L'adsorption du Ni est plus faible en présence de *Al. murale* (87 %), voire nulle en présence de *L. emarginata*.

B. Teneur en acide citrique et en acide malique

Les teneurs en acides organiques **dans les tissus des végétaux** varient de manière importante entre les individus d'une même espèce (Figure 65) ; cela se traduit par des écarts-types entre répétitions d'une même modalité très importants. D'une manière générale, les tissus des plantes étaient plus concentrés en malate qu'en citrate. L'absence ou la présence de Ni dans le milieu de culture n'a pas eu d'effet significatif sur la production de citrate par les plantes. En revanche, les teneurs en malate dans les tissus des espèces *Th. caerulescens* et *Au. saxatilis* sont significativement plus élevées en présence de Ni dans la solution nutritive (Newman-Keuls, $p=0,05$).

Les teneurs en acides organiques mesurées après la culture **dans les solutions nutritives** contenant ou non du Ni, sont semblables à celles des solutions avant culture (résultats non présentés).

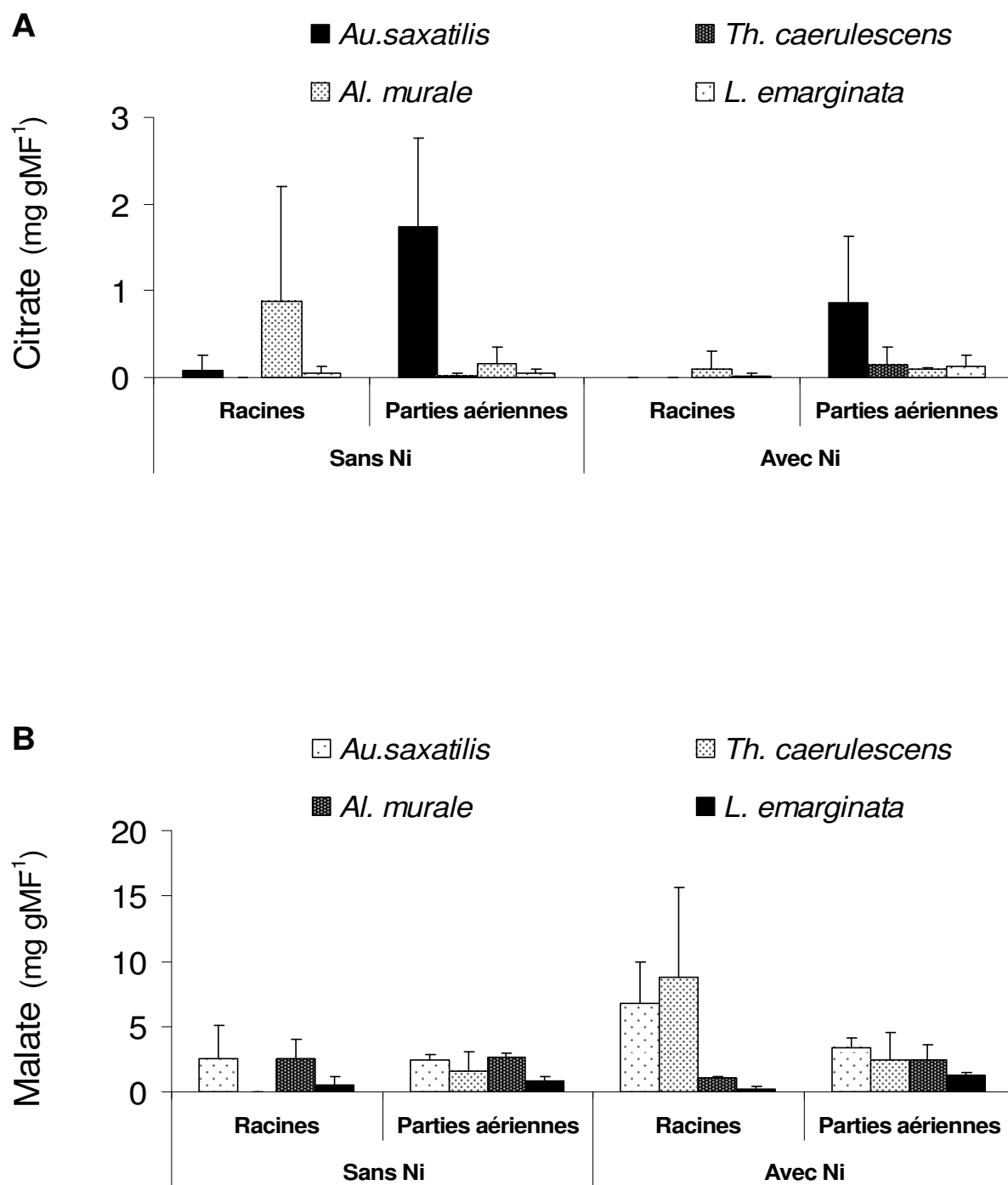


Figure 65. Teneurs en citrate (A) et en malate (B) dans les racines et les parties aériennes des plantes cultivées en absence ou en présence de Ni (1 mg l⁻¹) dans la solution nutritive.

C. Relation entre les teneurs en acides organiques et les teneurs en Ni dans les plantes

La teneur en acides organiques et la teneur en Ni dans les plantes semblent indépendantes, excepté en ce qui concerne le malate dans les parties aériennes de *L. emarginata* et d'*Au. saxatilis* (Figure 66). La teneur en malate dans les parties aériennes des deux espèces est d'autant plus élevée que la teneur en Ni l'est aussi. Compte tenu de la masse molaire du Ni ($58,69 \text{ g mol}^{-1}$) et du malate (134 g mol^{-1}), le nombre de moles de Ni est plus de 1000 fois supérieur à celui du malate. Le rapport Ni/Malate est significativement plus élevé dans les tissus de *Au. saxatilis* que dans ceux de *L. emarginata*, notamment en présence de Ni dans la solution nutritive.

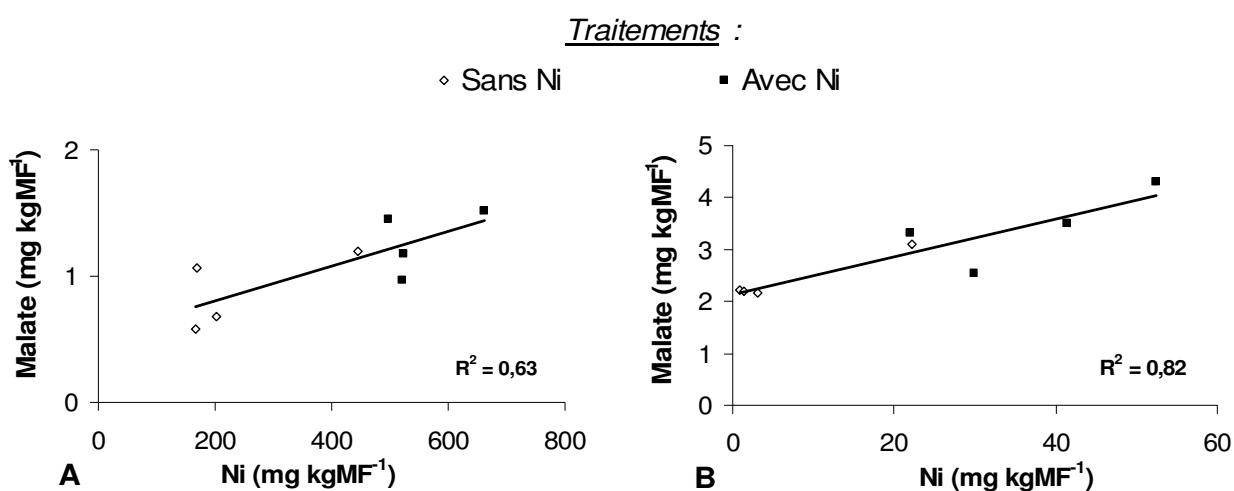


Figure 66. Relation entre la teneur en Malate et la teneur en Ni dans les parties aériennes de *L. emarginata* (A) et *Au. saxatilis* (B).

3. Discussion

La culture de *L. emarginata* sur un milieu dépourvu en Ni disponible a conduit au doublement du taux l'altération du **Chrysotile**. Le processus majoritaire d'altération du **Chrysotile** est la dissolution. La majorité du Ni solubilisé (88 %) est alors directement prélevée au niveau des racines puis transférée vers les parties aériennes.

Suite à la dissolution du **Chrysotile**, le Ni solubilisé serait adsorbé à la surface des particules minérales ; conduisant à une importante augmentation de la quantité du Ni phytodisponible au sein du système, mais pas de la quantité du Ni en solution. La dissolution du **Chrysotile** n'a apparemment pas conduit à la néoformation de phases minérales secondaires. En présence de la plante, le Mg et le Ni sont libérés de manière stoechiométrique lors de la dissolution du **Chrysotile**. La dissolution des couches magnésiennes du chrysotile libère 100 fois plus de Mg, et 10 fois plus de Fe, par rapport au Ni. Le Mg et le Fe, solubilisés

simultanément au Ni, ont été principalement lixiviés dans les percolats. *L. emarginata* n'aurait absorbé que 6 % du Fe et 9 % du Mg solubilisé lors de la dissolution du chrysotile. Ainsi, la plante favoriserait l'altération du **Chrysotile** permettant (i) l'acquisition des nutriments nécessaires à son métabolisme, et (ii) l'accumulation d'une quantité élevée de Ni dans ses parties aériennes. Aussi, nous ne pouvons pas exclure le fait que l'absence initiale de Fe et de Mg dans la solution nutritive ait pu jouer un rôle dans l'initiation des processus physiologiques d'altération du **Chrysotile**.

Plusieurs travaux ont montré que les espèces hyperaccumulatrices pouvaient influencer la mobilité des métaux, en induisant des variations chimiques au sein de la rhizosphère (Marschner, 1986 ; Morel *et al.* 1986). Le pH de la solution au sein du système est largement contrôlé par la présence du **Chrysotile** qui joue le rôle de tampon. La solubilisation d'ions OH⁻ lors de la dissolution du **Chrysotile** entraîne alors une augmentation du pH au sein du système. Aussi, si l'acidification de la rhizosphère fait partie des mécanismes induits par la plante afin de favoriser la dissolution du **Chrysotile**, celle-ci n'est pas perceptible en raison du tampon du pH.

Au vu des résultats des cultures hydroponiques, l'exsudation d'acides organiques, et notamment du malate et du citrate, par les racines des hyperaccumulateurs ne serait pas impliquée dans la mobilisation du Ni. La production de citrate au sein des tissus des végétaux ne semble dépendre (i) ni de la quantité de Ni accumulée dans la plante, (ii) ni de la présence ou de l'absence de Ni dans le milieu de culture. Chez les espèces *L. emarginata* et *Au. saxatilis*, les teneurs en malate dans les parties aériennes semblent corrélées aux teneurs en Ni. Néanmoins, le rapport Ni/malate est 50 fois plus élevé pour l'espèce hyperaccumulatrice. Au terme des deux semaines de culture sur milieu hydroponique, l'hyperaccumulateur *Th. caerulescens* semble s'être comporté comme l'espèce non accumulatrice *Au. saxatilis*, *i.e.* (i) les teneurs du Ni au sein des tissus et la translocation du Ni des racines vers les parties aériennes ne sont pas significativement différentes, (ii) les teneurs en malate dans ses tissus, et notamment dans ses racines, sont significativement plus élevées en présence de Ni dans le milieu.

Les plantes peuvent également jouer un rôle indirect sur la mobilisation des métaux. D'une part, le prélèvement intense du Ni (88 % du Ni libéré par l'altération du minéral), induit une diminution du Ni hydrosoluble au sein de la rhizosphère. Dans ce cas, la solution est généralement réalimentée en Ni par la fraction de Ni sorbé sur la phase minérale, ce qui à long terme favorise la dissolution du minéral. D'autre part, la présence de *L. emarginata* a permis le développement de colonies bactériennes spécifiques au sein de sa rhizosphère.

Certaines de ces rhizobactéries pourraient favoriser l'altération des minéraux et ainsi contribuer à la solubilisation du Ni, comme l'ont précédemment montré certains travaux pour l'espèce hyperaccumulatrice *Al. murale* (Abou-Shanab *et al.*, 2003 et 2006). La caractérisation des rhizobactéries associées à *L. emarginata* et de leur rôle vis-à-vis de la mobilisation et de l'accumulation nécessite une étude approfondie.

4. Conclusion

Lorsqu'elles se développent sur des milieux à faible disponibilité du Ni, les plantes hyperaccumulatrices de Ni peuvent favoriser la dissolution de minéraux silicatés nickélicifères afin d'acquérir et d'accumuler des quantités élevées de métal dans leurs parties aériennes. Dans ce cas, la quasi-totalité du Ni solubilisé est instantanément absorbée au niveau des racines des plantes puis transférée vers les parties aériennes. Le prélèvement intense du Ni ainsi que la stimulation de bactéries spécifiques au sein de la rhizosphère des hyperaccumulateurs pourraient être préférentiellement impliqués dans la solubilisation du Ni en favorisant l'altération des phases minérales du milieu. Bien que non perceptibles au cours de nos expérimentations, l'acidification de la rhizosphère et/ou l'exsudation d'acides carboxyliques par les plantes hyperaccumulatrices restent néanmoins deux mécanismes pouvant vraisemblablement être impliqués dans l'augmentation du taux d'altération des minéraux nickélicifères.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'accumulation du Ni au niveau des feuilles semble jouer un rôle important dans l'écophysiologie des hyperaccumulateurs et leur adaptation au milieu.

Conclusion générale

L'objectif de nos travaux de recherche était de contribuer à la compréhension des mécanismes chimiques et biologiques qui conditionnent l'accumulation du Ni dans les parties aériennes des plantes hyperaccumulatrices, en réponse à la disponibilité du métal dans le sol. Pour répondre à cet objectif, nous avons dans un premier temps réalisé une étude *in situ* sur le fonctionnement naturel du système *sol ultramafique-Brassicacée hyperaccumulatrice de Ni*. Cette approche d'observation nous a permis d'identifier l'origine et la nature des phases porteuses de Ni dans les sols ultramafiques et d'établir l'importance de leur altération vis-à-vis de la disponibilité du Ni dans les sols. Nous avons ensuite focalisé sur l'étude de l'altération de trois minéraux nickélifères modèles (**Chrysotile**, **Smectite**, **Goethite**) communs des sols ultramafiques, et présentant une gamme de disponibilité du Ni. La caractérisation de ces minéraux (structure, propriétés, disponibilité du Ni) a permis de montrer la relation existant entre la spéciation du Ni et sa disponibilité au sein des phases minérales. Puis, nous avons déterminé l'impact de trois Brassicacées hyperaccumulatrices de Ni natives de sols ultramafiques d'Europe (*L. emarginata*, *Al. murale* et *Th. caerulescens*) sur l'altération de ces minéraux, et plus généralement sur la disponibilité du Ni dans le milieu de culture. Une première expérimentation consistait à cultiver les plantes sur une terre agricole dans laquelle ont été insérées de manière localisée les phases porteuses de Ni (culture en rhizotron). Dans ce contexte, le substrat de culture *terre+minéral* était initialement pourvu en Ni phytodisponible. Après avoir mis en évidence la réponse des différentes espèces hyperaccumulatrices quant à l'extraction du Ni, nous avons étudié les mécanismes chimiques et physiologiques induits par les hyperaccumulateurs, susceptibles de favoriser l'accumulation du Ni par les plantes hyperaccumulatrices (analyses XAS, culture hydroponique). Une seconde expérimentation a été réalisée afin de déterminer le taux d'altération du **Chrysotile** (à faible disponibilité du Ni) dans la rhizosphère de l'espèce présentant le plus fort potentiel d'extraction du Ni des trois hyperaccumulateurs étudiés, *i.e.* *L. emarginata* (culture en colonne lysimétrique).

Les principaux résultats de nos travaux de recherche sont détaillés ci-après et étayés par un schéma de synthèse (Figure 67).

Les résultats acquis au travers de l'étude du fonctionnement naturel du site ultramafique de Bergenbach montrent que la teneur et la disponibilité du Ni dans de tels sols sont directement liées à l'abondance, à l'altérabilité et aux teneurs en Ni des minéraux (Figure 67, ①), ainsi qu'aux conditions édaphiques du milieu. La nature, l'abondance et la teneur en Ni des minéraux présents dans les sols dépendent initialement de la composition de la roche mère et des conditions pédogénétiques du milieu. Nous avons montré, au travers de l'étude *in situ*, que les minéraux silicatés ferromagnésiens primaires (*e.g.* serpentine, chlorite) et secondaires (*e.g.* smectite), ainsi que les oxyhydroxydes de Fe secondaires étaient les principales sources de Ni dans les sols ultramafiques. La majeure partie du Ni serait incluse dans la structure cristalline (feuilletés octaédriques) de ces minéraux, sous forme non disponible pour les plantes. La dissolution des phyllosilicates ferromagnésiens nickélicifères hérités de la roche mère (*e.g.* chlorite, serpentine), moins stables dans les sols aérés que les oxyhydroxydes cristallisés, constituent la principale source de Ni phytodisponible des sols. Elle conduit à la solubilisation du Mg, du Ni et du Fe contenu dans le réseau cristallin des minéraux. La solubilisation d'importantes quantités de Fe et de Ni conduirait à la néoformation d'oxydes de Fe amorphes à fortes teneurs de Ni disponible pour les plantes hyperaccumulatrices. De plus, la libération simultanée d'ions OH⁻ dans la solution, lors de la dissolution des feuilletés octaédriques, serait à l'origine de l'augmentation du pH, observée dans les sols à plus forte disponibilité du Ni. L'analyse des parties aériennes des individus de l'espèce *Th. caeruleus* présents naturellement sur le site ultramafique étudié a permis de montrer que l'accumulation du Ni par les plantes hyperaccumulatrices est directement liée à la disponibilité du Ni dans les sols, et donc à la pédogenèse et ses effets directs sur la nature et l'altération des phases minérales nickélicifères.

L'étude de l'altération des minéraux nickélicifères modèles sous l'influence des plantes a montré que lorsque le milieu de culture est naturellement, et suffisamment, pourvu en Ni phytodisponible, les espèces hyperaccumulatrices accumulent le Ni proportionnellement à l'offre du sol (Figure 67, ②). Les formes de Ni, disponibles pour ces dernières, correspondent aux formes ioniques, complexées, et incluses dans des précipités amorphes facilement solubilisables (en particulier de Fe). Le fort prélèvement de Ni par les hyperaccumulateurs conduit à un appauvrissement significatif de la fraction de Ni initialement disponible du milieu. Dans ces conditions, il n'y a pas d'incidence sur l'altération naturelle des minéraux nickélicifères présents dans le milieu, quelle que soit leur nature. *L. emarginata*, et dans une moindre mesure *Al. murale*, sont nettement plus efficaces que *Th. caeruleus* en terme d'extraction du Ni du sol. Les teneurs en Ni dans les tissus des trois espèces étudiées sont

équivalentes, néanmoins *L. emarginata* et *Al. murale* produisent environ trois fois plus de biomasse que *Th. caerulescens*, toutes conditions égales. Ainsi, le potentiel de phytoextraction des hyperaccumulateurs dépend à la fois du développement végétatif et de la capacité d'accumulation du Ni de chaque espèce. Nous avons mis en évidence différentes spécificités physiologiques pouvant être impliquées dans l'efficacité d'extraction du Ni chez les trois espèces hyperaccumulatrices étudiées. La morphologie du système racinaire des espèces

L. emarginata et *Al. murale* (racines nombreuses, épaisses et longues) pourrait faciliter l'absorption du Ni présent dans le substrat par les racines en augmentant (i) le volume de sol prospecté et/ou (ii) la surface de contact entre le sol et la racine. De plus, nous avons constaté que la translocation du Ni des racines vers les parties aériennes, et notamment les feuilles, semble s'expliquer par une spéciation (nature du ligand) nettement plus efficace chez les deux espèces à fort potentiel d'extraction (analyses XAS : bulk-EXAFS). Dans ce cas, les organes de transfert contiennent majoritairement du citrate comme ligand (Figure 67, ③). Les complexes Ni-citrate se présenteraient sous forme de Ni-(citrate)₂ très stables (stabilité > aux complexes Ni-malate), ce qui, au niveau du xylème assurerait une absence de dispersion du Ni et donc un transfert du Ni vers les feuilles plus efficace. La présence de complexes Ni-malate dans les feuilles des trois hyperaccumulateurs étudiés pourrait jouer un rôle dans le stockage du Ni (Figure 67, ④), en facilitant par exemple la séquestration du métal dans les vacuoles, où le malate est abondant pour assurer l'osmorégulation.

L'étude de l'altération du **Chrysotile** dans la rhizosphère de *L. emarginata* a montré qu'à l'inverse de la situation précédente, lorsque la teneur en Ni phytodisponible est faible (<0,5 mg kg⁻¹), la dissolution du minéral est accélérée en présence de la plante (Figure 67, ⑤). Et dans ce cas, la plante accumule moins de Ni dans ses parties aériennes. En revanche, elle optimise le prélèvement du métal en absorbant la quasi-totalité du Ni ainsi solubilisé (> 85 %). Les mécanismes impliqués dans la mobilisation du Ni au sein de la rhizosphère des hyperaccumulateurs (pH, Eh, exsudats racinaires, déplétion de Ni soluble) sont encore peu connus et souvent issus de concepts généraux, supposés communs à l'ensemble des espèces végétales et des métaux, mais non avérés dans le cas des hyperaccumulateurs de Ni. Nos travaux nous ont permis de faire ressortir certains mécanismes qui pourraient intervenir préférentiellement dans la solubilisation du Ni au sein de la rhizosphère des plantes hyperaccumulatrices de Ni. Le prélèvement intense et continu du Ni dans la rhizosphère des hyperaccumulateurs conduit à un appauvrissement de la fraction disponible du Ni. Cela peut conduire à un déplacement des équilibres existants, d'une part, entre les différents

compartiments de Ni de la phase solide du sol et, d'autre part, entre la phase solide et la solution du sol. Ces équilibres favoriseraient le réapprovisionnement en Ni de la solution du sol et activeraient ainsi la dissolution des minéraux porteurs de Ni. La stimulation d'une microflore spécifique (bactéries résistantes au Ni) dans la rhizosphère de *L. emarginata* a pu également favoriser l'altération de minéraux nickélifères, contribuant ainsi à l'augmentation de la disponibilité du Ni dans la rhizosphère et par conséquent à son prélèvement par la plante. En revanche, l'implication d'exsudats racinaires de type malate ou citrate dans la mobilisation du Ni au sein de la rhizosphère des hyperaccumulateurs n'a pas été vérifiée dans nos travaux. De plus, contrairement aux connaissances générales sur la mobilisation des métaux dans la rhizosphère des végétaux, nous n'avons pas mis en évidence d'acidification de la rhizosphère. A l'inverse, nous avons constaté que la culture des hyperaccumulateurs induisait une augmentation systématique du pH global du substrat de culture. Nous avons montré que la solubilisation d'ions OH^- induite par l'altération des phyllosilicates ferromagnésiens tamponnait fortement le milieu et pouvait même mener à une augmentation du pH de la solution. Néanmoins, dans le cas des cultures en rhizotron, l'augmentation du pH de la terre agricole est indépendante des minéraux nickélifères insérés. Aussi, l'exsudation de cations autres que H^+ en compensation de l'absorption élevée de Ni, serait-elle une hypothèse pour expliquer cette augmentation du pH.

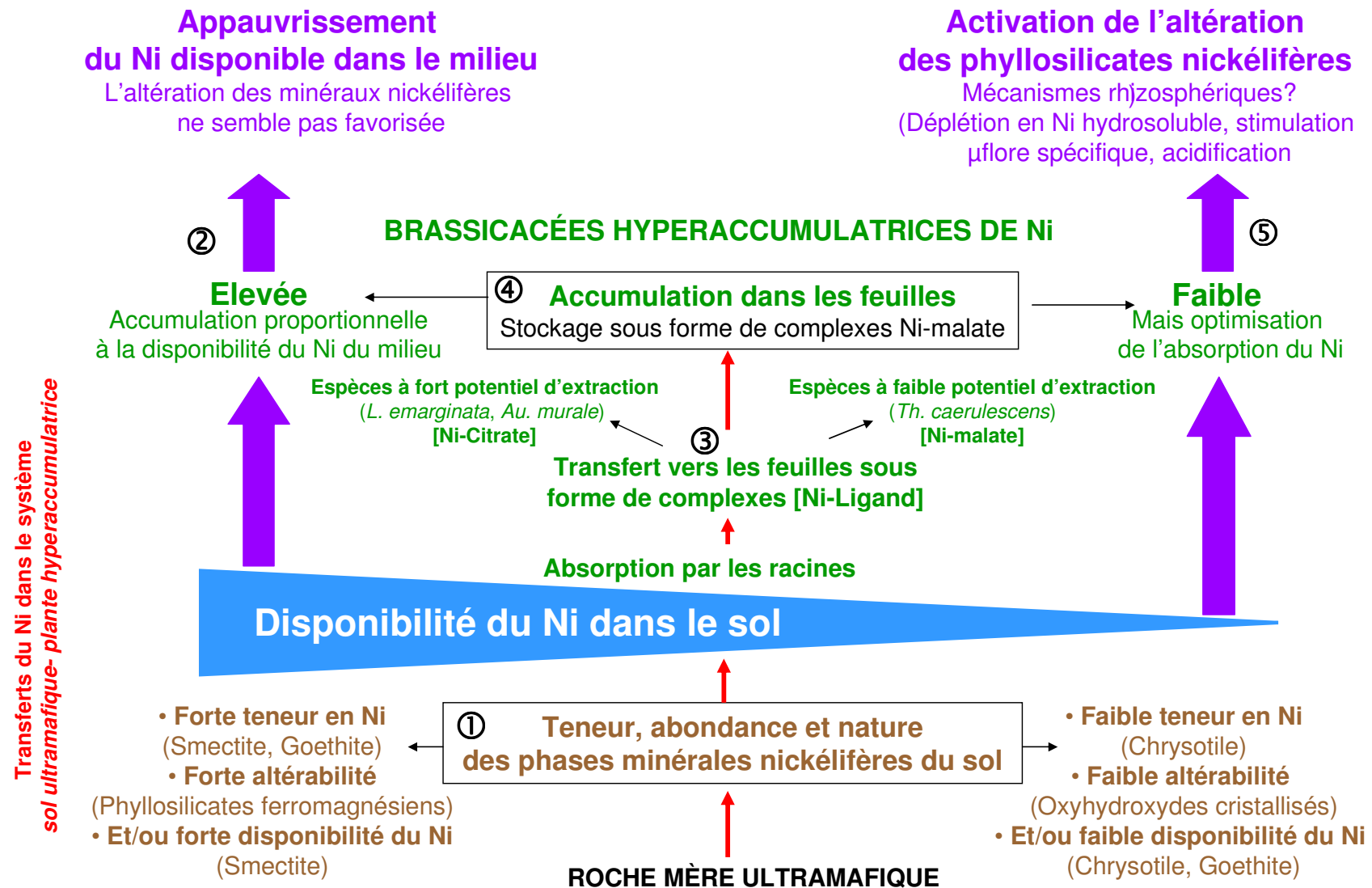


Figure 67. Schéma de synthèse sur la réponse de Brassicacées hyperaccumulatrices à la disponibilité du Ni des sols ultramafiques (①②③④⑤ = références du texte).

Pour faciliter l'application du procédé de phytoextraction du Ni à grande échelle il est important de contribuer à l'élaboration d'un modèle cultural qui permettra de prédire les résultats d'une culture de phytoextraction par des plantes hyperaccumulatrices en tenant compte des conditions environnementales spécifiques à chaque site (type de sol, climat,...). Les résultats majeurs issus de ce travail doivent contribuer significativement à la définition et à l'orientation des processus à prendre en compte dans un tel modèle. Les perspectives scientifiques de ce travail s'inscrivent donc désormais dans ce contexte. De même, les perspectives en terme d'application de ces résultats découleront de la mise en place de ce modèle, permettant d'évaluer la faisabilité et l'efficacité du procédé de phytoextraction du Ni sur le terrain.

Nous avons montré dans ce travail que la connaissance de la disponibilité du Ni dans le sol est une étape essentielle dans la modélisation de la phytoextraction du métal. Aussi, l'étude préalable des constituants du sol, de la chimie de la solution et des réactions physico-chimiques susceptibles de se produire dans les sols permet-elle d'évaluer la disponibilité du Ni. Dans les sols à forte disponibilité du Ni, cela permet de prévoir, en fonction de l'offre du sol, la quantité de métal que la plante va accumuler dans ses parties aériennes. D'autre part, nous avons montré que, dans les sols à faible disponibilité du Ni, la présence des hyperaccumulateurs favorise l'altération des phyllosilicates nickélicifères au sein de la rhizosphère. La détermination d'une éventuelle concentration seuil, au deçà de laquelle les hyperaccumulateurs déclencheraient des mécanismes spécifiques accélérant la solubilisation du Ni, est importante pour l'application vers le modèle de phytoextraction car elle implique la prise en compte ou non de ces derniers.

Une autre étape, particulièrement importante dans la modélisation du procédé de phytoextraction, est d'établir le rôle et la dynamique de la matière organique du sol ainsi que leurs conséquences sur la disponibilité du Ni dans les sol et sur son accumulation par les hyperaccumulateurs. Il est notamment essentiel d'approfondir nos connaissances (i) sur l'implication des microorganismes de la rhizosphère dans la mobilisation du Ni et (ii) sur les conséquences du retour au sol de la matière végétale sénescence à forte teneur en Ni vis-à-vis de la disponibilité du Ni à court et à long terme dans les sols. Des travaux menés sur la disponibilité du Cd et du Zn dans les feuilles de *Th. caerulescens* ont montré que la décomposition des feuilles sénescences au niveau de la litière du sol constituait une source de métal plus soluble et plus assimilable par les plantes que les métaux présents dans le sol (Perronnet, 2000). Cela pourrait également se vérifier dans le cas du Ni. En effet, nous avons montré que le Ni était stocké dans les feuilles des hyperaccumulateurs sous forme de

complexes stables *Ni-carboxylate*, pouvant devenir très solubles après la dégradation des cellules végétales.

Le choix de l'espèce hyperaccumulatrice cultivée est important pour optimiser le procédé de phytoextraction du Ni. Il dépend de ses besoins climatiques et nutritionnels, et de l'efficacité d'extraction des plantes (paramétrage écophysologique de la plante, impact spécifique du métal sur l'écophysologie de la plante). Certains mécanismes physiologiques spécifiques pourraient intervenir dans l'optimisation du processus d'hyperaccumulation (*e.g.* les transferts membranaires du Ni au niveau des racines, ou la spéciation et la localisation du Ni au cours de son transfert des racines vers son lieu de stockage). Nous avons montré, par exemple, que la spéciation du Ni pouvait intervenir sur l'efficacité de son transfert au sein du xylème. L'identification et le transfert de gènes impliqués dans de tels processus physiologiques permettraient à terme de sélectionner et développer des espèces hyperaccumulatrices de Ni à fort potentiel d'extraction, et adaptées à des conditions environnementales multiples.

Enfin, pour caler puis valider un modèle de culture agronomique, il est nécessaire de passer à l'échelle du terrain (essais agronomiques) afin de préciser l'impact des conditions environnementales sur l'efficacité de la phytoextraction et de valider les résultats de la modélisation issus de données de laboratoire. La prise en compte des effets du climat (ensoleillement, température, pluviométrie) sur l'écophysologie et des éventuels prédateurs (insectes ravageurs) sur le développement et l'efficacité des plantes hyperaccumulatrices est primordiale pour garantir la viabilité d'une application à grande échelle du procédé de phytoextraction. Une fois établi, un tel modèle, permettra le développement d'une filière économique de phytoextraction du Ni dans laquelle les résultats présents auront apporté une précision primordiale en terme d'étude de la faisabilité et de l'efficacité attendue de la phytoextraction à but commercial (phytomining).

Références bibliographiques

- Aboudrar W., Schwartz C., Benizri E., Morel J.L. et Boularbah A., 2007 – Soil microbial diversity as affected by rhizosphere of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* under natural conditions. *International Journal of Phytoremediation*, 9(1) : 41-52.
- Abou-Shanab R.I., Delorme T.E., Angle J.S., Chaney R.L., Ghanem K., Moawad H. et Ghazlan H.A., 2003a – Effects of the Nickel Hyperaccumulator *Alyssum murale* on Rhizosphere Microbial Populations. *International Journal of Phytoremediation*, 5 : 367 - 379.
- Abou-Shanab R.A., Angle J.S., Delorme T.A., Chaney R.L., van Berkum P., Moawad H., Ghanem K. et Ghazlan H.A., 2003b – Rhizobacterial effects on nickel extraction from soil and uptake by *Alyssum murale*. *New Phytologist*, 158 : 219-224.
- Abou-Shanab R.A.I., Angle J.S. et Chaney R.L., 2006 – Bacterial inoculants affecting nickel uptake by *Alyssum murale* from low, moderate and high Ni soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 38 : 2882-2889.
- Amrhein C., Mocher P.A., Strong J.E. et Pacheco P.G., 1994 – Trace metal solubility in soils and waters receiving deicing salts. *Journal of Environmental Quality*, 23 : 219-227.
- Anderson A.J., Meyer D.R. et Mayer F.K., 1973 – Heavy metal toxicities: levels of nickel, cobalt and chromium in the soil and plants associated with visual symptoms and variation in growth of an oat crop. *Australian Journal of Agricultural Research*, 24(4) : 557-571.
- Anderson C.W.N., Brooks R.R., Chiarucci A., LaCoste C.J., Leblanc M., Robinson B.H., Simcock R. et Stewart R.B., 1999 – Phytomining for nickel, thallium and gold. *Journal of Geochemical Exploration*, 67 : 407-415.
- Anderson P.R. et Christensen T.H., 1988 - Distribution coefficients of Cd, Co, Ni, and Zn in soils. *Journal of Soil Science*, 39 : 15-22.
- Angle J.S. et Linacre N.A., 2005 – Metal phytoextraction – A survey of potential risks. *International Journal of Phytoremediation*, 7(3) : 241-254.
- Askenov V.L., Kuzmin A.Y., Purans J. et Tyutyunnikov S.I., 2001 – EXAFS spectroscopy at synchrotron-radiation beams. *Physics of particles and Nuclei*, 32(6) : 1-33.
- Atkins G.L., 1973. Terminologie de l'analyse compartimentale. In *Modèles à compartiments multiples pour les systèmes biologiques*. Gauthier-Villars, Paris, 181 p.
- Baes C. F. et Mesmer R.E., 1976 – The hydrolysis of cations. Wiley, New York.
- Bailey S.W., 1980 – Summary of recommendations of AIPEA nomenclature committee on clay minerals. *American Mineralogist*, 65 : 1-7.
- Bailey S.W., 1988 – Chlorites: structures and crystal chemistry. In *Hydrous Phyllosilicates (exclusive of micas)*, Bailey S.W (Ed.). Mineralogy Society of America, Reviews in mineralogy, vol 19, pp 347-403.

- Baize D., 2000. Teneurs en métaux lourds dans les sols : résultats généraux du programme ASPITET. *Courrier de l'Environnement*, INRA, 39 : 39-54.
- Baker A.J.M. et Brooks R.R., 1989 – Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*, 1 : 81-126.
- Baker A.J.M., Proctor J., Reeves R.D., 1992 - The Vegetation of Ultramafic (Serpentine) Soils. Intercept, Andover, Hampshire, pp 509.
- Baker A.J.M., McGrath S.P., Sidoli C.M.D. et Reeves R.D., 1994 – The possibility of *in situ* heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. *Ressources, Conservation and Recycling*, 11 : 41-49.
- Baker E.N., Baker H.M., Anderson B.F. et Reeves R.G., 1983 – Chelation of nickel (II) by citrate. The crystal structure of a nickel-citrate complex, $K_2[Ni(C_6H_5O_7)(H_2O)_2]_2 \cdot 4H_2O$. *Inorganica Chimica Acta*, 78 : 281-285.
- Bennett B.G., 1981 – Summary exposure assessments for mercury, nickel, tin. Exposure commitments assessments of environmental pollutants, 1(2).
- Bennett B.G., 1984 – Environmental nickel pathways in man. In *Nickel in the human environment*, Sunderman FW Jr (Ed.). Lyon, France, International agency for research on cancer. *IARC scientific publication*, 53 : 487-495.
- Baldock J.A. et Nelson P.N., 2000 – Soil organic matter. In *Handbook of soil science*, Sumner M.E. (Ed.). CRC Press LLC. Section B, chapitre 2, B25-B84.
- Bales R.C. et Morgan J.J., 1985a – Dissolution kinetics of chrysotile at pH 7 to 10. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 49 : 2281-2288.
- Bales R.C. et Morgan J.J., 1985b – Surface charge and adsorption properties of chrysotile asbestos in natural waters. *Environmental Science & Technology*, 19 : 1213-1219.
- Bani A., Echevarria G., Sulçe S., Morel J.L. et Mullai A., 2007 – In-situ phytoextraction of Ni by a native population of *Alyssum murale* on an ultramafic site (Albania). *Plant and Soil*, 293 : 79-89.
- Baralkiewicz D. et Siepak J., 1999 – Chromium, nickel and cobalt in environmental samples and existing legal norms. *Polish Journal of Environmental Studies*, 8 : 201-208.
- Bartoli, F., Bird, N.R.A., Gomendy, V. and Vivier, H., 1999 - The relationship between silty soil structures and their mercury porosimetry curve counterparts : Fractals and percolation. *European Journal of Soil Science*. 50, 9-22.
- Becquer T., Pétard J., Duwig C., Bourdon E., Moreau R. et Herbillon A.J., 2001 – Mineralogical, chemical and charge properties of geric ferralsols from New Caledonia. *Geoderma*, 103 : 291-306.

- Becquer T., Le Crann A., Chardot V., Garnier J., Echevarria G., Quantin C., Martins E. S., 2005 - Teores de níquel e cromo dos solos do maciço máfico-ultramáfico de niquelândia (Goiás). Communication orale, 30ème Congrès Brésilien de Science du Sol. 17-22 Juillet 2005, Recife-PE, Brésil.
- Becquer T., Quantin C., Rotte-Capet S., Ghanbaja J., Mustin C. et Herbillon A.J., 2006 – Sources of trace metals in Ferralsols in New Caledonia. *European Journal of Soil Science*, 57 : 200-213.
- Bernard C, Roosens N, Czernic P, Lebrun M et Verbruggen N., 2004 - A novel CPx-ATPase from the cadmium hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *FEBS Letters*. 569:140-148.
- Bhatia N.P., Walsh K.B. et Baker A.J.M., 2005 – Detection and quantification of ligands involved in nickel detoxification in a herbaceous Ni hyperaccumulator *Stackhousia tryonii* Bailey. *Journal of Experimental Botany*, 56 (415) : 1343-1349.
- Bidwell S.D., Crawford S.A., Woodrow I.E, Sommer-Knudsen J. et Marshall A.T., 2004 – Sub-cellular localization of Ni in the hyperaccumulator, *Hybanthus floribundus* (Lindley) F.Muell. *Plant, Cell and Environment*, 27 : 705-716.
- Bissani C.A., 2000 – Effects of root-derived acids on metal speciation in soil solution and bioavailability. Thèse de Doctorat. Université du Wisconsin, Madison, 146 p.
- Bonneville S., 2005 - Kinetics of microbial Fe(III) oxyhydroxide reduction: The role of mineral properties. Thèse de Doctorat. *Geologica Ultraiectina*, 254, pp 128.
- Boominathan R. et Doran P.M., 2003 – Organic acid complexation, heavy metal distribution and the effect of ATPase inhibition in hairy roots of hyperaccumulator plant species. *Journal of Biotechnology*. 101 : 131-146.
- Boyd R.S. et Martens S.N., 1992 – The *raison d'être* of metal hyperaccumulation by plants. In *The vegetation of ultramafic (serpentine) soils*, A.J.M. Baker, J. Proctor, and R.D. Reeves (Eds.). Intercept Limited, Andover, Hampshire, pp 279-289.
- Boyd R.S., 1998 – Hyperaccumulation as a plant defensive strategy. In *Plants that hyperaccumulate heavy metals*, Brooks R.R. (Ed.). New York, USA, CAB International, pp 181-201.
- Brantley S.L., 2005 - Reaction kinetics of primary rock-forming minerals under ambient conditions. In *Surface and ground water, weathering, and soils*, Drever J.I. (Ed.). Treatise on Geochemistry, volume 5, Elsevier, pp 73-117.
- Brimecombe M.J., De Leij F.A. et Lynch J.M., 2001 – The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. In *The rhizosphere – Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*, Pinton R., Varanini Z. et Nannipieri P. (Eds). New-York, Chapitre 4, pp 95-137.

- Broadhurst C.L., Chaney R.L., Angle J.S., Erbe E.F. et Mangel T.K., 2004a – Nickel localization and response to increasing Ni soil levels in leaves of the Ni hyperaccumulator *Alyssum murale*. *Plant and Soil*, 265 : 225-242.
- Broadhurst C.L., Chaney R.L., Angle J.S., Mangel T.K., Erbe E.F. et Murphy C.A., 2004b – Simultaneous hyperaccumulation of nickel, manganese, and calcium in *Alyssum* leaf trichomes. *Environmental Science and Technology*. 38 : 5797-5802.
- Brooks R.R., 1983 – Biological Methods of Prospecting for Minerals. Wiley, New York, 322 p.
- Brooks R.R., 1987 - Serpentine and its vegetation: a multidisciplinary approach. Dioscorides Press, Portland, Oregon, USA, 454 p.
- Brooks R.R., 1998a – General Introduction. In *Plants that hyperaccumulate heavy metals*, Brooks R.R. (Ed.). New York, USA : CAB International, pp. 1-14.
- Brooks R.R., 1998b – Geobotany and hyperaccumulators. In *Plants that hyperaccumulate heavy metals*, Brooks R.R. (Ed.). New York, USA : CAB International, pp. 55-94.
- Brooks R.R., 1998c – Phytochemistry of hyperaccumulators. In *Plants that hyperaccumulate heavy metals*, Brooks R.R. (Ed.). New York, USA : CAB International, pp. 15-53.
- Brooks R.R., Lee J., Reeves R.D. et Jaffré T., 1977 – Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *Journal of Geochemistry Exploration*, 7 : 9-57.
- Brooks R. R., Shaw S. et Marfil A. A., 1981 – The chemical form and physiological function of nickel in some Iberian *Alyssum* species. *Physiol. Plant*, 51 : 167-170.
- Brown G., 1984 – Crystal structures of clay minerals and related phyllosilicates. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A*, 311 : 221-240.
- Brown P.H., Welch R.M. et Cary E.E., 1987 – Nickel: a micronutrient essential for higher plants. *Plant Physiology*, 85 : 801-803.
- Callahan D.L., Baker A.J.M., Kolev S.D. et Wedd A.G., 2006 – Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 11 : 2-12.
- Calvaruso C., Turpault M-P. et Frey-Klett P., 2006. Root-associated bacteria contribute to mineral weathering and to mineral nutrition in trees: a budgeting analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 : 1258-1266.
- Carvalho-E-Silva M.L., Ramos A.Y., Tolentino H.C.N., Enzweiler J., Netto S.M. et do Carmo Martins Alves M., 2003 – Incorporation of Ni into natural goethite: an investigation by X-ray absorption spectroscopy. *American Mineralogist*, 88 : 876-882.
- Chaney, R.L., 1983. Plant uptake of inorganic waste. In *Land Treatment of Hazardous Waste*, Parr J.E., Marsh P.B. et Kla J.M. (Eds.). Noyes Data Corp, Park Ridge, IL, pp 50-76.

- Chaney R.L., Li Y-M, Angle J.S., Baker A.J.M., Reeves R.D., Brown S.L., Homer F.A., Malik M. et Chin M., 1999 - Improving metal-hyperaccumulators wild plants to develop commercial phytoextraction systems: Approaches and progress. In *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water* (Eds), Terry N. et Bañuelos G.S., CRC Press, Boca Raton, FL.
- Chardot V., 2003 – Potentiel de phytoextraction de plantes hyperaccumulatrices de Ni. Mémoire de D.E.A. « National de Science du sol ». Institut National Polytechnique de Lorraine, France, 28 p.
- Chardot V., Massoura S.T., Echevarria G., Reeves R.D. et Morel J.L., 2005 – Phytoextraction potential of the nickel hyperaccumulators *Leptoplax emarginata* and *Bornmuellera tymphaea*. *International Journal of Phytoremediation*. 7 : 323-335.
- Chardot V., Echevarria G., Gury M., Massoura S.T. et Morel J.L. – Nickel bioavailability in an ultramafic toposequence in the Vosges Mountains (France). *Plant and Soil*, 293 : 7-21.
- Cheah S.-F., Kraemer S.M., Cervini-Silva J. et Sposito G., 2003 – Steady-state dissolution kinetics of goethite in the presence of desferrioxamine B and oxalate ligands : implications for the microbial acquisition of iron. *Chemical Geology*, 198 : 63-75.
- Clemens S., Palmgren M.G. et Krämer U., 2002 – A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *TRENDS in Plant Science*. 7 (7) : 309-315.
- Clinkenbeard J.P. Churchill K. et Lee K., 2002 – Guidelines for geologic investigations of naturally occurring asbestos in California. California Department of Conservation, Special publication 124, 70 p.
- Cojan I. et Renard M., 1997 - Sédimentologie. Masson, Paris, 418 p.
- Coleman R.G. et Jove C., 1992 – Geological origin of serpentinites. In *The vegetation of ultramafic (serpentine) soils*. A.J.M. Baker, J. Proctor, and R.D. Reeves (Eds.). Intercept, Andover, Hampshire, pp 1-17.
- Colpas G.J., Maroney M.J., Bagyinka C, Kumar M., Willis W.S., Suib S.L., Baidya N. et Mascharak P.K., 1991 – X-ray Spectroscopic Studies of Nickel Complexes, with Application to the Structure of Nickel Sites in Hydrogenases. *Inorg. Chem.* 30 : 920-928.
- Cosio ., DeSantis L., Frey B., Diallo S. et Keller C., 2005 – Distribution of cadmium in leaves of *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany*, 56(412) : 765-775.
- Da Fonseca M.G., Silva C.R., Barone J.S. et Airoldi C., 2000 – Layered hybrid nickel phyllosilicates and reactivity of the gallery space. *Journal of Materials Chemistry*, 10 : 789-795.

- Dähn R., Scheidegger A. M., Manceau A., Schlegel M. L., Baeyens B., Bradbury M. H., et Morales M., 2002 - Neof ormation of Ni phyllosilicate upon Ni uptake on montmorillonite: A kinetics study by powder and polarized EXAFS. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 66(13), 2335–2347.
- Dähn R., Scheidegger A.M., Manceau A., Schlegel M.L., Baeyens B., Bradbury M.H., et Chateigner D., 2003 - Structural evidence for the sorption of Ni(II) atoms on the edges of montmorillonite clay minerals: A polarized X-ray absorption fine structure study. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67(1): 1–15.
- Dalton D.A., Russel S.A. et Evans H.J., 1988 – Nickel as a micronutrient element for plants. *Biofactors*, 1(1) : 11-16.
- Davis M.A., Murphy J.F. et Boyd R.S., 2001 – Nickel increases susceptibility of a nickel hyperaccumulator to *Turnip mosaic virus*. *Journal of Environmental Quality*, 30 : 85-90.
- Dakora F.D. et Phillips D.A., 2002 – Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil*, 245 : 35-47.
- Deer W.A., Howie R.A. et Zussman J., 1992 - An introduction to the rock forming mineral. Longman Group Limited, New York, 2nd edition, pp 344-352.
- Desvaux, N.A., 1814 – Coup d’œil sur la famille des plantes Crucifères. *Journal de Botanique*, 3 : 145-187.
- Dixon N.E., Gazzola T.C., Blakeley R.L. et Zerner B., 1975 - Letter: Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? *Journal of the American Chemical Society*, 97(14):4131–4133.
- Duchaufour P., 1997 - Abrégé de pédologie : Sol, Végétation, Environnement. 5^{ème} édition. Masson, Paris. 291 p
- Ebinger M.H. et Schulze D.G., 1989 – Mn-substituted goethite and Fe-substituted groutite synthesized at acid pH. *Clays and Clay Minerals*, 37 : 151-156.
- Echevarria G., 1996 – Contribution à la prévision des transferts sol-plante des radionucléides. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France, 219 p.
- Echevarria G, Massoura S. et Morel J.L., 2000 – Caractérisation de la biodisponibilité du nickel dans les sols du jurassique inférieur et du trias de la région Lorraine, ENSAIA-INPL/INRA, Agence de l’Eau Rhin-Meuse, Vandœuvre-lès-Nancy, France.
- Echevarria G., 2006 - Biodisponibilité et transfert des éléments en traces dans les sols. Habilitation à Diriger les Recherches. Institut National Polytechnique de Lorraine, France, 85 p.
- Elzinga E.J. et Sparks D.L., 1999 – Nickel Sorption Mechanisms in a pyrophyllite-montmorillonite mixture. *Journal of colloid and Interface Science*, 213 : 506-512.

- Everett D.H., 1972 – Definitions, terminology and symbols in colloid and surface chemistry. *Pure and applied Chemistry*. 31(4) : 579-638..
- Fardeau J.C., 1981 – Cinétiques de dilution isotopique et phosphore assimilable des sols. Thèse de Doctorat d'Etat de Paris VI. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, France, 198 p.
- Gasser U.G, Jeanroy E., Mustin C., Barres O., Nüesch R., Berthelin J. et Herbillon A. J., 1996 - Properties of synthetic goethites with Co for Fe substitution. *Clay Minerals*, 31(4) : 465-476.
- Gérard E., Echevarria G., Sterckeman T. et Morel J.L., 2000 - Cadmium availability to plants varying in Cd accumulation pattern. *Journal of Environmental Quality*, 29, 1117–1123.
- Gerendás J., Polacco J.C., Freyermuth S.K. et Sattelmacher B., 1999 – Significance of nickel for plant growth and metabolism. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 162 : 241-256.
- Ghaderian Y.S.M., Lyon A.J.E. et Baker A.J.M., 2000. Seedling mortality of metal hyperaccumulator plants resulting from damping off by *Pythium* spp. *New Phytologist*, 146 : 219-224.
- Güven N., 1988 – **Smectites**. In *Hydrous Phyllosilicates (exclusive of micas)*, Bailey S.W. (Ed.). Reviews in mineralogy, Mineralogy Society of America, vol 19, chapitre 13.
- Hall J.L., 2002 – Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53 (366) : 1-11.
- Hiltner, 1904 - Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft*, 98: 59-78.
- Hinsinger P., 1998 – How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Advances in Agronomy*, 64 : 225-265.
- Hinsinger P., 2001 – Bioavailability of trace elements as related to root-induced chemical changes in the rhizosphere. In *Trace elements in the rhizosphere*, Gobran G.R., Wenzel W.W. et Lombi E. (Eds.). CRC Press LLC, Boca Raton London New York Washington, D.C., chapitre 2, pp 25-42.
- Hohl J.-L., 1994. - Minéraux et mines du massif vosgien. Editions du Rhin, Mulhouse, 272 p.
- Homer F.A., Reeves R.D. et Brooks R.R., 1997 – The possible involvement of aminoacids in nickel chelation in some nickel-accumulating plants. *Current Topics in Phytochemistry*, 14 : 31-33.
- Hopkins W.G., 2003 – Physiologie végétale. De Boeck et Larcier s.a., Bruxelles, chapitre 5 : 77-97.

- Hume L.A. et Rimstidt J.D., 1992 – The biodurability of chrysotile asbestos. *American Mineralogist*, 77 : 1125-1128.
- Hutchinson J.J., Young S.D., McGrath S.P., West H.M., Black C.R. et Baker A.J.M., 2000 - Determining uptake of 'non-labile' soil cadmium by *Thlaspi caerulescens* using isotopic dilution techniques. *New Phytologist*, 146 : 453-460.
- Jaffré T., Brooks R.R., Lee J. et Reeves R.D., 1976 – *Sebertia acuminata* : a hyperaccumulator of nickel from New Caledonia. *Science*, 193 : 579-580.
- Johan Z., Goni J., Sarcia C., Bonnaud G. et Bignon J., 1973 - Influence de certains acides organiques sur la stabilité du réseau du chrysotile. 6th international congress of organic geochemistry, Rueil-Malmaison, France, 18-21 September 1973. Paris, France: Editions Technip, pp 883-903.
- Jones D. L. et Darrah P. R., 1994 - Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. *Plant and Soil*, 166:247–257.
- Juste C., Chassin P., Gomez A., Linères M. et Mocquot B., 1995 – Les micro-polluants métalliques dans les boues résiduelles des stations d'épuration urbaines. ADEME Editions, Paris), 209 pp.
- Kabata-Pendias A. et Pendias H., 2001 – Trace elements in soils and plants, 3rd éd. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Kabata-Pendias A., 2004 – Soil-plant transfer of trace elements—an environmental issue. *Geoderma*, 122 : 143-149.
- Kämpf N., Scheinost A.C. et Schulze D.G., 2000 – Oxide minerals, Sumner M.E., ed., Handbook of soil science. CRC Press LLC. Section F, chapitre 3 : F125-F168.
- Keller. C, 2006 – Factors limiting efficiency of phytoextraction at multi-metal contaminated sites. In *Phytoremediation of metal-contaminated soils*, Morel J.L., Echevarria G. et Gonchavora N. (Eds.). Series IV: Earth and Environmental Sciences, Vol. 68, chapitre 8, pp 241-266.
- Keller C., Hammer D., Kayser A., Richner W., Brodbeck M et Sennhauser M., 2003 – Root development and heavy metal phytoextraction efficiency: comparison of different plant species in the field. *Plant and Soil*, 249 : 67-81.
- Keller C., Ludwig C., Davoli F. et Wochele J., 2005 – Thermal treatment of metal-enriched biomass produced from heavy metal phytoextraction. *Environmental Science and Technology*, 39 : 3359-3367.
- Kerkeb L. et Krämer U., 2003 – The role of free histidine in xylem loading of nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea*. *Plant Physiology*, 131 : 716-724.
- Kersten W.J., Brooks R.R., Reeves R.D. et Jaffré T., 1980 – Nature of nickel complexes in *Psychotria douarrei* and other nickel-accumulating plants. *Phytochemistry*, 19 : 1963-1965.

- Koningsberger D.C. et Prins R., 1988 – X-ray absorption: principles, applications, techniques of EXAFS, SEXAFS and XANES. Wiley, New York.
- Korcak R.F. et Fanning D.S., 1981 – Interaction between high levels of applied heavy metals and indigenous soil manganese. *Journal of Environmental Quality*, 10(1) : 69-72.
- Kosmulski M., Maczka E., Jartych E. et Rosenholm J.B., 2003 – Synthesis and characterization of goethite and goethite-hematite composite: experimental study and literature survey. *Advances in Colloid and Interface Science*, 103 : 57-76.
- Krämer U., Cotter-Howells J.D., Charnock J.M., Baker A.J.M. et Smith, J.A.C., 1996 – Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature*, 379 : 635-638.
- Krämer U., Smith R.D., Wenzel W.W., Raskin I. et Salt D.E., 1997a – The role of metal transport and tolerance in nickel hyperaccumulation by *Thlaspi goesingense* Hálácsy. *Plant Physiology*, 115 : 1641-1650.
- Krämer U., Grime G.W., Smith J.A.C., Hawes C.R. et Baker A.J.M., 1997b – Micro-PIXE as a technique for studying nickel localization in leaves of the hyperaccumulator plant *Alyssum lesbiacum*. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 130 : 346-350.
- Krämer U., Pickering I.J., Prince R.C. Raskin I. et Salt D.E., 2000 – Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. *Plant Physiology*, 122 : 1343-1353.
- Küpper H., Lombi E., Zhao F-J., Wieshammer G. et McGrath S.P., 2001 – Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*. *Journal of Experimental Botany*, 52 : 2291-2300.
- Lasat M.M., Baker A.J.M. et Kochian L.V., 1996 – Physiological characterization of root Zn^{2+} absorption and translocation to shoots in Zn hyperaccumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. *Plant Physiology*, 112 : 1715-1722.
- Lasat M.M., Baker J.M. et Kochian L.V., 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 physiology*, 118 : 875-883.
- Lasat M.M., Pence N.S., Garvin D.F., Ebbs S.D., and Kochian L.V., 2000 - Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany*, 51 : 71-79.
- Lee B.D., Sears S.K., Graham R.C., Amrhein C. et Vali H., 2003 – Secondary mineral genesis from chlorite and serpentinite in an ultramafic soil toposequence. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 67 : 1309-1317.
- Lee J., Reeves R.D., Brooks R.R. et Jaffré T., 1978 – The relation between nickel and citric acid in some nickel-accumulating plants. *Phytochemistry*, 17 : 1033-1035.

- Leeper G.W., 1978 – Managing the Heavy Metals on the Land. Dekker, New York.
- Leyval C. et Berthelin J., 1991 – Weathering of a mica by roots and rhizospheric microorganisms of pine. *Soil Science Society of America Journal*, 55 1009-1016.
- L'Huillier L., 1994 – Biodisponibilité du nickel dans les sols ferrallitique ferritique de Nouvelle Calédonie. Effets toxiques de Ni sur le développement et la physiologie du maïs. Thèse de Doctorat, Université Montpellier, 249 p.
- Lin F.-C. et Clemency C.V., 1981 – The dissolution kinetics of brucite, antigorite, talc, and phlogopite at room temperature and pressure. *American Mineralogist*, 66 : 801-806.
- Lombi E, Zhao F.J., McGrath S.P., Young S.D. et Sacchi G.A., 2001 – Physiological evidence for a high-affinity cadmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype. *New Phytologist*, 149 : 53-60.
- Malandrino M., Abollino O., Giacomino A., Aceto M. et Mentasti E., 2006 – Adsorption of heavy metals on vermiculite: Influence of pH and organic ligands. *Journal of colloid and Interface Science*, 299 : 537-546.
- Manceau A. et Calas G., 1985 – Heterogeneous distribution of nickel in hydrous silicates from New Caledonia ore deposits. *American Mineralogist*, 70 : 549-558.
- Manceau A., Calas G. et Decarreau A., 1985 – Nickel-bearing clay minerals : optical spectroscopic study of nickel crystal chemistry. *Clay Minerals*, 20 : 367-387.
- Manceau A., Gorshkov A.I. et Drits V.A., 1992. Structural chemistry of Mn, Fe, Co, and Ni in manganese hydrous oxides: part II. Information from EXAFS spectroscopy and electron and X-ray diffraction. *American Mineralogist*, 77 : 1144-1157.
- Manceau A., Llorca S. et Calas G., 1987 – Crystal chemistry of cobalt and nickel in lithiophorite and asbolane from New Caledonia. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 51 : 105-113.
- Manceau A., Schlegel M.L., Musso M., Sole V.A., Gauthier C., Petit P.E. et Trolard F., 2000 – Crystal chemistry of trace elements in natural and synthetic goethite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64 : 3643-3661.
- Marcussen H., Holm P.E. et Hansen H.C.B., 2003 – Nickel sorption to goethite and Namontmorillonite in the presence of citrate. *International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements, Conference Proceedings*, Suede, pp 64-65.
- Marschner H., 1986 – The soil-root interface (rhizosphere) in relation to mineral nutrition. In *Minerals nutrition of higher plants*. Academic Press, London, UK., chapitre 15, pp 447-476.
- Martell A.E. et Smith R.M., 1974 - Critical Stability Constants. Vol. 1: Amino Acids. Plenum Press, New York, 469 p.

- Martens S.N. et Boyd R.S., 2002 – The defensive role of Ni hyperaccumulation by plants: a field experiment. *American Journal of Botany*, 89(6) ; 998-1003.
- Massoura S.T., Echevarria G., Leclerc-Cessac E. et Morel J.L., 2004 – Response of excluder, indicator and hyperaccumulator plants to nickel availability in soils. *Australian Journal of Soil Research*, 42 : 933-938.
- Massoura S., 2004 – Spéciation et Phytodisponibilité du nickel dans les sols. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France, 165 p.
- Massoura S., Echevarria G., Becquer T., Ghanbaja J., Leclerc-Cessac E. et Morel J.L., 2006 – Nickel bearing phases and availability in natural and anthropogenic soils. *Geoderma*, 136 (1-2) : 28-37.
- Mench M., Morel J.L., Guckert A. et Guillet B., 1988 – Metal binding with root exudates of low molecular weight. *The Journal of Soil Science*, 39 : 521-527.
- McBride M.B., 2000 – Chemisorption and precipitation reactions. In *Handbook of soil science*, Sumner M.E. (Ed.). CRC Press LLC. Section B, chapitre 8, pp B265-B302.
- McGrath S.P., 1995 - Chromium and Nickel. In *Heavy metals in soils*, Alloway B.J. (Ed.), London (UK), Blackie Academic & Professional. 2nd Ed, pp. chapter 7, pp. 152-178.
- McGrath, S.P. 1998. Phytoextraction for soil remediation. In *Plants that accumulate heavy metals*, Brooks R.R. (Ed.). New York, USA : CAB International, p. 261–287.
- McNear Jr D.H., Peltier E., Everhart J., Chaney R.L., Sutton S., Newville M., Rivers M. et Sparks D.L., 2005a – Application of quantitative fluorescence and absorption-edge computed microtomography to image metal compartmentalization in *Alyssum murale*. *Environmental Science and Technology*, 39 (7) : 2210-2218.
- McNear Jr D.H., Tappero R. et Sparks D.L., 2005b – Shining light on metals in the environment. *Elements*, 1 : 211-216.
- Mellis E.V., Cruz M.C.P. da, Casagrande J.C., 2004 – Nickel adsorption by soils in relation to pH, organic matter, and iron oxides. *Scientia Agricola*, 61(2) : 190-195.
- Mesjasz-Przybylowicz J., Przybylowicz W.J., Prozesky V.M. et Pineda C.A., 1997 – Quantitative micro-PIXE comparison of elemental distribution in Ni-hyperaccumulating and non-accumulating genotypes of *Senecio coronatus*. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 130 : 368-373.
- Mesjasz-Przybylowicz J. et Przybylowicz W.J., 2001 – Phytophagous insects associated with the Ni-hyperaccumulating plant *Berkheya coddii* (Asteracea) in Mpumalanga, South Africa. *South African Journal of Science*, 97 : 596-598.
- Metz V., Amram K. et Ganor J., 2005 – Stoichiometry of smectite dissolution reaction. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69 : 1755-1772.

- Minguzzi C. et Vergano O., 1948 - Il contenuto di nichel nelle ceneri di *Alyssum bertolonii*. *Atti della Societa Toscana di Scienze Naturale*, **55** : 49-74.
- Mishra D. et Kar M., 1974 – Nickel in plant growth and metabolism. *The Botanical Revue*, 40 : 395-452.
- Misra S.G. et Pande P., 1974 – Effect of organic matter on availability of nickel. *Plant and Soil*, 40 : 679-684.
- Morel J.L., 1985 – Contribution à l'étude des transferts de métaux lourds dans le système sol-plante : le rôle des mucilages racinaires. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France, 176 p.
- Morel J.L., Mench M. et Guckert A., 1986 - Measurement of Pb^{2+} , Cu^{2+} and Cd^{2+} binding with mucilage exudates from maize (*Zea mays* L.) roots. *Biology and Fertility of Soils*, 2 :29-34.
- Morel J.L., 1997 - Bioavailability of trace elements to terrestrial plants. In *Soil Ecotoxicology*, J. Tarradellas, G.Bitton et D. Rossel (eds.). Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, pp 141-176.
- Mouta E.R., Casagrande J.C. et Soares M.R., 2005 - Ionic strength and pH50 effects on cadmium, copper, nickel and zinc adsorption in variable charge soils. *Geophysical Research Abstracts*, Vol. 7, 03803.
- Muller F., Besson G., Manceau A. et Drits V.-A., 1997 – Distribution of isomorphous cations within octahedral sheets in montmorillonite from Camp-Bertaux. *Phys. Chem. Minerals*, 24 : 159-166.
- Murr L.E. et Soto K.F., 2004 – TEM comparison of chrysotile (asbestos) nanotubes and carbon nanotubes. *Journal of Materials Science*, 39 : 4941-4947.
- Nicks L.J. et Chambers M.F., 1995 – Farming for metals. *Mining Environmental Management*, septembre : 15-18.
- Norini, M.-P., 2003 – Biodisponibilité et spéciation du nickel dans un sol brun développé sur serpentine. Mémoire de D.E.A. « Sciences Agronomiques ». Institut National Polytechnique de Lorraine, France, 28 p.
- Olson C.G., Thompson M.L. et Wilson M.A., 2000 – Phyllosilicates. In *Handbook of soil science*, Sumner M.E. (Ed.). CRC Press LLC. Section F, chapitre 2, F77-F123.
- Ouerdane L., Mari S., Czernic P., Lebrun M. et Łobiński R., 2006 – Speciation of non-covalent nickel species in plant tissue extracts by electrospray Q-TOFMS/MS after their isolation by 2D size exclusion-hydrophilic interaction LC (SEC-HILIC) monitored by ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21 : 676-683.
- Perronnet K., 2000 – Disponibilité dans le sol du cadmium et du zinc hyperaccumulés dans les organes de *Thlaspi caerulescens*. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France, 135 p.

- Persans M.W., Yan X., Patnoe J-M.M.L., Krämer U. et Salt D.E., 1999 – Molecular dissection of the role of histidine in nickel hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense* ((Hálácsy). *Plant Physiology*, 121 : 1117-1126.
- Persans M.W., Nieman K. et Salt D. 2001 – Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. *PNAS*, 98 (17) : 9995-10000.
- Pitteloud C., Powell D.H. et Fischer H.E., 2001 – The hydration structure of the Ni²⁺ ion intercalated in montmorillonite clay: a neutron diffraction with isotopic substitution study. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 3 : 5567-5574.
- Psaras G.K., Constantinidis T.H., Cotsopoulos B. et 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.
- Psaras G.K. et Manetas Y., 2001 – Nickel localization in seeds of the metal hyperaccumulator *Thlaspi pindicum* Hausskn. *Annals of Botany*, 88 : 513-516.
- Puschenreiter M., Wiczorek S., Horak O. et Wenzel W.W., 2003 – Chemical changes in the rhizosphere of metal hyperaccumulator and excluder *Thlaspi* species. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 166 : 579-584.
- Przybylowicz W.J., Pineda C.A. Prozesky V.M. et Mesjasz-Przybylowicz J., 1995 – Investigation of Ni hyperaccumulation by true elemental imaging. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 104 : 176-181.
- Qureshi S., Richards B.K., Steenhuis T.S., McBride M.B., Baveye P. et Dousset S. (2004) - Microbial acidification and pH effects on trace element release from sewage sludge. *Environmental Pollution*, 132(1): 61-71.
- Raskin I., Smith R.D. et Salt D.E., 1997 – Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology*, 8 : 221-226.
- Reeves R.D., 2003 – Tropical hyperaccumulators of metals and their potential for phytoextraction. *Plant and Soil*, 249 : 57-65.
- Reeves R.D., Brooks R.R. et Press J.R., 1980 - Nickel accumulation by species of *Peltaria* Jacq. (*Cruciferae*). *Taxon*, 29 : 629-633.
- Reeves R.D., Schwartz C., Morel J.L. et Edmondson J., 2001 - Distribution and metal-accumulating behavior of *Thlaspi caerulescens* and associated metallophytes in France. *International Journal of Phytoremediation*, 3 (2) : 145-172
- Reichard P.U., Kraemer S.M., Frazier S.W. et Kretschmar R., 2005 – **Goethite** dissolution in the presence of phytosiderophores: rates, mechanisms, and the synergistic effect of oxalate. *Plant and Soil*, 276 : 115-132.

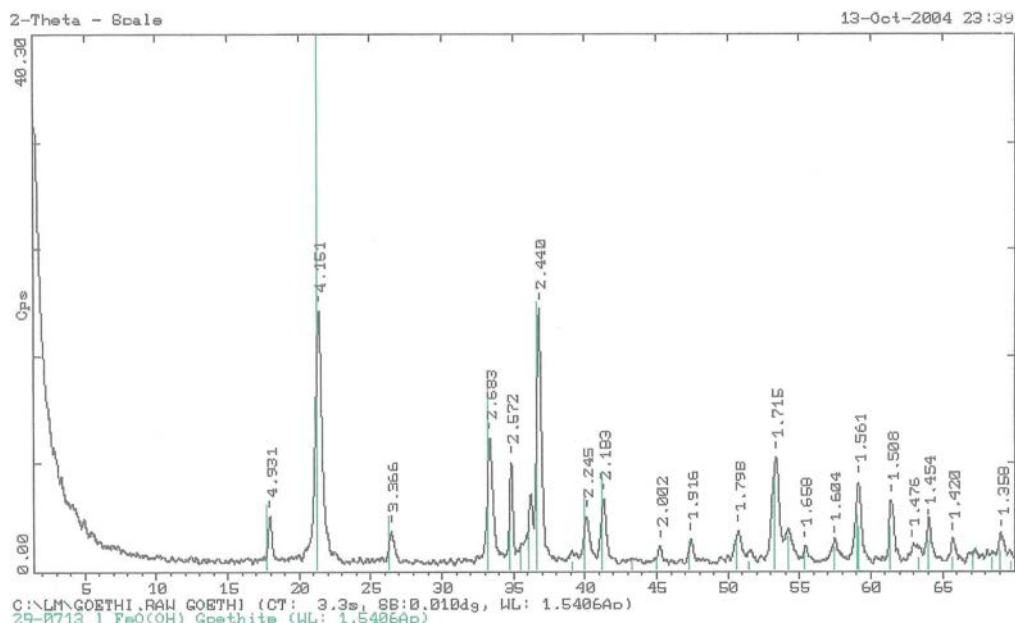
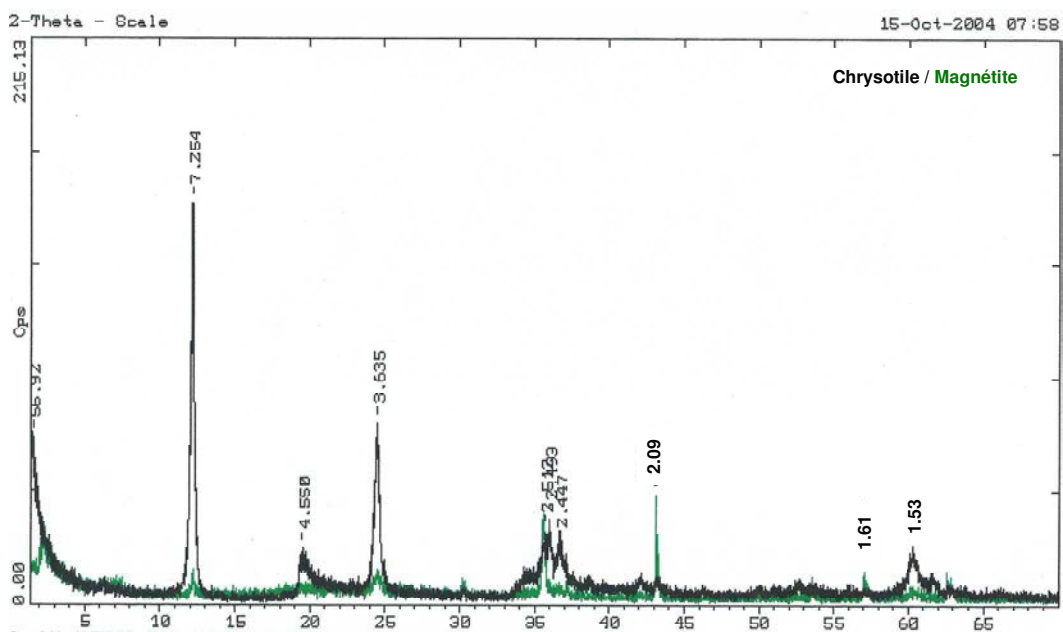
- Robinson B.H., Chiarucci A., Brooks R.R., Petit D., Kirkman J.H., Gregg P.E.H. et De Dominicis V., 1997a – The nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii* as a potential agent for phytoremediation and phytomining of nickel. *Journal of Geochemical Exploration*, 59 : 75-86.
- Robinson B.H., Brooks R.R., Howes A.W., Kirkman J.H. et Gregg P.E.H., 1997b – The potential of the high-biomass nickel hyperaccumulator *Berkheya coddii* for phytoremediation and phytomining. *Journal of Geochemical Exploration*, 60 : 115-226.
- Roosens N., Verbruggen N., Meerts P., Ximénez-Embùn P. et Smith J.A.C., 2003 – Natural Variation in cadmium tolerance and its relationship to metal hyperaccumulation for seven populations of *Thlaspi caerulescens* from western Europe. *Plant, Cell and Environment*, 26 : 1657-1672.
- Salt D.E., Blaylock M., Kumar N.P.B.A., Duskenkov V., Ensley B.D., Chet I. et Raskin I., 1995 – Phytoremediation : A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Bio/Technology*, 13 : 468-474.
- Salt D.E., Prince R.C., Baker A.J.M., Raskin I. et Pickering I.J., 1999 – Zinc ligands in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy. *Environmental Science and Technology*, 33 : 713-717.
- Salt D.E., Kato N., Krämer U., Smith R.D. et Raskin I., 2000 – The role of root exudates in nickel hyperaccumulation and tolerance in accumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*, CRC Press LLC, pp 189-200.
- Salt D.E., Prince R.C. et Pickering I.J., 2002 – Chemical speciation of accumulated metals in plants: evidence from X-ray absorption spectroscopy. *Microchemical Journal*, 71 : 255-259.
- Santamarina J.C., Klein K.A., Wang Y.H. et Prencke E., 2002 – Specific surface: determination and relevance. *Canadian Geotechnical Journal*, 39 : 233-241.
- Sarret G., Saumitou-Laprade P., Bert V., Proux O., Hazemann J.-L., Traverse A., Marcus M.A. et Manceau A., 2002 - Forms of zinc accumulated in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiology*, 130 : 1815–1826.
- Scheinost A.C., Ford R.G. et Sparks D.L., 1999 – The role of Al in the formation of secondary Ni precipitates on pyrophyllite, gibbsite, talc, and amorphous silica: A DRS study. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63 : 3193-3203.
- Schaumlöffel D., Ouerdane L., Bouyssiere B. et Lobiński R., 2003 – Speciation analysis of nickel in the latex of a hyperaccumulating tree *Sebertia acuminata* by HPLC and CZE with ICP MS and electrospray MS-MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18 : 120-127.

- Scheckel K.G., 2000 – Kinetics and mechanisms of the formation and dissolution of nickel(II) surface precipitates on clay minerals and metal oxides using macroscopic, spectroscopic, microscopic, and thermogravimetric techniques. Ph.D.diss.Univ. of Delaware, New-ark, DE.
- Scheckel K.G. et Sparks L., 2001 – Temperature effects on nickel sorption kinetics at the mineral-water interface. *Soil Science Society of America Journal*, 65 : 719-728.
- Schmidt J.A. et A.W. Andren, 1980 - The atmospheric chemistry of nickel. In *Nickel in the Environment*, Nriagu J.O. (Ed.). John Wiley and Sons, New York, pp 93-136.
- Schmitt-Sirguey C., 2004 – Dynamique du Cd disponible du sol sous l'influence de l'hyperaccumulateur *Thlaspi caerulescens*. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France, 137 p.
- Schwartz C., 1997 – Phytoextraction des métaux des sols pollués par la plante hyperaccumulatrice *Thlaspi caerulescens*. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France, 175 p.
- Schwartz C., Morel J.L., Saumier S., Withing S.N. et Baker A.J.M., 1999 - Root architecture of the zinc-hyperaccumulator plant *Thlaspi caerulescens* as affected by metal origin, content and localization in soil. *Plant and Soil*, 208 : 103-115.
- Schwartz C., Echevarria G. et Morel J.L., 2003 – Phytoextraction of cadmium with *Thlaspi caerulescens*. *Plant and Soil*, 249 : 27-35.
- Schwertmann U., 1984 – The influence of aluminium on iron oxides: IX. Dissolution of Al-goethites in 6 M HCl. *Clay Minerals*, 19 : 9-19.
- Schwertmann U., 1991 – Solubility and dissolution of iron oxides. *Plant and Soil*, 130 : 1-25.
- Schwertmann U. et Carlson L., 1994 - Aluminum influence on iron oxides. XVII: Unit-cell parameters and aluminum substitution of natural goethites. *Soil Science Society of America Journal*, 58 : 256-261.
- Schwertmann U., Gasser U. et Sticher H. 1989 – Chromium-for-iron substitution in synthetic goethites. *Geochimica et Cosmochimica Acta.*, 53 : 1293-1297.
- Shallari S., 1997 – Disponibilité du nickel du sol pour l'hyperaccumulateur *Alyssum murale*. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France, 105 p.
- Shallari S., Schwartz C., Hasko A. et Morel J.L., 1998 - Heavy metals in soils and plants of serpentine and industrial sites of Albania. *Science of the Total Environment*, 209 : 133-142.
- Sheppard C.W., 1962 – Basic principles of the tracer method. John Wiley and Sons (Eds.), New York, 282 p.

- Sirguey C., Massoura T.S., Schwartz C., Echevarria G., Morel J.L., 2004.- Phytoextraction and bioavailability of Cd and Ni in soils. In *Ultramafic rocks: their soils, vegetation and fauna*, Boyd R.S., Baker A.J.M., Proctor J. (Eds). Proceedings of the Fourth International Conference on Serpentine Ecology, pp 305-310.
- Sparks D.L., 1995 - Kinetics of metal sorption reactions. In *Metal speciation and contamination of soil*, Allen H.E., Huang C.P., Bailey G.W. et Bowers A.R. (Eds.). Lewis Publishers, Chelsea, Michigan, pp. 35-58.
- Sposito G., 1986 - Distinguishing adsorption from surface precipitation. In *Geochemical Processes at Mineral Surfaces*, Davis J.A., Hayes K.F. (Eds.). ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 217-229.
- Sposito G., 1982 - On the use of the Langmuir equation in the interpretation of "adsorption" phenomena: II. The "two surface" Langmuir equation. *Soil Science Society of America Journal*, 46 : 1147-1152.
- Sposito G., 1989 – The chemistry of soils. Oxford University Press, New York.
- Sposito G., Skipper N.T., Sutton R., Park S.-H., Soper A.K et Greathouse J.A., 1999 – Surface geochemistry of the clay minerals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 3358-3364.
- Sposito G., 2000 – Ion exchange phenomena. In *Handbook of soil science*, Sumner M.E. (Ed.). CRC Press LLC. Section B, chapitre 7, B241-B264.
- Strathmann T.J. et Myneni S.C.B., 2004 – Speciation of aqueous Ni(II)-carboxylate and Ni(II)-fulvic acid solutions: Combined ATR-FTIR and XAFS analysis. *Geochimica et Cosmochimica Acta.*, 68(17) : 3441-3458.
- Stumm W., 1992 - Chemistry of the Solid-Water Interface. Wiley & Sons, New York, 428 p.
- Stumm W., 1997 – Reactivity at the mineral-water interface: dissolution and inhibition. *Colloids and surfaces A*, 120 : 143-166.
- Teo B.K., 1986 – EXAFS : basic principles and data analysis. Springer, Berlin.
- Touray J.-C., 1980 – La dissolution du chrysotile. In *La dissolution des minéraux*. Editions Masson, Paris, chapitre 8, pp 85-95.
- Uren N.C., 1992 – Forms, reactions, and availability of nickel in soils. *Advances in Agronomy*, 48 : 141-203.
- Ueno D., Ma J.F., Iwashita T., Zhao F.-J. et McGrath S.P., 2005 – Identification of the form of Cd in the leaves of superior Cd-accumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens* using ¹¹³Cd-NMR. *Planta*, 221 : 928-936.

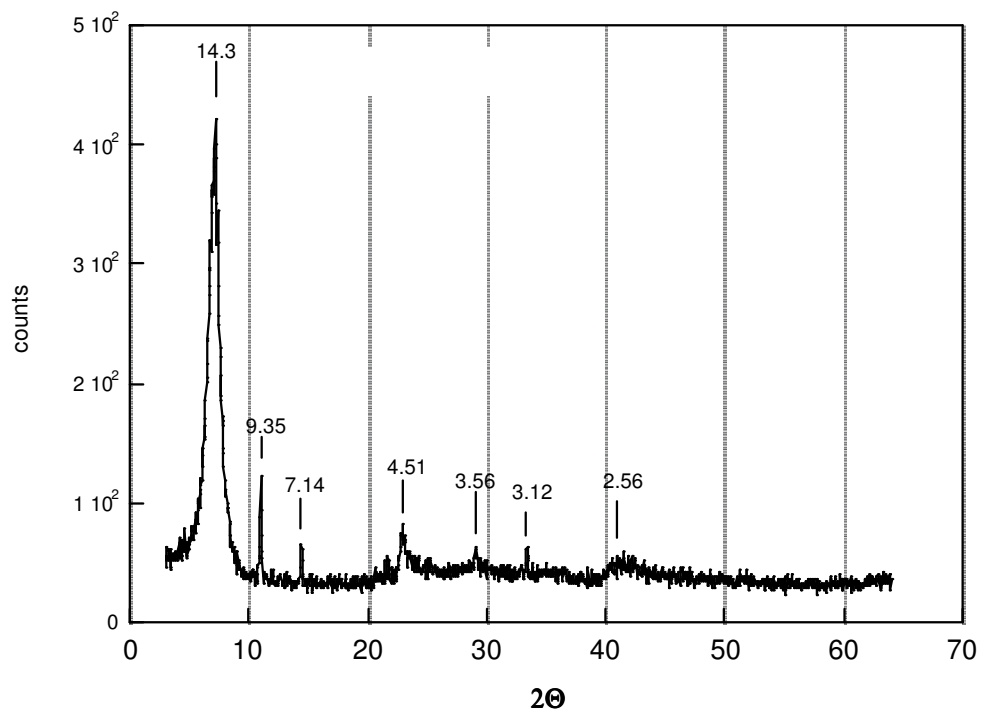
- Vacchina V., Mari S., Czernic P., Marquès L., Pianelli K., Schaumlöffel D., Lebrun M. et Łobiński R., 2003 – Speciation of nickel in a hyperaccumulating plant by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray MS/MS assisted by cloning using yeast complementation. *Anal.Chem.*, 75 : 2740-2745.
- Voskresenskaya N.T. et Coliazo H., 1983 – Kinetics and mechanism of dissolution of some layer silicates in a weathering crust. Translated from *Geokhimiya*, 1 : 43-53.
- Wenzel W.W, Bunkowski M., Puschenreiter M. et Horak O., 2003 – Rhizosphere characteristics of indigenously growing nickel hyperaccumulator and excluder plants on serpentine soil. *Environmental Pollution*, 123 : 131-138.
- Whiting S.N., Leake J.R., Baker A.J.M. et McGrath S.P., 1997 - Changes in phytoavailability of zinc to plants sharing a rhizosphere with the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* J. and C. Presl. In *Extended Abstracts of the 4th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements*, University of California, Berkeley, USA, 23-26 Juin, pp 469-470.
- Whiting S.N., De Souza M.P. et Terry N., 2001 – Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. *Environmental Science & Technology*, 35(15) : 3144-3150.
- Whiting S.N., Neumann P.M. et 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.
- Wicks F.J. et O'Hanley D.S., 1988 – Serpentine minerals: structure and petrology. In *Hydrous phyllosilicates (exclusive of micas)*, Bailey S.W., (Ed.). Mineralogy society of American, vol 19, chapitre 5, pp 91-167.
- Wittaker E.J.W. et Wicks F.J., 1970 – Chemical differences among the serpentine “polymorphs”. *American Mineralogist*, 55 : 1025-1047.
- Yin Y., Impellitteri C.A., You S.-J. et Allen H.E., 2002 – The importance of organic matter distribution and extract soil: solution ratio on the desorption of heavy metals from soils. *The Science of the total environment* : 287 : 107-119.
- Zbytniewski R., Kowalkowski T. et Buszewski B., 2003 – Application of mathematical and chemometrical approaches in the study of heavy metal ions – soil interactions. In *New Horizons*, chapitre 23.
- Zhou Z.-H., Ye J.-J., Deng Y.-F., Wang G., Gao J.-X. et Wan H.L., 2002 – Monomeric and polymeric nickel complexes of malate: X-ray crystal structure of polymeric homochiral S-malato nickel (II), $[-Ni(S-Hmal)(H_2O)_2]_n \cdot nH_2O$. *Polyhedron*, 21(7) : 787-790.

Annexes

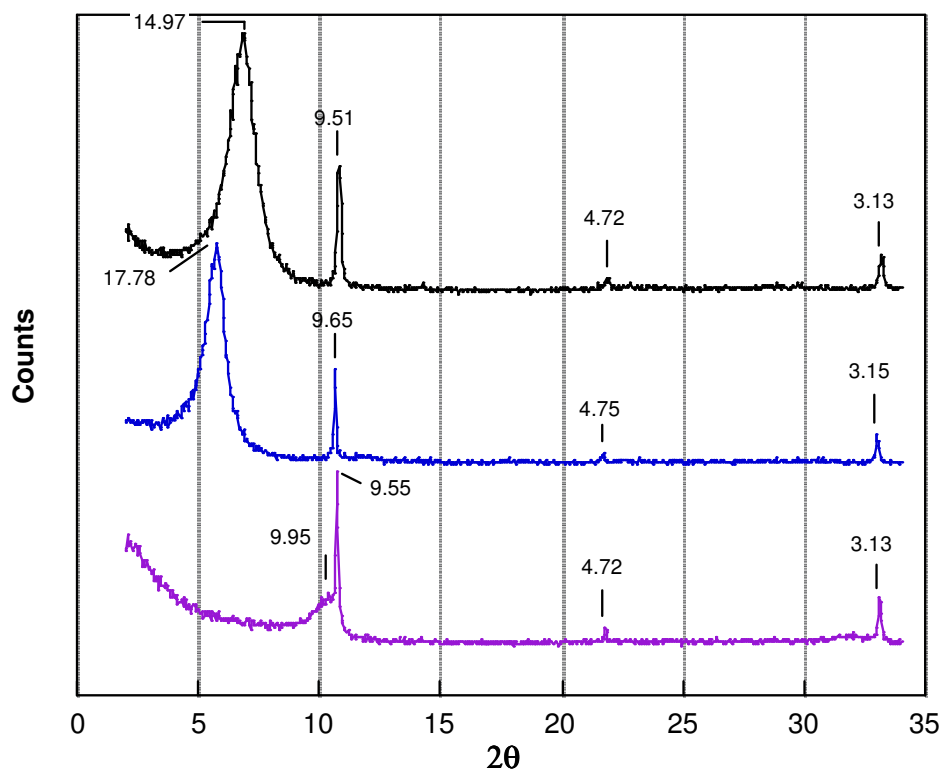
Annexe 1 :**Diffractogrammes X des échantillons minéraux bruts
(Chapitre II)****Goethite de synthèse****Minerai à chrysotile**

Minerai à Smectite

Diffractogramme sur poudre



Diffractogramme sur lame orientée



Annexe 2 :
Rendement des extraction du Ni à l'eau régale
par rapport aux extractions du Ni total à l'acide fluorhydrique (HF)
(Chapitre II)

Minéraux*	Modalités	Ni_{REG}	Ni_{total} (HF)	Ni_{REG}/Ni_{total}
		mg kg ⁻¹		%
Chrysotile	<i>Sans végétation</i>	445	544	82
	<i>L. emarginata</i>	461	566	81
Smectite	<i>Sans végétation</i>	2351	2840	83
	<i>L. emarginata</i>	2395	2763	87
Goethite	<i>Sans végétation</i>	2823	3653	77
	<i>L. emarginata</i>	3032	3803	80
Terre **	Modalité			
	<i>Avant culture</i>	17	21	81

* Mesures de Ni total effectuées au Laboratoire Services d'Analyses des Roches et des Minéraux (CRPG-CNRS, Nancy)

** Mesures de Ni total effectuées au Laboratoire d'Analyses de Sols (INRA, Arras)

Annexe 3 :**Espèces végétales collectées sur le site ultramafique de Bergenbach (Norini, 2003)****(Chapitre III)**

Espèce	Famille	Nom commun
<i>Meum athamanticum</i>	<i>Apiaceae</i>	Fausse athamanthe
<i>Achillea millefolium</i>	<i>Asteraceae</i>	Achillée millefeuille
<i>Leucanthemum vulgare</i>	<i>Asteraceae</i>	Leucanthème vulgaire
<i>Thlaspi caerulescens</i>	<i>Brassicaceae</i>	Tabouret calaminaire
<i>Campanula rotundifolia</i>	<i>Campanulaceae</i>	Campanule à feuille ronde
<i>Silene vulgaris</i>	<i>Caryophyllaceae</i>	Silène renflée
<i>Helianthemum mummularium</i>	<i>Cistaceae</i>	Hélianthème nummulaire
<i>Cupressus sempervirens</i>	<i>Cupressaceae</i>	Cyprès toujours vert
<i>Succisa pratensis</i>	<i>Dipsacaceae</i>	Succise des prés
<i>Calluna vulgaris</i>	<i>Ericaceae</i>	Callune
<i>Vaccinium myrtillus</i>	<i>Ericaceae</i>	Myrtille
<i>Euphorbia cyparissias</i>	<i>Euphorbiaceae</i>	Euphorbe petit cyprès
<i>Chamaespartium sagittale</i>	<i>Fabaceae</i>	Genêt ailé
<i>Lathyrus vernus</i>	<i>Fabaceae</i>	Gesse printanière
<i>Lotus corniculatus</i>	<i>Fabaceae</i>	Lotier corniculé
<i>Trifolium pratense</i>	<i>Fabaceae</i>	Trèfle des près
<i>Vicia sepium</i>	<i>Fabaceae</i>	Vesce des haies
<i>Satureja acinos</i>	<i>Lamiaceae</i>	Sariette acinos
<i>Stachys sp.</i>	<i>Lamiaceae</i>	Epiaire
<i>Teucrium scorodonia</i>	<i>Lamiaceae</i>	Germandrée scorodoine
<i>Briza media</i>	<i>Poaceae</i>	Amourette
<i>Deschampsia flexuosa</i>	<i>Poaceae</i>	Canche flexueuse
<i>Polygala amarella</i>	<i>Polygalaceae</i>	Polygala amer
<i>Rumex acetosa</i>	<i>Polygonaceae</i>	Oseille des près
<i>Polystricum setiferum</i>	<i>Polypodiaceae</i>	Polystric à dents sétacées
<i>Pteridium aquilinum</i>	<i>Polypodiaceae</i>	Fougère aigle
<i>Ranunculus bulbosus</i>	<i>Ranunculaceae</i>	Renoncule bulbeuse
<i>Potentilla sp.</i>	<i>Rosaceae</i>	Potentille
<i>Potentilla erecta</i>	<i>Rosaceae</i>	Potentille dressée
<i>Galium verum</i>	<i>Rubiaceae</i>	Gaillet
<i>Rhinantus alectorolophus</i>	<i>Scrophulariaceae</i>	Rhinanthe velu

Annexe 4 :
Extractions à l'oxalate (méthode TAMM)
et au réactif Citrate-Dithionite-Bicarbonate, CBD (méthode Mehra Jackson)
(Chapitre III)

Les extractions à l'oxalate (méthode TAMM) et au réactif Citrate-Dithionite-Bicarbonate, CBD (méthode Mehra Jackson) consistent à mobiliser le fer qui se trouve sous forme amorphe ou cristallisée mais non inclus dans un réseau silicaté (minéraux primaires ou argiles). L'ensemble du fer mobilisé par ces extractions est appelé « fer libre ».

L'extraction à l'oxalate permet de dissoudre les (co)précipités frais de Fe et d'Al (oxydes amorphes). Ainsi, l'extraction permet la mobilisation de 96 % du fer présent dans les oxydes amorphes; et moins de 1 % du Fe présent dans des oxydes cristallisés (goethite, gibbsite) (Duchauffour et Souchier, 1966). Cette méthode permet d'estimer la fraction de Fe qui se trouve sous formes ionique, complexée et amorphe dans les sols.

L'extraction au CBD permet de solubiliser, en plus de la fraction extraite à l'oxalate, la totalité du Fe présent sous forme d'oxydes et d'oxyhydroxydes (hématite, goethite, lépidocrocite (Jeanroy, 1983) ; et moins de 5 % du Fe présent dans les minéraux silicatés ferrifères (biotite, glauconite).

La différence entre la quantité de fer total et la quantité de fer libre permet d'estimer la quantité de Fe présent dans le réseau des minéraux silicatés.

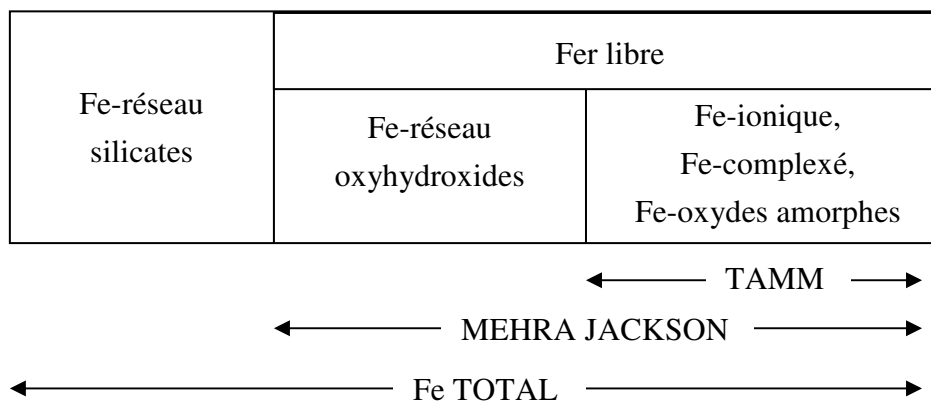
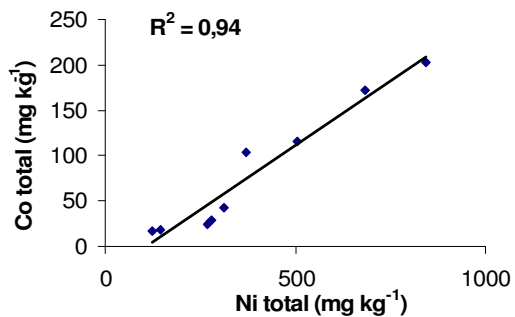
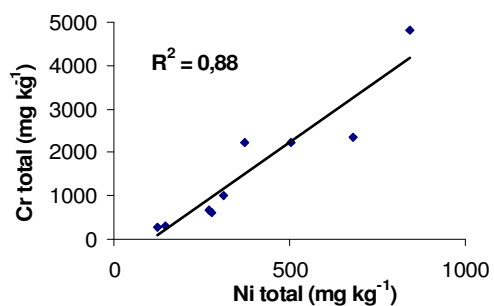
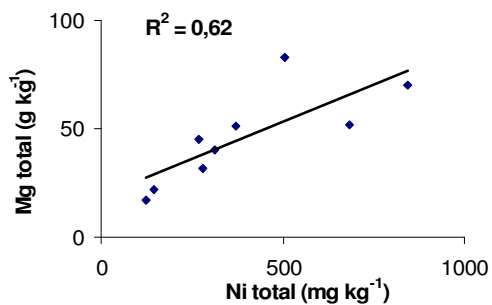
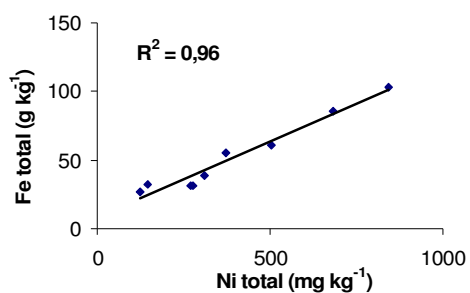


Figure A3.1: Extraction du fer contenu dans les différentes phases minérales.

Annexe 5 :**Relation entre la teneur en Ni total et les teneurs totales en Fe, Mg, Co et Cr
Mesurées dans les horizons de surface des sols du site de Bergenbach
(Chapitre III)**

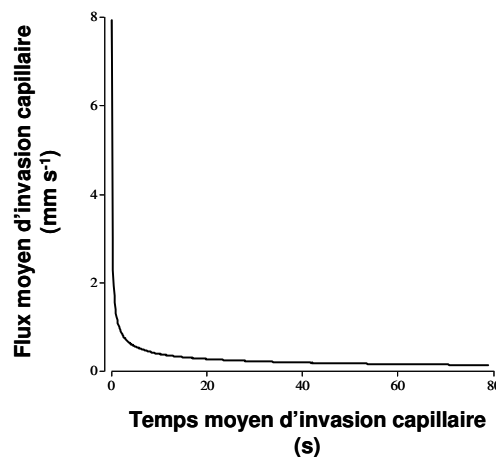
Annexe 6 :**Mesures de remontée capillaire d'eau dans la terre de remplissage des rhizotrons****(Chapitre V)**

Les mesures de remontée capillaire d'eau déminéralisée ont été effectuées sur la terre de remplissage à l'aide d'un dispositif mis au point au Laboratoire Sols et Environnement par F. Bartoli. La terre de remplissage est caractérisée par une porosité essentiellement de type capillaire (Tableau A5.1). Elle présente une sorptivité élevée qui se traduit par une invasion capillaire très rapide (lorsque la terre est initialement sèche et que la pression finale imposée est de 0 kPa). Ceci est attribuable à : (i) une excellente mouillabilité du fait du très faible taux de matières organiques de T ($M.O. = 17,5 \%$) ; (ii) des diamètres d'entrée de pores très probablement très petits (5 à 50 μm) ainsi qu'une remarquable connectivité des pores intra-agrégats (Bartoli *et al.*, 1999) ; (iii) une remarquable connectivité entre les agrégats du sol, du fait de leur finesse (diamètre équivalent variant de 0,2 à 2 mm, avec prédominance d'agrégats fins) induisant une macroporosité inter-agrégats très réduite.

Tableau A5.1 : Porosité et sorptivité du substrat de culture.

Porosité totale %	Macroporosité %	Porosité capillaire %	Sorptivité $\text{mm s}^{-0,5}$
55	16	84	$2,51 \pm 0,21$

Le flux d'invasion capillaire est extrêmement rapide pendant le premier dixième de seconde (près de 8 mm s^{-1}), puis décroît de façon non linéaire en fonction du temps (Figure A5.1). Le flux capillaire moyen de l'eau dans le substrat de culture est de $0,284 \pm 0,015 \text{ mm s}^{-1}$.

**Figure A5.1**: Courbe moyenne de l'évolution du flux d'invasion capillaire en fonction du temps.

Annexe 7 :

**Comparaison des valeurs du Ni extractible au DTPA-TEA pour le traitement témoin
sans apport de phases minérales nickélicifères.**

(Chapitre V)

		Ni_{DTPA-TEA} (mg kg⁻¹)			
		Sans végétation		<i>L. emarginata</i>	
Essai 1	zone A	1,92	(0,19)	1,56	(0,28)
	zone C	1,15	(0,11)	0,64	(0,14)
	Mélange des zones B et D	1,10	(0,11)	0,73	(0,12)
	Sachets	1,13	(0,02)	0,76	(0,13)
Moyenne sur les zones C, B, D et S		1,13	(0,08)	0,71	(0,13)
Essai 2	zone A	1,76	(0,26)	1,38	(0,42)
	Mélange des zones C, B, D et S	1,25	(0,10)	0,89	(0,15)

(n) : écart-type, 4 répétitions.

Essai 1 : Mesures effectuées sur les échantillons de terre récoltée dans les zones B, C et D et sur la terre contenue dans les sachets (S) ;

Essai 2 : Mesures effectuées sur le mélange homogène des échantillons de terre récoltée dans les zones B, C, D et S.

Annexe 8 :**Validité des régressions linéaires effectuées sur les droites de corrélation**

$$\text{NiH}_2\text{O} = f(\text{NiDTPA-TEA})$$

(Chapitre V)

Traitements	Zones de prélèvement		Coefficients	Erreur-type	Statistique t	Probabilité	Limite inférieure	Limite supérieure
<i>Seuil de confiance = 95%</i>								
Terre	Zone A	Constante	-2,39	2,39	-1,00	0,33	-7,41	2,62
		Variable X	15,54	1,78	8,75	0,00	11,81	19,27
	Zones B, C, D	Constante	-0,40	0,65	-0,61	0,55	-1,76	0,97
		Variable X	5,57	0,59	9,44	0,00	4,33	6,81
Terre+Chrysotile	Zone A	Constante	-6,49	2,23	-2,91	0,01	-11,20	-1,79
		Variable X	14,28	1,47	9,72	0,00	11,18	17,38
	Zones B, C, D	Constante	2,29	0,41	5,64	0,00	1,48	3,11
		Variable X	3,32	0,39	8,42	0,00	2,53	4,11
Terre+Smectite	Zone A	Constante	-1,78	2,85	-0,62	0,54	-7,76	4,20
		Variable X	11,49	1,47	7,84	0,00	8,41	14,57
	Zones B, C, D	Constante	2,26	0,26	8,58	0,00	1,73	2,79
		Variable X	3,73	0,08	47,80	0,00	3,57	3,88
Terre+Goethite	Zone A	Constante	5,03	3,48	1,45	0,17	-2,28	12,35
		Variable X	8,10	2,01	4,04	0,00	3,88	12,31
	Zones B, C, D	Constante	1,89	0,38	5,01	0,00	1,14	2,65
		Variable X	3,40	0,13	25,91	0,00	3,14	3,66

- **Variable X** = Ni extractible au DTPA-TEA (mg kg^{-1})
- **Variable Y** = Ni hydrosoluble ($\mu\text{g l}^{-1}$)

Annexe 9 :**Coefficient de distribution Kd du Ni dans la terre de remplissage des rhizotrons
(Chapitre V)**

Les valeurs de Ni_{H2O} et de $Ni_{DTPA-TEA}$, nous ont permis de calculer les valeurs du coefficient de distribution du Ni entre la solution et la phase solide (Ni adsorbé) au sein du système d'après la formule suivante :

$$Kd = \frac{Ni_{DTPA-TEA} - Ni_{H2O}}{Ni_{H2O}}$$

Avec : K_d en $l\ kg^{-1}$; $Ni_{DTPA-TEA}$ en $mg\ kg^{-1}$; Ni_{H2O} , la quantité de Ni en solution rapportée à un kg de terre, en $mg\ kg^{-1}$; et Ni_{H2O} en $mg\ l^{-1}$.

Les calculs de K_d ont été effectués pour la zone A et pour les zones B, C et D réunies (Tableau A8.1).

Tableau A8.1 : Valeurs du coefficient de distribution du Ni, K_d , entre la solution et la phase solide du substrat.

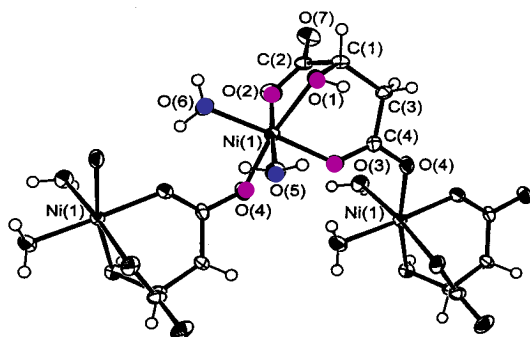
	K_d ($l\ kg^{-1}$)			
	Zone A		Zones B, C, D	
Terre	56	(12)	174	(19)
Terre+Chrysotile	90	(23)	159	(34)
Terre+Smectite	81	(19)	172	(41)
Terre+Goethite	73	(22)	207	(43)

Les valeurs de K_d sont en moyenne de $75\ l\ kg^{-1}$ pour la zone A, et de $178\ l\ kg^{-1}$ pour les zones B, C, et D, tous traitements confondus.

Annexe 10 :**Représentation des complexes Ni-citrate et Ni-malate****(Chapitre VI)**

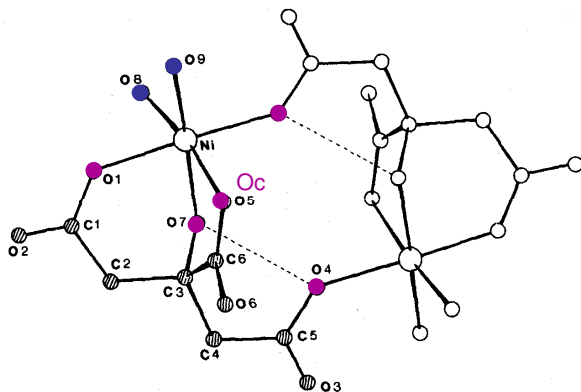
Dans les complexes Ni-citrate et Ni-malate, le Ni est lié à 6 atomes d'oxygène, provenant des fonctions hydroxyle et carboxyles des carboxylates (Ni-O_c) et des molécules d'eau (Ni-O_w).

Complexe Ni(II)-malate



Ni - O_c : 2,0219 ; 2,0381 ; 2,0470 ; 2,0830 Å
 Ni - O_w : 2,0470 & 2,0570 Å

Complexe Ni(II)-citrate



Ni - O_c : 2,0119 ; 2,0423 ; 2,0467 ; 2,0853 Å
 Ni - O_w : 2,0389 & 2,0840 Å

Figure A9.1 : Représentation des complexes Ni-citrate (Baker *et al.*, 1983) et Ni-malate (Zhou *et al.*, 2002)

Annexe 11 :
Distribution du Ni au niveau de l'épiderme des feuilles d'*Al. murale*
(Chapitre VI)

Matériel et méthode

Une étude préliminaire a été réalisée en MEB sur des individus (prélevés *in situ*) issus des mêmes populations que celles étudiées dans nos travaux. Les échantillons végétaux d'*Al. murale* proviennent d'individus collectés directement sur le site ultramafique de Pojskë en Albanie et desquels sont issues les graines que nous avons utilisées lors de nos différentes expérimentations. Des morceaux de feuilles (séchés à l'air libre) ont été déposés sur un support en carbone, recouverts d'un film fin de carbone et analysés en MEB. La profondeur de la mesure est environ de 5 μm . Les pourcentages de Ni ne tiennent pas compte de l'élément Carbone.

Résultats

L'imagerie 3D en photons X, nous a permis de mettre en évidence la distribution globale du Ni au niveau de l'épiderme inférieur des feuilles de *Al. murale* (Figure A10.1). Le Ni est présent dans l'ensemble de l'épiderme inférieur, mais est fortement concentré au niveau de certains trichomes. La distribution du Ca correspond parfaitement aux zones où sont situées les trichomes. Les trichomes sont pauvres en C et sont essentiellement constitués de Ca. Néanmoins, le Ca est moins concentré dans les trichomes concentrés en Ni.

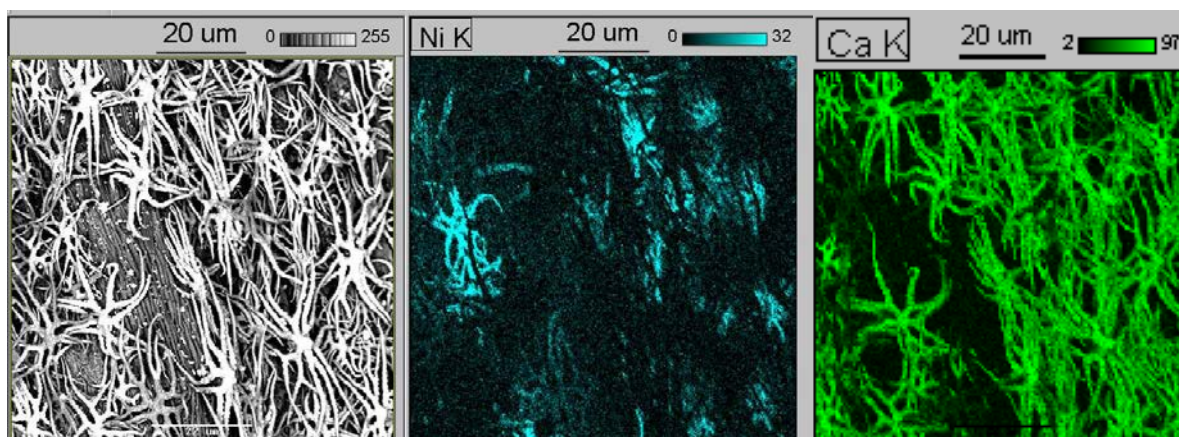


Figure A10.1 : Distribution du Ni et du Ca au niveau de l'épiderme inférieur d'un échantillon de feuille d'*Al. murale*.

A la différence des deux autres espèces hyperaccumulatrices étudiées, le Ni ne semble pas être préférentiellement localisé au niveau de l'épiderme inférieur des feuilles d'*Al. murale*. En effet, le pourcentage de Ni mesuré sur la globalité de l'épiderme inférieur est similaire à celui mesuré au niveau de l'épiderme supérieur (Figures A10.2 et A10.3). Néanmoins, la répartition du métal au sein des différentes cellules épidermiques semble varier entre épiderme inférieur et supérieur.

Les trichomes recouvrent la quasi-totalité de l'épiderme inférieur des feuilles d'*Al. murale*, et aux autres cellules de l'épiderme (Figure A10.2). Les trichomes à petit pédicule (qui apparaissent en clair en imagerie en électrons rétrodiffusés) sont fortement concentrés en Ni par rapport aux trichomes à grand pédicule et aux autres cellules de l'épiderme (en sombre). En revanche, les trichomes situés au niveau de l'épiderme supérieur sont nettement moins nombreux et semblent être dépourvus en Ni.

Les trichomes situés au niveau de l'épiderme supérieur (Figure A10.3) sont nettement moins nombreux et semblent tous avoir la même composition chimique (en clair en imagerie en électrons rétrodiffusés). Ceux-ci sont quasiment dépourvus en Ni. Le Ni présent au niveau de l'épiderme supérieur serait donc principalement localisé au niveau des autres cellules de l'épiderme.

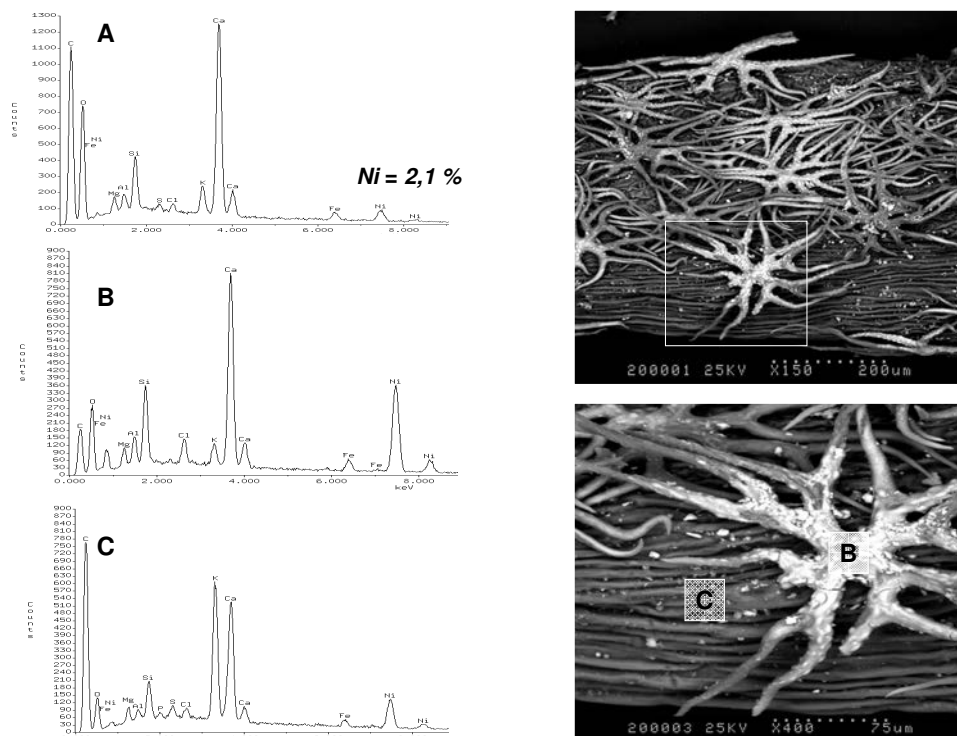


Figure A10.2 : Images 3D en électrons rétrodiffusés (à droite) de l'épiderme inférieur d'une feuille d'*Al. murale*. Spectres X : (A) Epiderme global ; (B) trichomes ; C : cellules épidermiques.

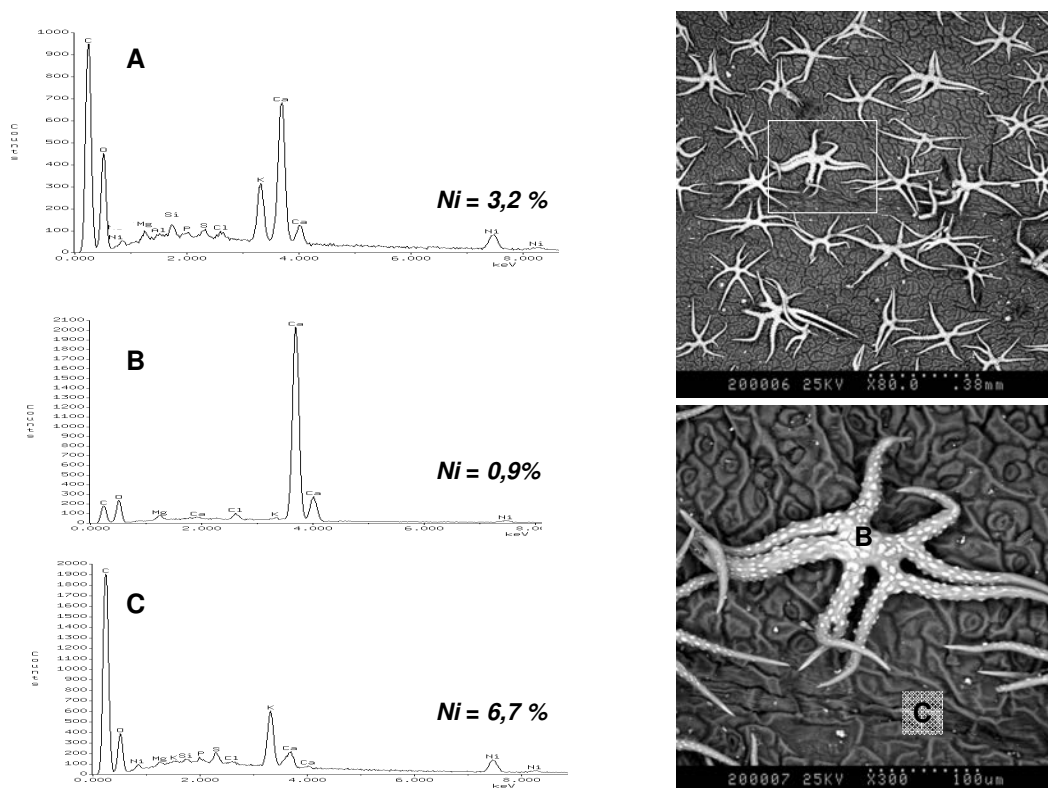


Figure A10.3 : Images 3D en électrons rétrodiffusés (à droite) de l'épiderme supérieur d'une feuille d'*Al. murale*. Spectres X : (A) Epiderme global ; (B) trichomes ; C : cellules épidermiques.

Listes des Figures

Chapitre I

- Figure 1.** Altération des péridotites et des serpentinites sous climats tropical et semi-aride 8
- Figure 2.** Structure élémentaire du chrysotile. 17
- Figure 3.** Sorption du Ni sur une goethite de synthèse en fonction du pH, en présence et en absence de citrate. 20
- Figure 4.** Localisation du Ni dans les racines de l'hyperaccumulateur *Alyssum bertolonii*. 29
- Figure 5.** Relation entre la teneur en histidine et la teneur en Ni dans le xylème d'espèces hyperaccumulatrices du genre *Alyssum*. 30
- Figure 6.** Photographie et spectres MEB-EDX de feuille d'*Alyssum murale*. 31
- Figure 7.** Cliché en MET d'une coupe transversale de feuille d'*Alyssum murale*. 32
- Figure 8.** Schéma résumant les principales étapes du cycle biogéochimique du Ni. 38

Chapitre II

- Figure 9 :** Extraction du Ni du sol par différents réactifs et disponibilité du Ni. 48

Chapitre III

- Figure 10.** Site ultramafique de Bergenbach (vue de profil). Localisation et altitude des sites d'observation et de prélèvement (sols I à X). 57
- Figure 11.** Concentration en Ni dans les tissus des plantes collectées sur le site ultramafique de Bergenbach 62
- Figure 12.** Caractérisation des compartiments échangeables du Ni dans les horizons de surface des sols de la toposéquence du site ultramafique de Bergenbach. 63
- Figure 13.** Teneur du Ni en solution (C_{Ni}) et du Ni extrait au DTPA-TEA ($Ni_{DTPA-TEA}$) mesurées dans les horizons de surface des sols de la toposéquence du site ultramafique de Bergenbach. 64
- Figure 14.** Relation entre les teneurs du Ni extrait au DTPA-TEA ($Ni_{DTPA-TEA}$) et les teneurs en Ni dans les parties aériennes de *Th. caerulea* (Ni_p). 65
- Figure 15.** Analyse en composantes principales sur les principales propriétés chimiques et la phytodisponibilité du Ni dans les horizons de surface des sols du site ultramafique de Bergenbach. 66
- Figure 16.** Relation entre le pH du sol et les teneurs du Ni extrait au DTPA-TEA. 67
- Figure 17.** Relation entre la CEC et la teneur du Ni extrait au DTPA-TEA. 67
- Figure 18.** Analyse factorielle en composantes principales réalisée sur les teneurs des éléments totaux et disponibles mesurées dans les horizons de surface des sols du site ultramafique de Bergenbach. 68
- Figure 19.** Distribution du Fe (A) et du Ni (B) au sein des différentes phases minérales présentes dans les horizons de surface des sols VI et IX. 71

Chapitre VI

- Figure 20.** Schéma d'une colonne lysimétrique et photographie du dispositif. 78
- Figure 21.** Clichés MET et spectres EDX des trois phases minérales porteuses de Ni : (A) **Goethite**; (B) **Chrysotile** et (C) **Smectite**. 81
- Figure 22.** Répartition du Ni dans les compartiments du Ni plus ou moins échangeable (méthode des CEI). 83
- Figure 23.** Evolution du pH des minéraux modèles après 15 mois dans les horizons de surface de sols ultramafiques. 83
- Figure 24.** Teneurs du Ni hydrosoluble des minéraux modèles, (A) **Chrysotile** et (B) **Goethite**, avant expérimentation et après 15 mois dans les horizons de surface de sols ultramafiques. 84
- Figure 25.** Teneurs du Ni extractible au DTPA-TEA des minéraux modèles, (A) **Chrysotile** et (B) **Goethite**, avant expérimentation et après 15 mois dans les horizons de surface de sols ultramafiques. 85
- Figure 26.** Teneurs du Ni extractible à l'eau régale des minéraux modèles, (A) **Chrysotile** et (B) **Goethite**, avant expérimentation et après 15 mois dans les horizons de surface de sols ultramafiques. 85
- Figure 27.** Quantités cumulées de Ni (A) et de Mg (B) libéré par l'altération de 1g de **Chrysotile** au cours de l'expérimentation 86
- Figure 28.** Quantités cumulées de Ni (A) et de Fe (B) libérés par l'altération de 1g de **Goethite** au cours de l'expérimentation. 87

Chapitre V

- Figure 29 .** Schématisation des différentes zones de prélèvement. 99
- Figure 30.** Biomasse produite par les parties aériennes des espèces étudiées sur les différents traitements. 103
- Figure 31.** Architecture du système racinaire des espèces végétales cultivées pendant 5 mois sur le traitement **Terre+Smectite**. 105
- Figure 32.** Concentration du Ni dans les feuilles (A), les tiges (B) et les racines (C) des espèces végétales cultivées sur les différents traitements.. 106
- Figure 33.** Quantités de Ni transférées dans les parties aériennes des plantes sur les différents traitements. 107
- Figure 34.** pH de la terre et des minéraux porteurs de Ni contenus dans les sachets avant et après culture. 108
- Figure 35.** Concentration du Ni hydrosoluble mesurée sur la terre et les minéraux porteurs de Ni contenus dans les sachets avant et après cinq mois de culture. 109
- Figure 36.** Concentration du Ni extractible au DTPA-TEA mesurée sur la terre et les minéraux porteurs de Ni contenus dans les sachets avant et après 5 mois de culture. 111
- Figure 37.** Concentration en Ni extractible à l'eau régale de la terre et des minéraux porteurs de Ni contenus dans les sachets avant et après cinq mois de culture. 111
- Figure 38.** Concentration du Ni extractible au DTPA-TEA dans l'ensemble du substrat de culture pour chaque traitement. 115
- Figure 39.** Concentration et répartition du Ni extractible au DTPA-TEA dans les différentes zones du substrat de culture. 117
- Figure 40.** Relation entre la disponibilité initiale du Ni au sein des minéraux tests ($Ni_{DTPA-TEA}$ Minéral) et la disponibilité du Ni mesurée dans la zone C du substrat de culture ($Ni_{DTPA-TEA}$ Substrat Zone C) des différents traitements. 118
- Figure 41.** Relation entre la concentration en Ni hydrosoluble Ni_{H_2O} et la concentration en Ni

- extractible au DTPA-TEA $Ni_{DTPA-TEA}$ dans les différentes zones du rhizotron pour chaque traitement. 119
- Figure 42.** Evolution du pH de la terre après la culture au sein des différentes zones du rhizotron. 121
- Figure 43.** Relation entre la quantité de Ni disponible dans l'ensemble de la terre de remplissage après culture et la quantité de Ni prélevée par les plantes hyperaccumulatrices pour les différents traitements. 122

Chapitre VI

- Figure 44.** Représentation des structures de complexes Ni-L, Ni(II)-carboxylate. 136
- Figure 45.** Spectres XANES des solutions de référence contenant les complexes Ni-Ligand. 137
- Figure 46.** Spectres XANES obtenus pour les échantillons végétaux. 138
- Figure 47.** Oscillations EXAFS brutes et filtrées et transformées de Fourier, obtenues pour les solutions de référence. 139
- Figure 48.** Transformée de Fourier obtenue pour la solution de référence Ni-Succinate (à gauche). Oscillations EXAFS obtenues pour le complexe Ni-Succinate. 140
- Figure 49.** Transformée de Fourier obtenue pour la solution de référence Ni-Citrate (à gauche) ; et oscillations EXAFS filtrées à (1) : 0,7-1,9 Å ; (2) : 0,7-2,6 Å ; (3) : 0,7-4,1 Å ; et (4) : 0,7-6,1 Å. 141
- Figure 50.** Oscillations EXAFS brutes et filtrées, et transformées de Fourier, obtenues pour les plantes hyperaccumulatrices cultivées sur le traitement **Terre+Smectite**. 142
- Figure 51.** Comparaison des oscillations EXAFS filtrées obtenues pour les solutions de référence Ni-Citrate et Ni-Malate. 143
- Figure 52.** Comparaison des oscillations EXAFS (filtrées) obtenues pour la solution de référence Ni-Malate et ceux obtenus pour les échantillons de **feuilles** des espèces hyperaccumulatrices *L. emarginata* (A), *Al. murale* (B) et *Th. caerulescens* (C). 144
- Figure 53.** Comparaison des oscillations EXAFS (filtrées) obtenues pour la solution de référence Ni-Citrate et ceux obtenus pour les échantillons de **tiges** des espèces hyperaccumulatrices *L. emarginata* (A) et *Al. murale* (B). 144
- Figure 54.** Oscillations EXAFS (brutes et filtrées) obtenues pour les échantillons de **feuilles** de *L. emarginata* (A) sur les différents traitements et comparaison des spectres EXAFS (filtrés) pour les traitements **Terre+Goethite** et **Terre+Smectite** (B). 145

Chapitre VII

- Figure 55.** Dispositif de culture 151
- Figure 56.** Concentration en Mg, Fe et Ni dans les racines et les parties aériennes de *L. emarginata* après 15 semaines de culture sur chrysotile. 156
- Figure 57.** Quantités de Mg, Fe et Ni (minéralomasses) dans les racines et les parties aériennes de *L. emarginata* après 15 semaines de culture sur chrysotile. 157
- Figure 58.** Quantités totales de Mg et de Ni libérées par l'altération du **Chrysotile** après 15 semaines de culture (quantités percolées et absorbées par la plante). 157
- Figure 59.** Quantités de Mg percolée au cours de chaque semaine de la culture. 159
- Figure 60.** Diffractogrammes issus de l'analyse en DRX des échantillons **Quartz-Chrysotile** (lames orientées) avant et après la culture de 15 semaines. 160

- Figure 61.** (A) Fibres de chrysotile (CH) sous forme de pelotes adhérentes à la racine de *L.*

<i>emarginata</i> (R) après 15 semaines de culture. (B) Fibres de chrysotile plaquées contre la racine.	161
Figure 62. Nombre de colonies bactériennes présentes dans le système après culture.	162
Figure 63. Evolution du pH des percolats au cours de la culture.	162
Figure 64. Teneurs en Ni dans les racines et les parties aériennes des plantes cultivées en absence ou en présence de Ni (1 mg l ⁻¹) dans la solution nutritive.	163
Figure 65. Teneurs en citrate (A) et en malate (B) dans les racines et les parties aériennes des plantes cultivées en absence ou en présence de Ni (1 mg l ⁻¹) dans la solution nutritive.	166
Figure 66. Relation entre la teneur en Malate et la teneur en Ni dans les parties aériennes de <i>L. emarginata</i> (A) et <i>Au. saxatilis</i> (B).	167

Conclusion générale

Figure 67. Schéma de synthèse sur la réponse de Brassicacées hyperaccumulatrices à la disponibilité du Ni des sols ultramafiques.	175
--	-----

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau 1. Nombre de récoltes annuelles de l'espèce <i>Berkheya codii</i> nécessaires pour réduire la contamination en Ni des sols au niveau de la concentration seuil des Etats-Unis (<i>i.e.</i> 75 $\mu\text{g g}^{-1}$).	37
---	----

Chapitre III

Tableau 2. Caractéristiques physico-chimiques des sols situés le long de la toposéquence du site ultramafique de Bergenbach.	59
Tableau 3. Concentration en Ni (Ni_p) dans les tissus de <i>Th. caerulescens</i> qui se sont développés sur sols ultramafiques du site de Bergenbach.	62
Tableau 4. Identification et abondance des phases minérales présentes dans les sols VI et IX.	69
Tableau 5. Identification des phases porteuses de Ni (MET-EDX) présentes dans les sols VI et IX et teneur en Ni dans les minéraux (en pourcentage atomique, %).	70

Chapitre IV

Tableau 6. Composition chimique et pH des solutions apportées au système <i>Minéral-Quartz</i> .	79
Tableau 7. Surface spécifique et CEC des minéraux nickélifères modèles.	80
Tableau 8. Teneurs du Ni hydrosoluble, du Ni extractible au DTPA-TEA et à l'eau régale, et du Ni total.	82
Tableau 9. Taux de dissolution du Chrysotile et de la Goethite calculés respectivement à partir des quantités totales de Mg et de Ni percolées après 30 jours d'expérimentation.	87

Chapitre V

Tableau 10. Caractéristiques physico-chimiques de la terre de remplissage.	94
Tableau 11. Paramètres des cinétiques d'échange isotopique de la terre de remplissage et teneur du Ni extractible au DTPA-TEA.	95
Tableau 12. Concentration et quantité de Ni dans les graines des espèces végétales étudiées.	96
Tableau 13. Paramètres de cinétiques d'échange isotopique effectués avant et après culture de <i>L. emarginata</i> sur le mélange minéral-Quartz (1-3) contenu dans les sachets.	113
Tableau 14. Evaluation des quantités de Ni libérées par altération du Chrysotile après 5 mois de culture.	123
Tableau 15. Evaluation des quantités de Ni libérées par la Smectite après 5 mois de culture.	124
Tableau 16. Evaluation des quantités de Ni libérées par la Goethite après 5 mois de culture.	125

Chapitre VI

Tableau 17. Concentration du Ni dans les racines, les tiges et les feuilles des plantes hyperaccumulatrices utilisées pour les analyses XAS.	133
Tableau 18. Constantes de stabilité K des différents complexes Ni-Ligand organique.	135

Chapitre VII

Tableau 19. Biomasse produite par <i>L. emarginata</i> après 15 semaines de culture sur chrysotile.	155
Tableau 20. Comparaison entre les quantités totales de Ni théoriquement libérées au cours de la culture par dissolution du Chrysotile (pour les valeurs de Mg correspondantes) et les quantités totales de Ni effectivement mesurées.	158
Tableau 21. Quantités de Ni hydrosoluble et extractible au DTPA-TEA au sein du mélange Chrysotile - <i>Quartz</i> , avant et après la culture.	159
Tableau 22. Taux de dissolution du Chrysotile en présence ou non de <i>L. emarginata</i> .	160
Tableau 23. Quantité de Ni mesurée dans les racines (R) et les parties aériennes (PA) des plantes cultivées en absence ou en présence de Ni (1 mg l^{-1}).	164

Liste des photographies

Chapitre II

Photographie 1. Plantes cultivées au cours des différentes expérimentations. A, B, C : espèces hyperaccumulatrices et D : espèce témoin non accumulatrice. L'ensemble des plantes a été photographié après 5 mois de culture en rhizotron.	42
Photographie 2. Profils de sols dans lesquels ont été prélevés le minerai à chrysotile (A), et le minerai à smectite (B).	44

Chapitre III

Photographie 3. Front de taille de la carrière de serpentinite du site ultramafique de Bergenbach.	56
Photographie 4. Mise en place des sachets contenant le Chrysotile ou la Goethite dans l'horizon de surface d'un cambisol magnésique eutrique du site ultramafique de Bergenbach (chapitre III).	76

Chapitre V

Photographie 5. Dispositif de culture.	97
Photographie 6. Disposition des rhizotrons.	98

Chapitre VII

Photographie 7. Dispositif de culture en milieu hydroponique.	154
--	-----

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

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Madame Catherine KELLER, Professeur, Université Paul Cézanne, CEREGE, Aix-en-Provence

Madame Nathalie VERBRUGGEN, Professeur, Faculté des Sciences, Bruxelles, Belgique

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

Madame CHARDOT Vanessa

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

**"Réponse de Brassicacées hyperaccumulatrices à la disponibilité du nickel des sols
ultramafiques"**

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

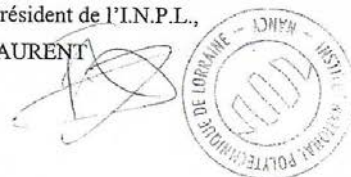
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Sciences agronomiques** »

Fait à Vandoeuvre, le 28 juin 2007

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



Résumé

Les plantes hyperaccumulatrices de métaux ont développé des mécanismes spécifiques de prélèvement de la fraction disponible des métaux du sol, conduisant à leur accumulation dans les parties aériennes. L'utilisation agronomique de ces plantes pourrait être une voie de dépollution des sols contaminés en métaux. Ce travail a pour objectif de contribuer à la compréhension des mécanismes chimiques et biologiques qui conditionnent l'accumulation du Ni par les plantes hyperaccumulatrices, en réponse à la disponibilité du métal dans le sol. Après observation du fonctionnement naturel du système *sol ultramafique-plante hyperaccumulatrice*, nous avons étudié, en laboratoire, l'altération de trois phases minérales nickélifères modèles communes des sols ultramafiques (chrysotile, smectite, goethite) soumises à l'influence de trois Brassicacées hyperaccumulatrices de Ni natives de sites de serpentine d'Europe (*Leptoplax emarginata*, *Alyssum murale* et *Thlaspi caerulescens*).

Les résultats montrent que dans les sols ultramafiques, le Ni phytodisponible provient majoritairement de l'altération des minéraux nickélifères silicatés ferromagnésiens, hérités de la roche mère. Les hyperaccumulateurs ont un comportement différent en fonction de la disponibilité du Ni des sols. Dans les milieux à forte disponibilité du Ni, les hyperaccumulateurs accumulent le Ni proportionnellement à la disponibilité du Ni du milieu. Elles réduisent ainsi significativement la fraction de Ni initialement disponible du milieu, et ne semblent pas favoriser la dissolution des minéraux porteurs de Ni. A l'inverse, dans les milieux à faible disponibilité du Ni, la présence des hyperaccumulateurs accélère la dissolution de phases minérales nickélifères silicatées, en favorisant la solubilisation du métal. Dans ce cas la plante prélève la quasi-totalité du Ni solubilisé. Ces résultats sont essentiels à l'élaboration d'un modèle de culture qui permettra de faciliter l'application du procédé de phytoextraction du Ni à grande échelle.

Response of *Brassicaceae* hyperaccumulators to nickel availability in ultramafic soils

Metal hyperaccumulator plants developed specific mechanisms to extract available metals from the soil and consequently accumulate them in aerial parts. The agronomic use of these plants for the decontamination of metal polluted soils is under study worldwide. This work was undertaken to better elucidate the chemical and physiological mechanisms that influence Ni accumulation by hyperaccumulators in response of Ni availability in soils. To answer these questions we undertook two approaches. Firstly, a site study to determine the natural functioning of the *ultramafic soil-Ni hyperaccumulators* system. Secondly, a lab-scale set of experiments that were designed to study the weathering of three ultramafic Ni-minerals (chrysotile, smectite, goethite) in the rhizosphere of three Ni-hyperaccumulating species naturally growing on European serpentine soils (*Leptoplax emarginata*, *Alyssum murale* et *Thlaspi caerulescens*).

Results showed that, in ultramafic soils, phytoavailable Ni derives from the weathering of primary nickeliferous ferromagnesian silicates. Hyperaccumulators show a different behaviour depending of Ni availability in the environment of the culture. In environments showing high available Ni, hyperaccumulators accumulate Ni proportionally to Ni availability. In this way, they can significantly reduce the initially available fraction of Ni but do not seem to enhance the weathering of unavailable Ni forms. Contrarily, in environments with extremely low Ni availability, hyperaccumulators may strongly enhance the dissolution of nickeliferous silicate minerals and so favour Ni solubilisation. If so, hyperaccumulators absorb the majority of Ni solubilised. These results are of considerable interest for the elaboration of a crop model designed for the optimisation of the phytoextraction concept and high scale application.